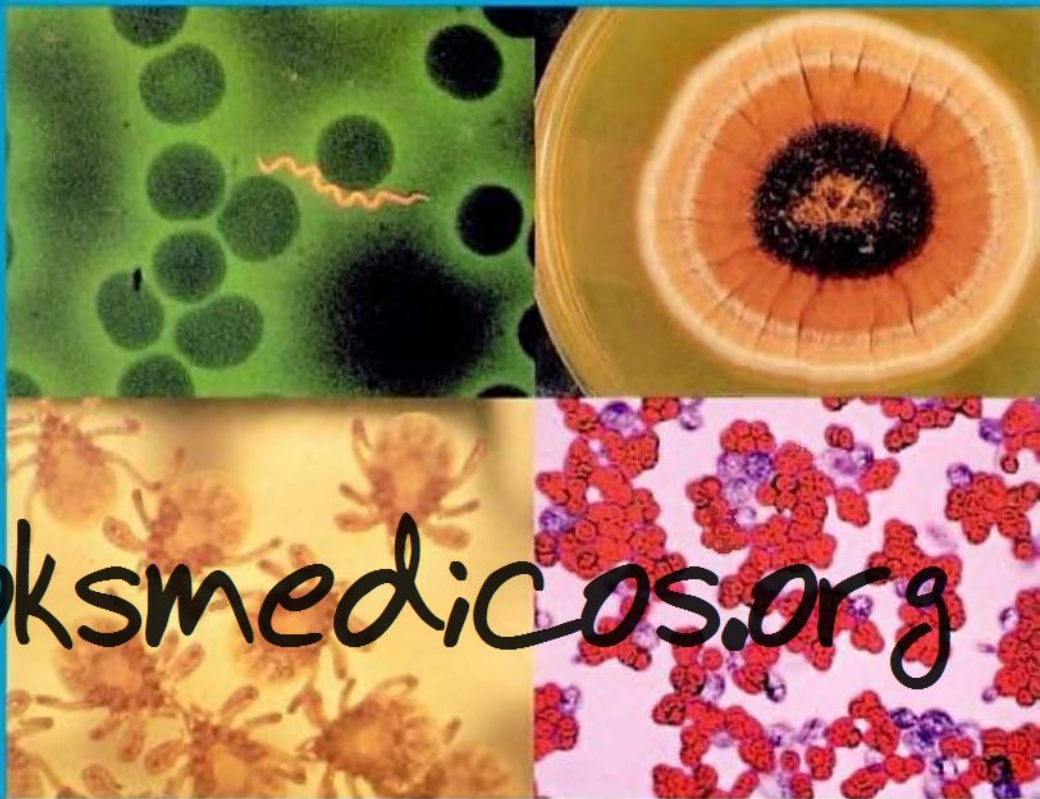


Winn (h.) • Allen • Janda • Koneman • Procop •
Schreckenberger • Woods

Koneman Diagnóstico microbiológico

Texto y Atlas en color

6ª EDICIÓN



booksmedicos.org

EDITORIAL MEDICA
panamericana

Koneman

**Diagnóstico
microbiológico**

Texto y Atlas en color

booksmedicos.org

Koneman

Diagnóstico

microbiológico

Texto y Atlas en color

6ª EDICIÓN

Washington C. Winn (h.) MD, MBA
Director, Laboratorio de Microbiología Clínica
Fletcher Allen Health Care
Profesor de Anatomía Patológica
University of Vermont College of Medicine
Burlington, Vermont, EE.UU.

Stephen D. Allen, MD
Profesor de Anatomía Patológica y Medicina de
Laboratorio, Indiana University School of Medicine
Director, División de Microbiología Clínica, Clarian
Health-Methodist, Indiana University and Riley
Hospitals
Jefe, Laboratorio de Microbiología Clínica
Roudebush Veterans Affairs Hospital
Patólogo, Wishard Memorial Hospital
Indianapolis, Indiana, EE.UU.

William M. Janda, PhD, (ABMM)
Profesor Adjunto de Anatomía Patológica
Director, Laboratorio de Microbiología Clínica
University of Illinois Medical Center
Chicago, Illinois, EE.UU.

Elmer W. Koneman, MD
Profesor Emérito
University of Colorado School of Medicine
Denver, Colorado, EE.UU.

Gary W. Procop, MD, MS
Jefe de Sección, Microbiología Clínica
The Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, Ohio, EE.UU.

Paul C. Schreckenberger, PhD, D (ABMM)
Profesor de Anatomía Patológica
Director, Microbiología Clínica
Loyola University Medical Center
Maywood, Illinois, EE.UU.

Gail L. Woods, MD
Profesor y Director Médico de Laboratorios
Clínicos Departamento de Anatomía Patológica
University of Arkansas for Medical Sciences
Little Rock, Arkansas, EE.UU.

booksmedicos.org



BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - PORTO ALEGRE

e-mail: info@medicapanamericana.com

www.medicapanamericana.com

Título del original en inglés
KONEMAN'S COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY, 6th ed.
Copyright © 2006, Lippincott Williams & Wilkins
Published by arrangement with Lippincott Williams & Wilkins, USA

© Gestora de Derechos Autorales, S.L. Madrid, España

Traducción de
EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S.A.

Efectuada por los doctores Octavio Giovanniello, Diana Klajn, Ana María Pertierra, María Victoria Preciado y Silvia Rondinone.

Los editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los poseedores del copyright del material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.

Las ciencias de la salud están en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse de que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o de cambios en las ciencias de la salud, ni los autores, ni la editorial o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con relación a fármacos nuevos o de uso infrecuente.



Visite nuestra página web:
<http://www.medicapanamericana.com>

ARGENTINA

Marcelo T. de Alvear 2145
(C1122AAG) Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821-5520 / 2066 / Fax (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA

Carrera 7a A N° 69-19 - Santa Fe de Bogotá D.C., Colombia
Tel.: (57-1) 345-4508 / 314-5014 / Fax: (57-1) 314-5015 / 345-0019
e-mail: info@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA

Alberto Alcocer 24, 6° (28036) - Madrid, España
Tel.: (34) 91-1317800 / Fax: (34) 91-1317805 / (34) 91-4570919
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO

Hegel N° 141, 2° piso
Colonia Chapultepec Morales
Delegación Miguel Hidalgo - C.P. 11570 - México D.F.
Tel.: (52-55) 5262-9470 / Fax: (52-55) 2624-2827
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA

Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6 C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador, Caracas
Depto. Capital, Venezuela
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666 Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

IMPRESO EN LA ARGENTINA

ISBN: 978-950-06-0895-4



Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color /
Elmer W. Koneman ... [et al.]. -
6ª ed. - Buenos Aires : Médica Panamericana.
1696 p. ; 28 x 20 cm.

Traducido por: Octavio Giovanniello, Diana Klajn, María
Preciado... [et. al]

ISBN 978-950-06-0895-4

1. Microbiología. I. Koneman, Elmer W. II. Giovanniello,
Octavio, trad. III. Klajn, Diana, trad. IV. Preciado, María, trad.
CDD 616.01

Hecho el depósito que dispone la ley 11.723.
Todos los derechos reservados.
Este libro o cualquiera de sus partes
no podrán ser reproducidos ni archivados en sistemas
recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por
ningún medio, ya sean mecánicos o electrónicos,
fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el
permiso previo de Editorial Médica Panamericana S.A.

© 2008. EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.
Marcelo T. de Alvear 2145 - Buenos Aires - Argentina

Esta edición se terminó de imprimir y encuadernar
en el mes de enero de 2008
en los talleres de Compañía Gráfica Internacional S.A.
Agustín de Vedia 2948, Buenos Aires, Argentina

Dedicatoria

En memoria de nuestros colegas y ex coautores



Herbert M. Sommers, MD

Profesor de Anatomía Patológica
Northwestern University Medical School
Director del Laboratorio de Microbiología
Northwestern Memorial Hospital
Chicago, Illinois, EE.UU.



V.R. Dowell (h.), PhD

Jefe, Rama Bacteriología de Anaerobios
Hospital Infections Program
Centers for Disease Control
Atlanta, Georgia, EE.UU.

Prólogo

Se ha dicho que la microbiología clínica es tanto un arte como una ciencia. La información científica relacionada con las características metabólicas, fisiológicas y genéticas de los microorganismos ha proporcionado las bases para las pruebas de identificación de aislamientos en el laboratorio clínico. El reconocimiento de la morfología microscópica y macroscópica característica de los microorganismos se considera la tarea esencial de la microbiología clínica en la selección inicial de las pruebas más apropiadas para identificar cepas clínicas. Sin embargo, el proceso de identificación de la causa de una infección es mucho más complejo. Es iniciado por el médico del paciente que evalúa sus antecedentes, los signos y síntomas y los hallazgos físicos, lo cual sugiere un diagnóstico tentativo de infección que a su vez conduce a la recolección de las muestras que se consideran con mayor probabilidad de confirmar el diagnóstico. Es esencial que el microbiólogo clínico trabaje con los médicos para establecer pautas de recolección de muestras según la causa y el sitio de infección sospechados. Es también responsabilidad del microbiólogo clínico asegurarse no sólo de que las muestras se recojan y coloquen correctamente en un recipiente sino también que se las transporte hasta el laboratorio lo antes posible.

Dado que las muestras son recogidas por diversos profesionales de la salud, también es esencial que el microbiólogo clínico establezca criterios para rechazarlas ya sea porque se las recolectó mal o porque la prueba solicitada no es apropiada para la muestra remitida. En estos casos es importante la comunicación entre el médico y el microbiólogo, para que se remita otra muestra y para que el microbiólogo instruya al médico acerca de cuál es la más adecuada.

Una vez recibida la muestra correcta, el microbiólogo debe haber establecido pautas de procesamiento para que se realicen las pruebas procedentes. Los técnicos del laboratorio deben estar capacitados para distinguir entre la microflora endógena y los posibles patógenos debido a la tendencia habitual de los médicos a adjudicar importancia clínica a todo dato que informe el laboratorio. Asimismo, se debe ser prudente en la selección de los microorganismos que se somete-

rán a antibiogramas y en la selección de los antibióticos evaluados.

Como si los problemas que acabamos de mencionar no fueran suficientes, el laboratorio de microbiología enfrenta otras dificultades impuestas por las restricciones crecientes en los costos y la centralización de los laboratorios. Las primeras exigen el ejercicio del máximo cuidado en la selección de las pruebas y los procedimientos utilizados en el laboratorio, mientras que la última plantea problemas en el transporte de las muestras y la comunicación.

El objetivo de *Diagnóstico microbiológico de Koneman* es proporcionar la información científica necesaria para comprender las manifestaciones estructurales, fisiológicas, patológicas y clínicas de los microorganismos que causan enfermedades infecciosas y presentar pautas y procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de estas enfermedades. El texto proporciona enfoques detallados de la recolección y el transporte de las muestras, los procedimientos para su procesamiento, las pruebas utilizadas para la identificación de los microorganismos, y gráficos y cuadros que mencionan las reacciones de esas pruebas. Se intercalan gráficos, cuadros y figuras que destacan los puntos claves del texto. Se proporcionan además microfotografías en color de los microorganismos y fotografías de colonias en medios sólidos que ayudan a reconocer la morfología característica de los microorganismos. Como tal, este libro es la guía más extensa sobre diagnóstico microbiológico y su lectura debe ser una exigencia para los médicos especialistas en enfermedades infecciosas, patólogos, microbiólogos clínicos y auxiliares de laboratorio.

John A. Washington
Presidente Emérito, Departamento de Anatomía
Patológica Clínica

Jefe de Sección Emérito, Sección de Microbiología Clínica
Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, Ohio

Prefacio

Esta sexta edición representa un progreso continuo en nuestro intento por comunicar a nuestros lectores el campo cada vez más complejo y estimulante del diagnóstico microbiológico. Elmer Koneman, uno de los autores fundadores y el propulsor de las otras cinco ediciones, ha decidido no continuar como autor coordinador. En reconocimiento a sus enormes contribuciones, sus compañeros unánimemente insistieron en cambiar el nombre del libro por el de *Diagnóstico microbiológico, texto y Atlas en color de Koneman*. Por fortuna, el doctor Koneman estuvo de acuerdo en continuar como colaborador, de modo que su experiencia sigue siendo parte importante de la obra. Damos aquí la bienvenida a dos autores nuevos: Gary Procop y Gail Woods. Su amplia experiencia aporta “aire fresco” y otras perspectivas al trabajo; algo siempre importante para el crecimiento continuo de cualquier libro.

Si bien la organización general del texto sigue siendo similar a la de las ediciones anteriores, se han realizado algunos cambios importantes para reflejar la naturaleza dinámica de nuestro campo. Los capítulos 1 y 2, la introducción a la microbiología clínica, se han revisado para poner mayor énfasis en todo el campo y algo menos de atención en la bacteriología. Se ha agregado una lámina en color que ilustra los artificios de los frotis con tinción de Gram y se destaca la importancia de conocer lo que *no* es real. La información ampliada sobre gerenciamiento y regulaciones del laboratorio de diagnóstico microbiológico refleja la realidad del ejercicio médico moderno. Además, hemos tratado las cuestiones “suaves” más difíciles pero de importancia crítica que enfrentamos hoy todos los microbiólogos clínicos: ¿Qué conseguimos, cuándo lo conseguimos y en qué medida lo conseguimos? Con recursos económicos y humanos cada vez más escasos, estas dificultades han cobrado tanta relevancia como las cuestiones científicas más tradicionales.

En esta edición se presta mucha atención a las técnicas tradicionales que mantienen su vigencia en los laboratorios clínicos, pero la importancia cada vez mayor de los métodos inmunológicos (cap. 3), y sobre todo de las técnicas moleculares (cap. 4), justifica un análisis exhaustivo de sus principios, así como una amplia cobertura en cada capítulo que trata sobre ellos. En los casos en que el enfoque inmunológico o el molecular se convirtieron en la regla de los laboratorios diagnósticos, el texto fue actualizado para que reflejara estos cambios. Se ha eliminado o condensado la explicación de los métodos obsoletos o que se están tornando rápidamente arcaicos.

La introducción a la bacteriología, que sigue siendo el eje de los laboratorios clínicos, continúa como capítulo 5 y sienta las bases para los capítulos posteriores sobre este vasto campo. El capítulo sobre las especies de *Haemophilus* se ha integrado con la explicación de otros bacilos gramnegativos con requerimien-

tos nutricionales especiales. Por el contrario, la consideración de los actinomicetos aerobios, un grupo bacteriano cada vez más complejo, se ha separado de la descripción de otros bacilos grampositivos.

En respuesta a la frecuencia creciente de envíos de ectoparásitos a los laboratorios diagnósticos para su identificación se ofrece una explicación más detallada sobre la identificación de garrapatas en un apéndice con láminas nuevas en color.

La filosofía del libro sigue siendo la misma: nuestro objetivo es proporcionar una explicación extensa pero práctica de la ciencia y el arte del diagnóstico microbiológico. Estamos convencidos de que es esencial integrar los problemas y las dificultades clínicas con las herramientas que utilizamos en el laboratorio para proporcionar la información necesaria para tratar a los pacientes. El beneficio del paciente es el eje del ejercicio médico tanto en la consulta clínica como en el laboratorio. También creemos que es necesario proveer una documentación rigurosa de las fuentes primarias que sustentan la información concisa.

Este texto está destinado a dos grupos de lectores. El primer grupo son los estudiantes de microbiología y de medicina, sobre todo los interesados en las enfermedades infecciosas. El libro proporciona una revisión extensa para estudiantes graduados, residentes de Anatomía Patológica y becarios de enfermedades infecciosas. Para los estudiantes de pregrado la cantidad de material puede parecer abrumadora, pero es resultado de los conocimientos actuales. La dedicación del docente es esencial para guiar al estudiante que se inicia, quien contará luego con los medios convenientes para aplicarlos en su ámbito de ejercicio o su lugar de trabajo, en lugar de una información introductoria superficial y desactualizada para la biblioteca.

El otro grupo, igualmente importante, lo constituyen los profesionales del laboratorio para quienes el texto puede representar la primera fuente de capacitación actualizada o de resolución de problemas de la práctica clínica.

A fin de facilitar la comprensión de los temas, seguimos utilizando cuadros, gráficos detallados, recuadros con resumen de texto y numerosas ilustraciones, muchas a todo color. Cada capítulo comienza con un bosquejo detallado: el capítulo en una mirada.

Estamos muy agradecidos a los distintos mentores, colegas y estudiantes cuyos planteos nos han estimulado e inspirado. Nos encontramos particularmente en deuda con John A. Washington quien generosamente preparó el prólogo para esta edición. Recordamos siempre a dos ex coautores ya desaparecidos, V.R. Dowell (h.) y Herbert Sommers. No hubiéramos podido lograr este libro sin su trabajo fundamental en ediciones anteriores. Como reconocimiento a su colaboración, dedicamos esta edición a su memoria.

Agradecimientos

En primer lugar, estamos en deuda con nuestros colegas de los laboratorios de microbiología de nuestras respectivas instituciones por el importante papel que desempeñan en nuestra vida profesional. Ellos nos han planteado desafíos, nos han inspirado y educado. Esperamos que este libro sea un medio de devolver en pequeña medida sus contribuciones. Además, agradecemos a los miembros de nuestras familias su tolerancia mientras intentábamos cumplir con los plazos cuando podríamos haber estado con ellos. Su apoyo y aliento

en el hogar constituyen una parte integral de nuestras actividades laborales.

Quisiéramos reconocer la guía editorial y científica de J. Stephen Dumler, James Versalovic, P. Rocco Lasala, Deborah Reardon, Ann Croft, Linda Marler y Janet Reynolds. En particular agradecemos a Fred. W. Westenfeld, Frederick C. Patterson y Jean A. Siders sus colaboraciones sustanciales en esta edición y en las anteriores, las cuales se hubieran visto considerablemente disminuidas sin su aporte.

Índice resumido

CAPÍTULO 1

Introducción a la microbiología: Parte I: El papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas: guía para la práctica y el tratamiento 1

CAPÍTULO 2

Introducción a la microbiología: Parte II: Guías para la recolección, el transporte, el procesamiento, el análisis y el informe de los cultivos a partir de muestras de localizaciones específicas 66

CAPÍTULO 3

El diagnóstico de laboratorio por métodos inmunológicos 109

CAPÍTULO 4

Microbiología molecular 129

CAPÍTULO 5

Bacteriología médica: taxonomía, morfología, fisiología y virulencia 161

CAPÍTULO 6

Enterobacteriaceae 204

CAPÍTULO 7

Bacilos gramnegativos no fermentadores 289

CAPÍTULO 8

Bacilos gramnegativos curvos y fermentadores oxidasa positivos: campilobacterias y vibriones 372

CAPÍTULO 9

Otros bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales 407

CAPÍTULO 10

Legionella 527

CAPÍTULO 11

Especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis* 539

CAPÍTULO 12

Cocos grampositivos: Parte I: Estafilococos y cocos grampositivos relacionados 593

CAPÍTULO 13

Cocos grampositivos: Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" 639

CAPÍTULO 14

Bacilos grampositivos aerobios y facultativos 728

CAPÍTULO 15

Actinomicetos aerobios 817

CAPÍTULO 16

Bacterias anaerobias 836

CAPÍTULO 17

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos 902

CAPÍTULO 18

Micoplasmas y ureaplasmas 975

CAPÍTULO 19

Micobacterias 1016

CAPÍTULO 20

Infecciones producidas por espiroquetas 1076

CAPÍTULO 21

Micología 1102

CAPÍTULO 22

Parasitología 1191

CAPÍTULO 23

Diagnóstico de infecciones causadas por virus, *Chlamydia*, *Rickettsia* y microorganismos relacionados 1271

APÉNDICE I

Ectoparásitos y otros invertebrados en el laboratorio clínico: una guía breve 1361

APÉNDICE II

Amebas de vida libre 1377

PROTOCOLOS

1382

LÁMINAS EN COLOR

ÍNDICE ANALÍTICO

I-1

Índice

CAPÍTULO 1

Introducción a la microbiología 1

Parte I: El papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas: guía para la práctica y el tratamiento 1

INTRODUCCIÓN 2

Lineamientos del libro 2

El mundo de las enfermedades infecciosas 2

LAS TRIADAS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS 2

El agente infeccioso 3

Clases de agentes infecciosos 3

Interacciones entre huéspedes y agentes infecciosos 4

Función de los agentes infecciosos en la naturaleza 4

Virulencia 4

El ambiente 5

El huésped infectado 6

Defensa humoral innata (no celular) 7

Defensa celular innata 7

Tipos de inflamación 7

Defensa celular inmunitaria adaptativa 8

Defensa no celular inmunitaria adaptativa (humoral) 8

Signos y síntomas clínicos de infección 8

Efectos indirectos de los agentes infecciosos en seres humanos 9

FASES DEL CICLO DIAGNÓSTICO 10

Fase preanalítica 10

Recolección de la muestra 10

Transporte de la muestra 14

Recepción de la muestra y observaciones preliminares 14

Criterios para el rechazo de las muestras 14

Relación costo-eficacia en la fase preanalítica 15

Fase analítica 15

Examen microscópico 15

Procesamiento de las muestras 26

Interpretación de los cultivos 33

Procedimientos para la identificación preliminar de las bacterias

aisladas 37

Identificación de microorganismos diferentes de las bacterias 39

Antibiograma 39

Relación costo-eficacia en la fase analítica 39

Fase posanalítica 43

Informe de los resultados 43

Interacción con los epidemiólogos 44

Análisis de los resultados 44

Conservación de las muestras y de los registros 44

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA 45

Regulación estatal 45

Gestión de riesgos 47

Seguridad del laboratorio 48

Normas y reglamentaciones generales de seguridad 48

Precauciones habituales de seguridad 48

Agentes biológicos 50

Precauciones universales 52

Envío de muestras y de agentes etiológicos 56

Peligros no biológicos 56

Bioterrorismo 58

Aseguramiento de calidad 58

Control de calidad 59

Componentes de un programa de control de calidad 60

Control de los aparatos del laboratorio 60

Control de los medios de cultivo, reactivos e insumos 61

CAPÍTULO 2

Introducción a la microbiología 66

Parte II: Guías para la recolección, el transporte, el procesamiento, el análisis y el informe de los cultivos a partir de muestras de localizaciones específicas 66

INFECCIONES DEL APARATO RESPIRATORIO 67

Infecciones de las vías respiratorias altas 67

Flora endógena 67

Faringitis 70

Otras infecciones de la cavidad bucal diferentes de la faringitis 71

Infecciones de la nasofaringe y cultivos nasofaríngeos 72

Otitis media y sinusitis 73

Epiglottitis 73

Laringitis 73

Otras infecciones de las vías respiratorias altas 73

Infecciones de las vías respiratorias bajas 73

Traqueobronquitis 73

Bronquiolitis 74

Neumonía 74

Neumonía crónica 74

Emplema 75

Neumonía en poblaciones especiales 75

Recolección de muestras para el diagnóstico de las infecciones

de las vías respiratorias bajas 75

Pruebas de laboratorio y diagnóstico de neumonía 76

INFECCIONES DEL TUBO DIGESTIVO	77	Diagnóstico de las infecciones oculares	96
Infecciones intestinales	77	Recolección de las muestras	96
Síntomas clínicos	77	Examen microscópico	96
Recolección de muestras de heces	79	Cultivos	96
Consideraciones epidemiológicas en la evaluación de los pacientes con gastroenteritis	79	INFECCIONES DE LA SANGRE	96
Infecciones del tubo digestivo alto	80	Presentación clínica y patogenia	96
Síntomas clínicos	80	Bacteriemia y septicemia	96
Obtención de muestras del tubo digestivo alto	80	Tipos de bacteriemia	96
INFECCIONES URINARIAS	81	Infección intravascular	98
Signos y síntomas clínicos	81	Bacteriemia y sepsis asociadas con los catéteres	98
Factores del huésped	81	Recolección de hemocultivos	98
Recolección de muestras de orina para cultivo	81	Contaminación con flora de la piel	98
Muestras de orina del chorro medio de la micción	82	Cantidad y oportunidad de los cultivos	100
Otras muestras de orina de micción espontánea	83	Medios de cultivo	100
Recolección a partir de catéteres	83	Sistemas de procesamiento de hemocultivos	101
Punción suprapúbica	83	Sistemas manuales de hemocultivos	101
Cultivo de muestras de orina	83	Sistemas de hemocultivos por lisis y centrifugación	101
Pruebas de cribado para infecciones urinarias	84	Sistemas de hemocultivos automatizados e informatizados	102
Pruebas de cribado para bacteriuria	84	Estudios comparativos	103
Pruebas de cribado para piuria	86	Consideraciones especiales	103
INFECCIONES DEL APARATO GENITAL	86	Microorganismos con requerimientos nutricionales especiales y endocarditis	103
Infecciones de transmisión sexual	86	Bacteriemia y sepsis asociadas con los catéteres	103
Uretritis y cervicitis	86	Tejidos y biopsias	104
Úlceras genitales	86		
Infecciones genitales transmitidas por otra vía diferente de la sexual	87		
Vaginitis y vaginosis	87		
Infecciones de los genitales internos femeninos	87		
Complicaciones sistémicas de las infecciones genitales	87		
Diagnóstico de las Infecciones genitales	88		
Diagnóstico de uretritis, cervicitis y vaginitis	88		
Diagnóstico de úlceras genitales y verrugas venéreas	88		
Recolección de muestras genitales	89		
INFECCIONES ÓSEAS Y DE LAS ARTICULACIONES	89		
Presentación clínica	89		
Diagnóstico de las infecciones óseas y de las articulaciones	90		
INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	90		
Meningitis	90		
Encefalitis y abscesos cerebrales	91		
Diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central	92		
Obtención de muestras	92		
Evaluación de la respuesta inflamatoria y de las técnicas de microscopia	92		
Detección directa de antígenos y de ácidos nucleicos	92		
Diagnóstico serológico	93		
Diagnóstico por cultivo	93		
HERIDAS, ABSCESO Y CELULITIS	94		
Presentación clínica	94		
Diagnóstico de infecciones de heridas, abscesos y celulitis	94		
Recolección de muestras	94		
Examen microscópico de las muestras	94		
Cultivos	95		
INFECCIONES OCULARES	95		
Presentación clínica	95		
Conjuntivitis	95		
Queratitis	95		
Uveítis y endoftalmitis	95		
		CAPÍTULO 3	
		El diagnóstico de laboratorio por métodos inmunológicos	109
		ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS: DEFINICIONES BÁSICAS	110
		ANTICUERPOS MONOCLONALES	111
		TIPOS DE REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	112
		Reacciones de precipitación	112
		Fijación del complemento e inhibición de la hemaglutinación	114
		Reacciones de aglutinación	115
		MÉTODOS DE INMUNOANÁLISIS EN FASE SÓLIDA	117
		Enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos	117
		Métodos enzimoimmunológicos de captura de anticuerpos para la detección de IgM	120
		Enzimoimmunoanálisis enzimáticos para la detección de antígenos	120
		TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA	123
		Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de antígenos	123
		Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos	124
		CAPÍTULO 4	
		Microbiología molecular	129
		ÁCIDOS NUCLEICOS—LAS BASES DEL DNA Y DEL RNA	130
		Estructura del DNA	130
		Estructura del RNA	130
		Función del DNA—almacenamiento de información	131
		Función del RNA—transferencia de información	131

Lectura (transcripción) e interpretación (traducción) del código genético	131
MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES	132
Sondas de ácidos nucleicos	133
Aplicaciones clínicas	134
Captura de híbridos	134
Aplicaciones clínicas	134
DNA ramificado	135
Aplicaciones clínicas	135
Hibridación in situ	136
Aplicaciones clínicas	136
AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	137
Bases de la reacción en cadena de la polimerasa	137
Aplicaciones clínicas	139
Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos	140
Aplicaciones clínicas	140
Modificaciones de la PCR	141
RT-PCR	141
Aplicaciones clínicas	141
PCR de amplio espectro	141
Aplicaciones clínicas	142
PCR múltiple	142
Aplicaciones clínicas	142
PCR anidada	143
Aplicaciones clínicas	143
ANÁLISIS POSAMPLIFICACIÓN	143
Métodos tradicionales de detección	143
Análisis de electroforesis en gel <i>Southern Blot</i>	143
Detección enzimática de productos amplificados	143
Aplicaciones clínicas	144
Hibridación inversa	144
Aplicaciones clínicas	144
Secuenciación de DNA	145
Secuenciación tradicional de DNA	145
Aplicaciones clínicas	145
Secuenciación por síntesis (pirosecuenciación)	145
Aplicaciones clínicas	146
Análisis de micromatrices	146
Aplicaciones clínicas	147
AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN TIEMPO REAL	147
Métodos de detección de productos de amplificación en tiempo real	147
Verde SYBR	147
Sondas de hibridación	148
Aplicaciones clínicas	150
TIPIFICACIÓN DE ESPECIES	151
Tipificación no basada en la amplificación	152
Electroforesis en gel de campo pulsado	152
Tipificación basada en la amplificación	153
PCR-RFLP	153
rep-PCR	154
Aplicaciones clínicas de la tipificación microbiana	154
CONCLUSIÓN	154

CAPÍTULO 5

Bacteriología médica: taxonomía, morfología, fisiología y virulencia 161

TAXONOMÍA: CLASIFICACIÓN, NOMENCLATURA E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	162
Denominación de las bacterias	162
Identificación fenotípica de las bacterias	162
Criterios filogenéticos para la clasificación de las bacterias	163
MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA BACTERIANAS BÁSICAS	165
Forma y tamaño de las bacterias	172
Estructura nuclear, replicación, transcripción y traducción de DNA	172
Citoplasma	176
Membrana citoplasmática	176
Estructura de la pared celular bacteriana	177
Pared celular de las bacterias grampositivas	178
Pared celular de las bacterias gramnegativas	180
Pared celular de las bacterias "ácido-alcohol resistentes"	182
Endosporas bacterianas	183
Estructuras de la superficie bacteriana	184
Cápsulas	184
Flagelos	184
Fimbrias (pili)	185
Intercambio genético y recombinación en las bacterias	186
Requerimientos para el metabolismo y el crecimiento bacterianos	186
Carbono	186
Dióxido de carbono	187
Oxígeno	187
Nitrógeno	187
Factores de crecimiento	190
Cinética del crecimiento celular bacteriano	191
Metabolismo bacteriano general y generación de energía	191
Fermentación	191
Utilización del piruvato	193
FACTORES DE VIRULENCIA BACTERIANOS Y PATOGENICIDAD	195
Definiciones y conceptos	195
Requerimientos para la patogenicidad	197
Factores de virulencia de los microorganismos	197
Adhesinas	197
Agresinas	198
Exotoxinas y endotoxinas	199
Superantígenos bacterianos	200

CAPÍTULO 6

Enterobacteriaceae 204

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA	206
Características de las pruebas de cribado	206
Utilización de hidratos de carbono	206
Actividad de la citocromooxidasa	209
Reducción del nitrato	209

**MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA DETECTAR LA
FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO** 209

Uso de agar hierro de Kligier y agar triple azúcar-hierro 210

Principios bioquímicos 210

SELECCIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIO 211

Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios
selectivos 211

Medios de aislamiento selectivos 212

Medios de aislamiento de alta selectividad utilizados
fundamentalmente para muestras gastrointestinales 214

Medios de enriquecimiento 215

Pautas para elegir medios de aislamiento selectivos 215

**CARACTERÍSTICAS DE LAS PRUEBAS DE
IDENTIFICACIÓN DIFERENCIAL** 215

Producción de indol 216

Prueba del rojo de metilo 217

Prueba de Voges-Proskauer 217

Utilización de citrato 217

Producción de ureasa 218

Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina 218

Producción de fenilalanina desaminasa 219

Producción de sulfuro de hidrógeno 219

Motilidad 220

TAXONOMÍA DE ENTEROBACTERIACEAE 220

Clasificación de *Enterobacteriaceae* por tribus 220

Características claves para la identificación de las especies
más comunes 225

Tribu *Escherichieae* 225

Tribu *Edwardsiellae* 240

Tribu *Salmonelleae* 241

Tribu *Citrobactereae* 249

Tribu *Klebsiellae* 250

Tribu *Proteeae* 255

Tribu *Yersiniiae* 258

Tribu *Erwiniae* 262

Otros géneros nuevos de *Enterobacteriaceae* 263

Características de identificación de *Enterobacteriaceae*
más nuevas 263

importancia clínica de *Enterobacteriaceae* más nuevas 263

**MÉTODOS DE CRIBADO PARA LA IDENTIFICACIÓN
RÁPIDA** 269

Equipos comerciales para pruebas de cribado 270

Medios de agar cromogénicos 271

SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN CLÁSICOS 271

Matriz en tablero de damas 271

Diagramas de flujo 271

Esquemas computarizados 272

SISTEMAS DE CODIFICACIÓN NUMÉRICA 273

Lectura de los códigos de octales en registradores de códigos
numéricos 274

Frecuencia de aparición estimada 274

Cálculo de probabilidad 274

Resolución de las discrepancias 274

**SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN EN EQUIPOS
COMERCIALES DE DETERMINACIONES MÚLTIPLES** 274

Aspectos generales de los sistemas comerciales disponibles 276

Sistemas de identificación específicos API 20E 276

Sistema ID BBL Crystal Enteric/Nonfermenter 276

Sistema Rapld onE

Enterotube II

Micro-ID

Microplaca Biolog GN2

Sistema MicroScan

Sistema Sensititre

**SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN SEMIAUTOMÁTICOS
Y AUTOMÁTICOS**

MicroScan Walkaway

Sistema Vitek

Sistema de autoidentificación para gramnegativos

Sensititre

Sistema Phoenix

Sistema OmniLog ID

CAPÍTULO 7
Bacilos gramnegativos no fermentadores

**Parte I: Metabolismo de los no
fermentadores**

METABOLISMO FERMENTATIVO Y OXIDATIVO

Vía de Embden-Meyerhof-Parnas

Vía de Entner-Doudoroff

Vía de las hexosas monofosfato de Warburg-Dickens

**SEÑALES INICIALES DE QUE UNA CEPA AISLADA
DESCONOCIDA ES NO FERMENTADORA**

Falta de pruebas de fermentación de la glucosa

Reacción de citocromo oxidasa positiva

Falta de crecimiento en agar de MacConkey

**PRUEBAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE NO
FERMENTADORES**

Utilización de glucosa

Motilidad

Producción de pigmentos

Hidrólisis de la urea

Reducción de nitratos

Desnitrificación de nitratos y nitritos

Producción de indol

Descarboxilación

Hidrólisis de esculina

Tinciones para flagelos

Método de Leifson

Método de Ryu

Técnica de preparación húmeda

Morfología de los flagelos

**Parte II: Taxonomía, características
bioquímicas e importancia clínica de los
géneros de no fermentadores relevantes en
medicina**

MICROORGANISMOS MÓVILES CON FLAGELOS POLARES

Pseudomonadales

Familia *Pseudomonadaceae*

Género *Pseudomonas*-grupo rRNA I

Familia *Burkholderiaceae*

Grupo rRNA II

Género *Burkholderia*-grupo *Pseudomallei*

Especies de <i>Helicobacter</i> de importancia médica	383	Neumonía	418
Especies de <i>Helicobacter</i> no humanas	384	Bacteriemia y sus complicaciones infecciosas	418
Otros bacilos gramnegativos microaerófilos	384	Endocarditis	418
IDENTIFICACIÓN DEFINITIVA DE CAMPILOBACTERES Y BACTERIAS RELACIONADAS	384	Infecciones urogenitales, maternas y perinatales	419
Identificación rápida de <i>Campilobacteres</i> a partir de colonias y muestras de heces	385	Infecciones oculares	419
Pruebas diferentes del cultivo	385	Fiebre purpúrica brasileña	419
Métodos de detección directos	385	Otras infecciones por <i>Haemophilus influenzae</i>	420
Cultivo y aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	385	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	420
Muestras para el aislamiento de <i>H. pylori</i>	385	<i>Haemophilus aphrophilus</i> y <i>Haemophilus paraphrophilus</i>	421
Procedimiento de aislamiento	385	Otras especies de <i>Haemophilus</i>	421
Identificación de <i>H. pylori</i>	386	<i>Haemophilus ducreyi</i>	421
Prueba de ureasa en biopsia (prueba CLO)	386	Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por <i>Haemophilus</i>	422
Pruebas no invasivas para el diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	386	Examen directo de muestras clínicas	422
Precisión de las pruebas invasivas y no invasivas para el diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	387	Cultivo de especies de <i>Haemophilus</i>	422
<i>Helicobacteres</i> enterohepáticos	387	Identificación de especies de <i>Haemophilus</i>	423
		Diagnóstico de laboratorio de infección por <i>Haemophilus ducreyi</i>	427
		Sensibilidad a los antibióticos de las especies de <i>Haemophilus</i>	426
Parte II: Familias de <i>Vibrionaceae</i> y <i>Aeromonadaceae</i>		ESPECIES DE ACTINOBACILLUS	429
FILOGENIA DE VIBRIONACEAE	387	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	429
Género <i>Vibrio</i>	387	Importancia clínica	430
Taxonomía	387	Características de los cultivos e identificación	430
Descripción y síndromes clínicos asociados de especies de <i>Vibrio</i> de importancia humana	388	Sensibilidad a los antibióticos	432
Métodos de aislamiento de <i>Vibrio</i> en el laboratorio	393	<i>Actinobacillus ureae</i>	434
Caracterización bioquímica e identificación de laboratorio de las especies de <i>Vibrio</i>	394	<i>Actinobacillus hominis</i>	434
GÉNEROS LISTONELLA, PHOTOBACTERIUM Y SHEWANELLA	397	Especies de animales en el género <i>Actinobacillus</i>	434
AEROMONAS Y PLESIOMONAS	397	ESPECIES DE PASTEURELLA Y MANNHEIMIA	434
Género <i>Aeromonas</i>	397	Taxonomía y características del género <i>Pasteurella</i>	434
Taxonomía	397	<i>Pasteurella multocida</i>	436
Importancia clínica	397	Importancia clínica y virulencia	436
Especies de <i>Aeromonas</i> en sanguijuelas medicinales	398	Características de los cultivos e identificación	436
Aislamiento en el laboratorio de especies de <i>Aeromonas</i> a partir de muestras clínicas	398	Sensibilidad a los antibióticos	437
Identificación de laboratorio de especies de <i>Aeromonas</i>	399	Otras especies de <i>Pasteurella</i> aisladas de infecciones humanas	440
Género <i>Plesiomonas</i>	399	<i>Pasteurella pneumotropica</i> ("Actinobacillus pneumotropica")	440
Aislamiento e identificación de laboratorio	399	<i>Pasteurella aerogenes</i> ("Actinobacillus aerogenes")	443
GÉNERO CHROMOBACTERIUM	401	<i>Pasteurella dagmatis</i>	443
		<i>Pasteurella canis</i> y <i>Pasteurella stomatis</i>	443
		<i>Pasteurella bettyae</i>	443
		<i>Pasteurella caballi</i>	444
		<i>Pasteurella gallinarum</i>	444
		Especies de <i>Mannheimia</i> (antes complejo "Pasteurella haemolytica/Pasteurella granulomatis")	444
		CARDIOBACTERIUM HOMINIS	445
		Taxonomía	445
		Importancia clínica	445
		Características de los cultivos e identificación	445
		Sensibilidad a los antibióticos	446
ESPECIES DE HAEMOPHILUS	407	EIKENELLA CORRODENS	446
Taxonomía de <i>Haemophilus</i> y microorganismos relacionados	409	Taxonomía y virulencia	446
<i>Haemophilus influenzae</i>	409	Importancia clínica	447
Vacunas contra <i>H. influenzae</i> tipo b	412	Características de los cultivos e identificación	447
Infecciones causadas por especies de <i>Haemophilus</i>	415	Sensibilidad a los antibióticos	448
Meningitis	415	ESPECIES DE KINGELLA Y SUTTONELLA	449
Epiotitis	416	Taxonomía	449
Otitis media	417	Importancia clínica	449
Sinusitis	417	Características de los cultivos e identificación	450
Bronquitis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica	417	Sensibilidad a los antibióticos	451

ESPECIES HUMANAS DE CAPNOCYTOPHAGA	451	Antecedentes y taxonomía de las especies de <i>Bordetella</i>	487
Taxonomía	451	Epidemiología de la tos ferina	489
Importancia clínica	451	Importancia clínica de <i>Bordetella pertussis</i>	489
Características de los cultivos e identificación	452	Vacunas contra la tos ferina	490
Sensibilidad a los antibióticos	452	Importancia clínica de otras especies de <i>Bordetella</i>	493
ESPECIES CANINAS DE CAPNOCYTOPHAGA	453	<i>Bordetella parapertussis</i>	493
Taxonomía	453	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	493
Importancia clínica	454	<i>Bordetella hinzii</i>	494
Características de los cultivos e identificación	454	<i>Bordetella holmesii</i>	494
Sensibilidad a los antibióticos	454	<i>Bordetella trematum</i>	494
ESPECIES DE DYSGONDOMONAS	455	Aislamiento e identificación de las especies de <i>Bordetella</i>	494
GRUPOS EF-4A y EF-4B DE LOS CDC	456	Muestras y medios de cultivo	494
ESPECIES DE SIMONSIELLA	456	Pruebas de inmunofluorescencia directa	495
STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS	456	Características de los cultivos e identificación	496
Taxonomía	456	Nuevas técnicas para la detección y la identificación de <i>Bordetella pertussis</i>	497
Importancia clínica	457	Pruebas serológicas para el diagnóstico de la tos ferina	498
Características del cultivo e identificación	458	Tratamiento de la tos ferina	499
Sensibilidad a los antibióticos	459	Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de <i>Bordetella</i>	499
ESPECIES DE BRUCELLA	459		
Epidemiología de la brucelosis	459		
Taxonomía de las especies de <i>Brucella</i>	461		
Virulencia de las especies de <i>Brucella</i>	461		
Espectro clínico de la brucelosis	462		
Diagnóstico serológico de la brucelosis	463		
Aislamiento y características de los cultivos	463		
Identificación de especies de <i>Brucella</i>	465		
Tratamiento de la brucelosis	467		
FRANCISELLA TULARENSIS	467		
Epidemiología de la tularemia	467		
Reseña histórica y taxonomía	468		
Virulencia de <i>F. tularensis</i>	469		
Espectro clínico de la tularemia	470		
Aislamiento y características de los cultivos	471		
Diagnóstico serológico de la tularemia	472		
Tratamiento de la tularemia	472		
ESPECIES DE BARTONELLA	474		
Taxonomía y epidemiología de las especies de <i>Bartonella</i>	474		
Importancia clínica de las especies de <i>Bartonella</i>	476		
Fiebre de Oroya y verruga peruana	476		
Fiebre de trinchera "clásica" y "urbana"	477		
Angiomatosis bacilar	477		
Peliosis	478		
Fiebre y bacteriemia	478		
Endocarditis	479		
Enfermedad por arañazo de gato	480		
Otras infecciones	481		
Detección, aislamiento e identificación de especies de <i>Bartonella</i>	481		
Tipos de muestras	481		
Cultivo	482		
Tinción de Gram y morfología de las colonias	482		
Métodos de identificación	482		
Diagnóstico serológico de las infecciones por <i>Bartonella</i>	484		
Sensibilidad a los antibióticos in vitro	486		
ESPECIES DE AFIPIA	487		
Taxonomía e importancia clínica	487		
Aislamiento e identificación	487		
Sensibilidad a los antibióticos	487		
ESPECIES DE BORDETELLA	487		
		CAPÍTULO 10	
		Legionella	523
		TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO	
		LEGIONELLA	524
		ESPECTRO CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO	
		DE LA LEGIONELOSIS	525
		Factores predisponentes	526
		Anatomía patológica y patogenia	526
		ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS	
		DE LA LEGIONELOSIS	527
		Incidencia	527
		<i>Legionellaceae</i> en el medioambiente	527
		Hábitats naturales	527
		Hábitats acuáticos creados por el hombre (artificiales)	527
		Legionelosis en viajeros	528
		Brotos intrahospitalarios de legionelosis	528
		DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	529
		Selección, recolección y transporte de muestras clínicas	529
		Examen directo de muestras clínicas	530
		Exámenes macroscópico y microscópico de materiales teñidos	530
		Examen microscópico de materiales teñidos	530
		Inmunofluorescencia directa (IFD)	530
		Detección de antígeno en orina y líquidos corporales	530
		DETECCIÓN DE LEGIONELLAS EN MUESTRAS CLÍNICAS	531
		Aislamiento de especies de <i>Legionella</i> de muestras clínicas	531
		Biopsia, extirpación quirúrgica y tejido de necropsia	531
		Líquido pleural y aspirados transtraqueales	531
		Procedimiento de descontaminación por lavado ácido para esputo y otras muestras contaminadas	531
		Hemocultivos	532
		Identificación de especies de <i>Legionella</i>	532
		Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	532
		Inmunofluorescencia indirecta	532
		Diagnóstico molecular	534

ESTUDIOS MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL	534
Aislamiento de <i>Legionella</i> de muestras ambientales	534
Tipificación de cepas de <i>Legionella</i>	535

CAPÍTULO 11

Especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis* 539

TAXONOMÍA DE LA FAMILIA NEISSERIACEAE Y DE LA FAMILIA MORAXELLACEAE	541
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO NEISSERIA	542
IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS ESPECIES DE NEISSERIA	546
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	546
Epidemiología	546
Infecciones causadas por <i>N. gonorrhoeae</i>	547
<i>Neisseria meningitidis</i>	550
Epidemiología	550
Infecciones causadas por <i>N. meningitidis</i>	552
Profilaxis meningocócica y vacunas meningocócicas	554
Otras especies de <i>Neisseria</i>	556
IMPORTANCIA CLÍNICA DE MORAXELLA CATARRHALIS	557
AISLAMIENTO DE ESPECIES DE NEISSERIA	559
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	559
Frotis directos teñidos con Gram	559
Recolección de la muestra	560
Transporte de la muestra	560
Medios de cultivos selectivos: inoculación e incubación	562
<i>Neisseria meningitidis</i>	562
Seguridad en el laboratorio	562
Frotis directos teñidos con Gram y pruebas directas para antígenos capsulares	563
Recolección y transporte de la muestra	563
Aislamiento e incubación	564
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEISSERIA	564
Morfología de las colonias	564
Tinción de Gram y prueba de la oxidasa	564
Prueba de Superoxol®	564
Diferenciación de otros microorganismos en medios selectivos	565
Criterios presuntivos para la identificación de <i>N. gonorrhoeae</i>	565
Pruebas de identificación para especies de <i>Neisseria</i>	565
Pruebas de utilización de hidratos de carbono	565
Medio CTA convencional con hidratos de carbono	565
Prueba rápida de utilización de hidratos de carbono	566
Prueba RIM- <i>Neisseria</i> ® (método rápido de identificación de <i>Neisseria</i>)	566
Otros métodos de utilización de hidratos de carbono	566
Pruebas cromogénicas de enzima sustrato	566
Gonocheck II®	566
BactiCard <i>Neisseria</i> ®	567
Métodos inmunológicos para la confirmación de cultivos de <i>N. gonorrhoeae</i>	567
inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales	567
Pruebas de coaglutinación	568
Prueba GenoGen II	568
Sistemas de identificación de multipuebas	568
Prueba de la sonda de DNA para la confirmación del cultivo de <i>N. gonorrhoeae</i>	569
Pruebas de amplificación e hibridación de ácidos nucleicos para <i>N. gonorrhoeae</i>	569

Métodos moleculares para la detección de <i>N. meningitidis</i>	571
CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE ESPECIES DE NEISSERIA	571
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	571
<i>Neisseria meningitidis</i>	574
Otras especies de <i>Neisseria</i>	575
<i>Neisseria lactamica</i>	575
<i>Neisseria cinerea</i>	575
<i>Neisseria flavescens</i>	575
<i>Neisseria subflava</i> Biovariedades, <i>Neisseria mucosa</i> y <i>Neisseria sicca</i>	575
<i>Neisseria polysaccharea</i>	575
Subespecies de <i>Neisseria elongata</i>	576
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> subespecie <i>kochii</i> (" <i>Neisseria kochii</i> ")	576
Especies de <i>Neisseria</i> no humanas y atípicas	576
CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MORAXELLA CATARRHALIS	576
SENSIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE NEISSERIA A LOS ANTIBIÓTICOS	577
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	575
<i>Neisseria meningitidis</i>	578
SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE MORAXELLA CATARRHALIS	580

CAPÍTULO 12

Cocos grampositivos 593

Parte I: Estafilococos y cocos grampositivos relacionados	593
TAXONOMÍA DE LOS ESTAFILOCOCOS Y DE LOS COCOS GRAMPOSITIVOS RELACIONADOS	594
IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS ESTAFILOCOCOS Y DE LOS COCOS GRAMPOSITIVOS RELACIONADOS	595
<i>Staphylococcus aureus</i> subespecie <i>aureus</i>	595
Estafilococos coagulasa negativos	606
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	606
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subespecie <i>saprophyticus</i>	609
Otros estafilococos coagulasa negativos	610
Especies de <i>Micrococcus</i> y géneros relacionados	610
<i>Rothia mucilaginosa</i>	611
AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN PRELIMINAR DE LOS ESTAFILOCOCOS Y DE LOS COCOS GRAMPOSITIVOS RELACIONADOS	611
Frotis directos con tinción de Gram	611
Aislamiento de muestras clínicas	611
Morfología de las colonias	611
La prueba de la catalasa	612
Métodos para la diferenciación de micrococcos y estafilococos	612
Fermentación de la glucosa	612
Sensibilidad a la lisostafina	612
Producción de ácido a partir de glicerol en presencia de eritromicina	613
Sensibilidad a la furazolidona	613
Prueba de la oxidasa modificada	613
Sensibilidad a la bacitracina	613
IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	614
Prueba de la coagulasa en portaobjetos	614

Prueba de la coagulasa en tubo	614	ESTREPTOCOCCOS β-HEMOLÍTICOS DEL GRUPO B	
Procedimientos alternativos para la prueba de la coagulasa	614	(<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>)	649
Aglutinación del látex	614	Factores de virulencia	649
Hemaglutinación pasiva	615	Importancia clínica	650
Pruebas confirmatorias adicionales	616	ESTREPTOCOCCOS β-HEMOLÍTICOS DE LOS GRUPOS C Y G	654
Prueba de la desoxirribonucleasa (DNasa)	616	ESTREPTOCOCCOS β-HEMOLÍTICOS DEL GRUPO F	655
Prueba de la endonucleasa termoestable	616	OTROS ESTREPTOCOCCOS DEL GRUPO DE "COCOS	
Fermentación del manitol	616	PIÓGENOS"	656
Otros métodos para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	616	STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	656
Pruebas rápidas para la detección de resistencia a la meticilina	616	Factores de virulencia	656
Diferenciación de los estafilococos coagulasa positivos de origen veterinario	617	Vacunas antineumocócicas	657
IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASA NEGATIVOS	617	Importancia clínica	658
Métodos de identificación convencionales	617	ESTREPTOCOCCOS VIRIDANS	660
Producción de fosfatasa para la identificación de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	618	GRUPO ANGINOSO: STREPTOCOCCUS ANGINOSUS, STREPTOCOCCUS CONSTELLATUS Y STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS	662
Actividad pirrolidoniil arilamidasa	620	ESTREPTOCOCCOS DEL GRUPO D: EL "COMPLEJO STREPTOCOCCUS BOVIS/STREPTOCOCCUS EQUINUS" Y ESPECIES RELACIONADAS	663
Sensibilidad a la polimixina B	620	ESTREPTOCOCCUS SUI	665
Prueba ornitina descarboxilasa (ODC)	623	OTROS ESTREPTOCOCCOS VIRIDANS AISLADOS EN ANIMALES	666
Producción de ureasa	623	OTROS ESTREPTOCOCCOS	666
Producción de acetoina	623	ESPECIES DE ENTEROCOCCUS	667
Sensibilidad a la deferroxamina	623	Taxonomía	667
Sensibilidad a la novobiocina para la identificación de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	623	Factores de virulencia	667
Sistemas de identificación comerciales	624	Importancia clínica	667
Rapidez Staph	624	Género <i>Melissococcus</i>	671
API Staph-IDENT	624	BACTERIAS "SIMILARES A STREPTOCOCCUS"	671
API Staph	624	Especies de <i>Abiotrophia</i> y de <i>Granulicatella</i>	671
API ID32 Staph	624	Especies de <i>Aerococcus</i> y <i>Halococcus</i>	671
Tarjeta para la identificación de grampositivos Vitek (GPI)	625	Especies de <i>Leuconostoc</i>	672
Panel MicroScan Rapid Pos Combo	625	Especies de <i>Pediococcus</i> y <i>Tetragenococcus</i>	673
Panel MicroScan Pos ID	625	Especies de <i>Gemella</i>	673
Sistema BBL cristal para la identificación de grampositivos (GP)	625	Especies de <i>Vagococcus</i>	674
Sistema Stat 18-R	626	Especies de <i>Allolococcus</i>	674
Staph-Zym	626	Especies de <i>Globicatella</i>	675
Microbact Staphylococcal 12S	626	Especies de <i>Flacklamia</i>	675
Sistema de identificación microbiana	626	Especies de <i>Dolosigranulum</i> , <i>Ignavigranum</i> y <i>Dolosicoccus</i>	675
Sistema de identificación Biolog microPlate	626	Especies de <i>Eremococcus</i>	675
Métodos moleculares para identificación y tipificación de estafilococos	626	Género <i>Lactococcus</i>	675
Identificación de <i>Micrococcus</i> y especies relacionadas	629	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCCOS Y BACTERIAS "SIMILARES A STREPTOCOCCUS"	676
Identificación de <i>Rothia muciflaginosa</i>	629	Frotis directos con tinción de Gram	676
ENFOQUE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCCOS EN EL LABORATORIO	629	Medios de cultivo	676
		Hemólisis en agar sangre	677
		Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β -hemolíticos del grupo A en muestras faríngeas	677
		Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β -hemolíticos del grupo B y <i>Streptococcus pneumoniae</i>	678
		Morfología de las colonias y prueba de la catalasa	679
		Reconocimiento y caracterización preliminar de los estreptococos y las bacterias "similares a <i>Streptococcus</i> "	680
		Identificación presuntiva de estreptococos	680
		Sensibilidad a la bacitracina	680
		Sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol	682
		Prueba de CAMP y producción de pigmento	682
CAPÍTULO 13			
Cocos grampositivos	639		
Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias "similares a <i>Streptococcus</i>"	639		
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ESTREPTOCOCCOS	641		
ESTREPTOCOCCOS β-HEMOLÍTICOS DEL GRUPO A (STREPTOCOCCUS PYOGENES)	641		
Factores de virulencia	641		
Importancia clínica	646		

Hidrólisis de hipurato de sodio	682
Prueba de bills-esculina	684
Prueba de tolerancia a la sal (caldo de NaCl al 6,5%)	684
Prueba de la leucina aminopeptidasa (LAP)	684
Prueba de la pirrolidoniil arilamidasa (PYR)	684
Sensibilidad a la optoquina	684
Prueba de solubilidad en bills	684
Pruebas comerciales de identificación presuntiva	685
Identificación serológica de estreptococos β -hemolíticos	685
Prueba de la precipitina capilar	685
Coagulación	685
Agglutinación del látex	685
Identificación serológica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	685
Características bioquímicas para la identificación de estreptococos agrupables	686
Identificación de los estreptococos viridans	686
Grupo Sanguis	686
Grupo Mitis	688
Grupo Mutans	688
Grupo Salivarius	688
Grupo Anginosus	688
Grupo Bovis	693
Identificación de <i>Streptococcus suis</i> y otros estreptococos aislados en animales	693
Identificación de especies de <i>Enterococcus</i>	693
Identificación de especies de <i>Abiotrophia</i> y <i>Granulicatella</i>	697
Identificación de especies de <i>Aerococcus</i> y <i>Halococcus</i>	697
Identificación de especies de <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> y <i>Tetragenococcus</i>	699
Identificación de especies de <i>Gemella</i>	703
Identificación de especies de <i>Vagococcus</i>	703
Identificación de especies de <i>Allolococcus</i> , <i>Globicatella</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Ignavigranum</i> y <i>Dolosicoccus</i>	706
Identificación de especies de <i>Lactococcus</i>	708
Sistemas comerciales para la identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a <i>Streptococcus</i> " seleccionadas	708
API Rapid Strep	709
Sistema de identificación para grampositivos BBL Crystal	709
Rapid ID 32 Strep	709
Rapid STR	710
Tarjeta de identificación para grampositivos Vitek (GPI)	710
Panel combinado de valor crítico para grampositivos Microscan	710

CAPÍTULO 14

Bacilos grampositivos aerobios y facultativos 728

ESPECIES DE LISTERIA Y LISTERIA MONOCYTOGENES

Taxonomía del género <i>Listeria</i>	729
Factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	730
Epidemiología de <i>L. monocytogenes</i>	731
Importancia clínica de <i>L. monocytogenes</i>	731
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> de muestras clínicas	733
Identificación de especies de <i>Listeria</i>	733
Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento de las infecciones por <i>Listeria</i>	736
Patogenicidad de otras especies de <i>Listeria</i>	736

ESPECIES DE ERYSIPELOTHRIX: ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE Y ERYSIPELOTHRIX TONSILLARUM	736
Taxonomía del género <i>Erysipelothrix</i>	736
Factores de virulencia de <i>E. rhusiopathiae</i>	737
Importancia clínica de <i>E. rhusiopathiae</i>	737
Aislamiento e identificación de <i>E. rhusiopathiae</i>	738
Sensibilidad de <i>E. rhusiopathiae</i> a los antibióticos	738
ESPECIES DE BACILLUS Y GÉNEROS RELACIONADOS	738
Taxonomía y disección taxonómica del género <i>Bacillus</i>	738
<i>Bacillus anthracis</i>	739
Epidemiología del carbunco	739
Factores de virulencia de <i>B. anthracis</i>	740
Presentaciones clínicas del carbunco	740
Tratamiento del carbunco	741
Prevención del carbunco	741
<i>Bacillus cereus</i>	741
Factores de virulencia de <i>B. cereus</i>	741
Gastroenteritis por <i>B. cereus</i>	741
Infecciones oportunistas por especies de <i>Bacillus</i>	742
Bacteriemia y endocarditis	742
Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos	742
Infecciones oculares	743
Infecciones musculoesqueléticas	743
Infecciones hospitalarias	743
Seguridad en el laboratorio, recolección de muestras y procesamiento	743
Aislamiento e identificación de especies de <i>Bacillus</i> : el "grupo <i>Bacillus cereus</i> " (<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. mycoides</i>)	744
Sensibilidad de las especies de <i>Bacillus</i> a los antibióticos	745
ESPECIES DE CORYNEBACTERIUM	746
Introducción y taxonomía	746
Identificación de especies de <i>Corynebacterium</i> y bacterias corineformes	750
Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de <i>Corynebacterium</i> y bacterias corineformes	759
Miembros del género <i>Corynebacterium</i> aislados de seres humanos	759
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	760
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	760
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	769
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	769
<i>Corynebacterium striatum</i>	769
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	770
Especies de <i>Corynebacterium</i> asociadas con animales	770
Especies de <i>Corynebacterium</i> aisladas en los alimentos y el medioambiente	771
OTRAS BACTERIAS CORINEFORMES	771
Especies de <i>Actinobaculum</i>	771
Especies de <i>Actinomyces</i> aisladas en seres humanos	772
Especies de <i>Actinomyces</i> aisladas en los animales	778
Especies de <i>Arcanobacterium</i>	779
Especies de <i>Arrobacter</i>	779
Especies de <i>Brevibacterium</i>	785
Especies de <i>Cellulomonas</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> y <i>Oerskovia</i>	786
Especies de <i>Dermabacter</i>	790
Especies de <i>Exiguobacterium</i>	790
Especies de <i>Laitosonia</i>	790

Especies de <i>Microbacterium</i> (<i>Aureobacterium</i>)	792
Especies de <i>Rothia</i> y "similares a <i>Rothia</i> " (grupo 4 de los CDC)	793
Especies de <i>Turicella</i>	793
GARDNERELLA VAGINALIS	795
Taxonomía y morfología celular	795
Factores de virulencia de <i>G. vaginalis</i>	796
Importancia clínica de <i>G. vaginalis</i>	796
Aislamiento e identificación	797
Sensibilidad a los antibióticos	799
ESPECIES DE LACTOBACILLUS	799
Taxonomía y epidemiología	799
Importancia clínica	799
Aislamiento e identificación	800
Sensibilidad a los antibióticos	801

CAPÍTULO 15

Actinomicetos aerobios 817

INTRODUCCIÓN, CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA	817
GRUPO NOCARDIOFORME	819
<i>Nocardia</i>	819
Epidemiología, anatomía patológica y patogenia	820
Enfermedad clínica	821
<i>Rhodococcus</i>	822
Epidemiología, anatomía patológica y patogenia	822
Enfermedad clínica	822
Otras bacterias nocardioformes	822
MADUROMICETOS Y TERMOMONOSPORAS	823
<i>Actinomyces</i>	822
Epidemiología	822
Enfermedad clínica y anatomía patológica	822
<i>Nocardiosis</i>	823
ESTREPTOMICETOS	823
<i>Streptomyces</i>	823
ACTINOMICETOS TERMÓFILOS	823
OTROS ACTINOMICETOS	824
<i>Oerskovia</i>	824
<i>Dermatophilus</i>	824
<i>Tropheryma whippelii</i>	824
Historia y taxonomía	824
Ecología	824
Enfermedad clínica y anatomía patológica	824
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR ACTINOMICETOS AEROBIOS	825
Aislamiento primario	825
Diferenciación de <i>Nocardia</i> de otros géneros de actinomicetos aerobios	825
Identificación de actinomicetos termófilos	833
Identificación de <i>Tropheryma whippelii</i>	833
Sensibilidad in vitro de <i>Nocardia</i> y bacterias relacionadas a los antibióticos y tratamiento de las infecciones	833

CAPÍTULO 16

Bacterias anaerobias 836

FORMAS DE INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS Y EL OXÍGENO	837
--	-----

Tolerancia al oxígeno	838
Potencial de oxidorreducción	838
HÁBITATS	839
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y NOMENCLATURA	839
INFECCIONES HUMANAS	840
ASLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS	849
Selección de las muestras para cultivo	849
Recolección y transporte de las muestras	849
Hemocultivos para anaerobios (resumen de las pautas para el caldo tradicional y los sistemas instrumentados)	849
Examen directo de los materiales clínicos	850
Selección y uso de los medios	851
SISTEMAS ANAEROBIOS PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS ANAEROBIAS	853
Técnicas de jarras anaerobias	853
Uso de la cámara de anaerobiosis	855
Sistema de capa extendida por rodamiento (roll-streak)	856
Bolsas plásticas anaerobias	856
Uso de la jarra contenedora anaerobia	856
INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS	857
INSPECCIÓN DE LOS SUBCULTIVOS DE COLONIAS	858
PRUEBAS DE AEROTOLERANCIA	859
INFORME PRELIMINAR DE LOS RESULTADOS DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y DE CULTIVO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE AISLADOS ANEROBIOS	859
Identificación presuntiva	859
Uso de medios de agar diferenciales	860
Placas Presumpto	860
Placas de sensibilidad a los antibióticos	862
Caracterización de anaerobios usando pruebas bioquímicas convencionales en tubos grandes	862
Procedimientos alternativos	863
La prueba de Nagler y la prueba de CAMP para <i>C. perfringens</i>	863
Microsistemas comerciales	863
Equipos comerciales para la identificación de anaerobios después de 4 horas de incubación aerobia	863
DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS METABÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GAS-LÍQUIDO	864
Identificación de ácidos grasos volátiles	864
Análisis de ácidos no volátiles	866
Controles de la cromatografía de gas-líquido	866
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS	867
Bacilos gramnegativos no formadores de esporas	870
Clasificación y nomenclatura	870
Identificación preliminar o presuntiva del grupo de <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> y <i>Fusobacterium</i>	870
Identificación de cocos anaerobios	881
Identificación de bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas	882
Especies de <i>Propionibacterium</i>	882
Especies de <i>Bifidobacterium</i>	885
Especies de <i>Lactobacillus</i>	885
Especies de <i>Actinomyces</i>	885
Especies de <i>Eubacterium</i>	886
<i>Mobiluncus</i> y vaginosis bacteriana	886
Otros géneros y especies de bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas	889
Identificación de especies de <i>Clostridium</i>	889

Clostridios histotóxicos involucrados en mionecrosis clostridiana o gangrena gaseosa	889
Otros clostridios en diversos cuadros clínicos	893
<i>Clostridium difficile</i> asociado con enfermedad intestinal	893
Botulismo	895
Tétanos	896
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS A LOS ANTIBIÓTICOS	896
Métodos de evaluación de la sensibilidad de los anaerobios a los antibióticos	897

CAPÍTULO 17

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos 902

RESEÑA HISTÓRICA	903
RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS	903
Variables que intervienen	904
Mecanismos de resistencia	904
Transporte de antibióticos a través de la pared celular y las membranas celulares	906
Antibióticos que interfieren en la formación de las paredes de las células bacterianas: β -lactámicos y glucopéptidos	910
Antibióticos que no actúan sobre la pared celular	918
Interacciones entre los mecanismos de resistencia	919
EL LABORATORIO COMO GUÍA DEL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO	919
PRUEBAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS	924
Indicaciones	924
Elección de la prueba	924
Selección de los antibióticos	924
Estandarización	930
Medio de cultivo	930
pH	930
Suero	930
Concentración de cationes	930
Atmósfera	931
Temperatura	931
Inóculo	932
Antibióticos	932
Control de calidad	932
Garantía de calidad	932
Interpretación de los resultados	932
Selección de los antibióticos para el informe	935
Antibiograma por macrodilución en caldo	935
Antibiograma por dilución en agar	937
Antibiograma por difusión con discos	938
Desarrollo de un procedimiento estandarizado para pruebas de difusión con discos	939
Interpretación de los resultados	939
Control de calidad	942
Limitaciones	942
Antibiograma por microdilución en caldo	943
Sistemas comerciales	945
Vitek® (BioMérieuxVitek, Hazelwood, MO) y MicroScan® (Dade International, West Sacramento, CA)	945
Prueba del epsilómetro (Etest®; AB Biodisk, Suecia)	945

PROBLEMAS ESPECIALES CON LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

β -lactamasas	949
Especies de <i>Staphylococcus</i>	949
Especies de <i>Haemophilus</i>	952
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	952
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	952
Especies de <i>Enterococcus</i>	952
β -lactamasas de espectro ampliado	957
Especies de <i>Staphylococcus</i>	957
Antibióticos β -lactámicos (especies de <i>Staphylococcus</i> resistentes a la oxacilina)	957
Vancomicina	959
Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	960
Fluoroquinolonas	962
Especies de <i>Haemophilus</i>	962
Penicilinas	962
Cloranfenicol	963
Cefalosporinas	963
Trimetoprim-sulfametoxazol	963
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	963
Penicilina y otros antibióticos β -lactámicos	963
Resistencia múltiple	965
Macrólidos y lincosamidas	965
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	965
<i>Neisseria meningitidis</i>	966
Especies de <i>Enterococcus</i>	966
Antibióticos aminoglucósidos	966
Antibióticos β -lactámicos	966
Vancomicina	966
<i>Listeria monocytogenes</i>	968
<i>Streptococcus pyogenes</i> (<i>Streptococcus</i> β-hemolítico del grupo A)	968
Penicilina	968
Eritromicina	968
Fluoroquinolonas	968
<i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>Streptococcus</i> β-hemolítico del grupo B)	968
<i>Streptococcus viridans</i>	968
Otras bacterias grampositivas	968
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en pacientes con fibrosis quística	969
Pruebas de sensibilidad directas	969

CAPÍTULO 18

Micoplasmas y ureaplasmas 975

TAXONOMÍA DE LOS MICOPLASMAS Y LOS UREAPLASMAS

976

FACTORES DE VIRULENCIA DE LOS MICOPLASMAS HUMANOS

979

IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS MICOPLASMAS HUMANOS

980

Mycoplasma pneumoniae

980

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum*

981

Mycoplasma genitalium

986

<i>Mycoplasma fermentans</i>	987	Seguridad en el laboratorio	1020
<i>Mycoplasma penetrans</i>	990	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	1021
<i>Mycoplasma pirum</i>	991	Muestras respiratorias	1021
<i>Mycoplasma primatum</i>	992	Hemocultivos	1021
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	992	Muestras de heces	1022
Infecciones humanas debidas a especies de <i>Mycoplasma</i>		Otras muestras "estériles"	1022
de origen animal	992	PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL	
Especies de <i>Mycoplasma</i> hemotróficas	992	 AISLAMIENTO Y LA IDENTIFICACIÓN	
CULTIVO DE MICOPLASMAS HUMANOS A PARTIR		 DE LAS MICOBACTERIAS	1023
 DE MUESTRAS CLÍNICAS	993	Preparación de las muestras	1023
Consideraciones generales	993	Digestión y descontaminación	1023
Recolección de la muestra	994	Centrifugación	1026
Medios de transporte	994	Muestras de médula ósea y muestras de biopsia	1026
Medios para cultivo de micoplasmas	994	Otras muestras líquidas	1026
Aislamiento e identificación de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	945	Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes	1027
Detección de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> por procedimientos		CULTIVO DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO	
que no utilizan cultivos	996	 DE MICOBACTERIAS	1029
Aislamiento e identificación de los micoplasmas genitales	997	Medios de cultivo	1029
Detección de micoplasmas genitales por procedimientos		Medios de cultivo no selectivos para el aislamiento	
que no utilizan cultivos	998	de micobacterias	1029
Sistemas comerciales de cultivo para <i>Mycoplasma</i>	1000	Medios de Cohen y Middlebrook	1030
Aislamiento de micoplasmas en medios de cultivo		Medios selectivos	1030
de habituales	1000	Incubación	1031
PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO		MÉTODOS RÁPIDOS PARA ESTABLECER UN	
 DE INFECCIONES POR MYCOPLASMA PNEUMONIAE	1001	 DIAGNÓSTICO	1031
PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA LOS MICOPLASMAS		Sensibilidad de los frotis ácido-alcohol resistentes	1031
 GENITALES	1003	Cromatografía gas-líquido y cromatografía líquida de	
SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y TRATAMIENTO		alto rendimiento	1032
 DE LAS INFECCIONES POR MYCOPLASMA	1004	Uso de medio del cultivo en caldo	1032
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES		SISTEMAS DE DETECCIÓN AUTOMATIZADOS	1032
 POR ESPECIES HEMOTRÓFICAS DE MYCOPLASMA EN		Sistema BACTEC AFB	1033
 ANIMALES	1007	Mycobacteria Growth indicator tube (MGIT, tubo	
		indicador de crecimiento de micobacterias) y MGIT 960	1033
		Sistema de detección de micobacterias MB/BacT	1034
		Sistema de cultivo ESP II	1034
		BACTEC MYCO/F LYTIC	1035
		SISTEMAS DE DETECCIÓN MANUALES	1035
		Sistema Septi-Chek AFB	1035
		IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS MEDIANTE	
		 MÉTODOS CONVENCIONALES	1036
		Temperatura óptima para el aislamiento y velocidad	
		de crecimiento	1036
		Producción de pigmento	1037
		Acumulación de niacina	1037
		Reducción de nitratos a nitritos	1037
		Hidrólisis del Tween 80	1037
		Actividad de catalasa	1037
		Actividad de arilsulfatasa	1037
		Actividad de ureasa	1037
		Pirazinamidas	1038
		Captación de hierro	1039
		Inhibición del crecimiento por la hidracida del ácido	
		tiofeno-2-carboxílico	1039
		Crecimiento en cloruro de sodio al 5%	1042
		Crecimiento en agar de MacConkey	1042
		CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS	1042
		Identificación de laboratorio de micobacterias y	
		síndromes clínicos relacionados	1042

CAPÍTULO 19

Micobacterias 1016

TENDENCIAS ACTUALES EN LA TUBERCULOSIS CLÍNICA	1017
Aumento mundial de la incidencia de tuberculosis	1017
Impacto de la coinfección por HIV y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1018
Personas con riesgo de tuberculosis	1018
Enfermedad rápidamente progresiva	1018
Implementación de un control de la infección y medidas	
epidemiológicas más intensivas	1019
TENDENCIAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	
 DE LA TUBERCULOSIS	1019
Uso de técnicas moleculares	1019
Uso de instrumentos automatizados	1019
Uso de medios de cultivo en caldo	1019
Inoculación de muestras clínicas en medios de cultivo	
con base de agar	1019
Uso de <i>p</i> -nitro-acetilamino-hidroxiopropiotenona (NAP)	1020
Aplicaciones de la cromatografía gas-líquido y la	
cromatografía líquida de alto rendimiento	1020
Uso de tubos de hemocultivo con sistema de lisis-	
centrifugación	1020
LABORATORIO CLÍNICO	1020
Optimización de la detección y la identificación	
de micobacterias	1020

Revisión de las especies de <i>Mycobacterium</i>:	
características del laboratorio y correlaciones clínicas	1043
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1043
Fotocromógenos	1045
Escotocromógenos	1047
No fotocromógenos	1051
Especies de crecimiento rápido	1055
Otras micobacterias	1056
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES	1056
Métodos de amplificación de señales	1058
Sondas de ácidos nucleicos	1058
Hibridación in situ	1058
Métodos de amplificación de ácidos nucleicos	1058
Aplicaciones comerciales	1058
Ensayos domésticos de PCR, incluida la PCE en tiempo real	1060
Análisis posamplificación	1061
Hibridación inversa	1061
Secuenciación de DNA	1062
Análisis de micromatrices	1063
Tipificación de cepas y huellas moleculares de DNA	1063
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	1064
TRATAMIENTO A CORTO PLAZO	1067
Recomendaciones de la American Thoracic Society	1068
RESUMEN	1069

CAPÍTULO 20

Infecciones producidas por espiroquetas	1076
--	------

TAXONOMÍA	1076
TREPONEMA	1077
<i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i>	1077
Período de incubación	1077
Sífilis primaria	1078
Sífilis secundaria	1078
Sífilis latente	1078
Sífilis tardía	1078
Epidemiología	1079
Inmunidad	1080
<i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pertenue</i>	1080
<i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>endemicum</i>	1080
<i>Treponema carateum</i>	1081
Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades treponémicas	1081
Pruebas serológicas	1082
Innovaciones: pruebas provisionales y en fase de investigación	1084
BORRELIA	1085
Fiebre recurrente	1085
Epidemiología	1085
Enfermedad clínica	1086
Diagnóstico de laboratorio	1086
Enfermedad de Lyme	1086
Epidemiología	1088
Enfermedad clínica	1090
Diagnóstico de laboratorio	1091
LEPTOSPIRA	1094
Leptospirosis	1094
Epidemiología	1094

Enfermedad clínica	1095
Diagnóstico de laboratorio	1096
SPIRILLUM MINOR (FIEBRE POR MORDEDURA DE RATA)	1097

CAPÍTULO 21

Micología	1102
------------------	------

PACIENTES CON RIESGO DE CONTRAER INFECCIONES MICÓTICAS	1104
Signos y síntomas generales que sugieren infección micótica	1104
CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS INFECCIONES MICÓTICAS	1104
Términos comunes en micología	1105
PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES MICÓTICAS	1106
Recolección y transporte de la muestra	1109
Procesamiento de las muestras	1110
Examen directo	1110
Preparación en fresco para estudio	1110
Selección e inoculación de medios de cultivo	1111
Incubación de los cultivos para hongos	1113
PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE AISLAMIENTOS DE HONGOS	1116
Importancia de la identificación del género o la especie en el laboratorio	1118
Identificación del género y la especie de los principales grupos de hongos	1118
Especies de <i>Zygomycetes</i> y zigomicosis	1118
Histopatología de las infecciones causadas por zigomicetos	1120
HONGOS FILAMENTOSOS HIALINOS E HIALOHIFOMICOSIS	1121
Especies de <i>Aspergillus</i> y aspergilosis	1121
Presentación en el laboratorio	1122
Morfología de las colonias	1123
Características microscópicas	1123
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1123
<i>Aspergillus flavus</i>	1123
<i>Aspergillus niger</i>	1123
<i>Aspergillus terreus</i>	1125
<i>Aspergillus nidulans</i>	1125
Histopatología	1125
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1126
Otros hongos filamentosos hialinos de crecimiento rápido	1129
Características de las colonias	1129
Géneros de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en cadena	1129
Especies de <i>Penicillium</i>	1131
Especies de <i>Paecilomyces</i>	1131
Especies de <i>Scopulariopsis</i>	1131
Identificación de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en racimos	1132
Especies de <i>Acremonium</i>	1132
Especies de <i>Fusarium</i>	1132
Especies de <i>Gliocladium</i>	1133
Especies de <i>Trichoderma</i>	1133
Identificación de los géneros de hialohifomicetos productores de conidios aislados	1134
Especies de <i>Scedosporium</i>	1134

Especies de <i>Chrysosporium</i>	1135	Patrones de crecimiento de las levaduras en agar harina	
Especies de <i>Sepedonium</i>	1136	de maíz	1165
Especies de <i>Beauveria</i>	1136	CHROMagar	1165
IDENTIFICACIÓN DE LOS DERMATÓFITOS	1136	<i>Candida albicans</i>	1167
Identificación de especies de <i>Microsporum</i>	1139	<i>Candida tropicalis</i>	1168
<i>Microsporum canis</i>	1139	<i>Candida parapsilosis</i>	1168
<i>Microsporum gypseum</i>	1140	<i>Candida kefyr (pseudotropicalis)</i>	1168
<i>Microsporum nahan</i>	1140	Otras especies de <i>Candida</i> patógenas emergentes	1168
Identificación de especies de <i>Trichophyton</i>	1140	Especies de <i>Candida</i> y candidiasis	1169
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1140	Especies que producen hifas verdaderas	1170
<i>Trichophyton rubrum</i>	1141	Especies que no producen hifas verdaderas	1170
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1141	Criptococosis y <i>Cryptococcus neoformans</i>	1170
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1142	Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1174
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1142	Otras levaduras de importancia médica que no forman hifas	1174
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1142	<i>Candida (Torulopsis) glabrata</i>	1174
HONGOS DIMORFOS	1143	Especies de <i>Rhodotorula</i>	1174
<i>Blastomyces dermatitidis</i> y blastomycosis	1145	Especies de <i>Saccharomyces</i>	1174
Presentación en el laboratorio	1145	<i>Hansenula anomala</i>	1176
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1146	<i>Malassezia furfur</i>	1176
<i>Coccidioides immitis</i> y coccidioidomicosis	1146	Identificación por el laboratorio de las "levaduras negras"	1176
Presentación en el laboratorio	1148	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1176
<i>Histoplasma capsulatum</i> e histoplasmosis	1148	<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>	1177
Presentación en el laboratorio	1149	Sistemas comerciales para la identificación de levaduras	1178
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1151	Pruebas de sensibilidad a los antimicóticos	
<i>Sporothrix schenckii</i> y esporotricosis	1152	(antifungograma)	1178
Presentación en el laboratorio	1152	DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES MICÓTICAS	1180
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1152		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> y paracoccidioidomicosis	1152		
Presentación de laboratorio	1154		
Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo	1155		
Hongos dematiáceos	1157		
Agentes de la faringomicosis	1158		
Presentación de laboratorio	1158		
Macroconidios con tabiques transversales y longitudinales (muriformes)	1158		
Especies de <i>Alternaria</i>	1158		
Especies de <i>Ulocladium</i>	1158		
Especies de <i>Stemphylium</i>	1158		
Especies de <i>Epicoccum</i>	1159		
Macroconidios con tabiques transversales	1159		
Especies de <i>Bipolaris</i>	1159		
Especies de <i>Drechslera</i>	1159		
Especies de <i>Curvularia</i>	1159		
Especies de <i>Exserohilum</i>	1159		
Macroconidios que nacen de modo individual o per conidiación especial	1159		
Especies de <i>Nigrospora</i>	1160		
Especies de <i>Phoma</i>	1160		
Especies de <i>Chaetomium</i>	1160		
AGENTES DE CROMOMICOSIS Y MICETOMAS	1160		
<i>Cladophialophora (Cladosporium) carrionii</i>	1162		
<i>Phialophora verrucosum</i>	1162		
<i>Phialophora richardsiae</i>	1162		
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	1163		
<i>Exophiala jeanselmei</i>	1163		
IDENTIFICACIÓN POR EL LABORATORIO DE LEVADURAS	1164		
Tubo germinal	1165		
Preparaciones a partir de agar harina de maíz	1165		
		CAPÍTULO 22	
		Parasitología	1191
		RIESGO Y PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS	1194
		MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS	1194
		RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	1195
		Muestras fecales	1195
		Conservación de muestras clínicas	1196
		Examen visual	1196
		Procesamiento de muestras de heces recién emitidas para el examen de huevos y parásitos	1196
		Examen de muestras intestinales no fecales	1200
		Examen de muestras extraintestinales	1201
		Espujo	1201
		Orina y líquidos corporales	1201
		Biopsias y aspirados de tejidos	1201
		Raspados o biopsia de córnea	1201
		Biopsia de músculo	1201
		Sangre	1202
		IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE PARÁSITOS	1202
		Ciclos vitales de parásitos humanos	1203
		PROTOZOOS INTESTINALES	1205
		Amebas intestinales	1205
		Amebiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	1205
		<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba coli</i>	1206
		Diagnóstico serológico de amebiasis	1207

<i>Entamoeba histolytica</i> no patógenas: <i>Entamoeba dispar</i>	1208
Otras amebas intestinales	1209
Protozoos de clasificación incierta	1209
Flagelados intestinales	1210
<i>Giardia lamblia</i>	1210
Otros flagelados intestinales	1213
Ciliados: <i>Balantidium coli</i>	1213
Coccidios	1214
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1214
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	1217
<i>Isospora belli</i>	1218
Especies de <i>Sarcocystis</i>	1218
Filo <i>Microsporium</i>: especies de <i>Microsporidium</i>	1219
NEMATODOS	1220
Ascariasis y <i>Ascaris lumbricoides</i>	1222
Tricocefalosis (<i>Trichuriasis</i>) y <i>Trichuris trichiura</i>	1222
<i>Enterobius vermicularis</i> (oxiuros)	1223
Uncinarias	1224
Estroniloidiasis y <i>Strongyloides stercoralis</i>	1226
Especies de <i>Trichostrongylus</i>	1226
<i>Capillaria philippinensis</i>	1226
CESTODOS	1226
<i>Taenia solium</i> y <i>Taenia saginata</i>	1229
<i>Diphyllobothrium latum</i> : tenia gigante de los peces	1231
Especies de <i>Hymenolepis</i>	1232
<i>Dipylidium caninum</i>	1232
TREMATODOS	1234
Esquistosomas	1234
<i>Fasciola hepatica</i> y fasciolosis boski	1234
<i>Clonorchis sinensis</i>	1236
<i>Paragonimus westermani</i>	1238
PARÁSITOS DE LA SANGRE Y LOS TEJIDOS	1238
Paludismo	1239
Babesia	1243
Hemoflagelados: especies de <i>Leishmania</i> y de <i>Trypanosoma</i>	1244
<i>Leishmaniasis</i> y especies de <i>Leishmania</i>	1244
Tripanosomiasis	1246
Elarias y filariasis	1248
Oncocercosis y <i>Onchocerca volvulus</i>	1250
Dracunculiasis	1251
Dirofilariasis	1252
Infecciones tisulares por protozoos	1253
<i>Toxoplasma gondii</i>	1253
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1257
Infecciones parasitarias por otras larvas tisulares	1257
Triquinosis	1257
Larva migrans visceral	1258
Larva migrans cutánea – <i>Toxocara</i>	1259
Anisakiasis	1259
Gnathostomiasis	1260
Angiostrongiliasis	1260
Hidatidosis (enfermedad hidatídica o equinococosis)	1261
Especies de <i>Multiceps</i> – <i>Cenurosis</i>	1261
Esparganosis: <i>Spirometra mansonioides</i>	1261
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS	1263
FÁRMACOS UTILIZADOS CON FRECUENCIA EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS	1266

CAPÍTULO 23

Diagnóstico de infecciones causadas por virus, *Chlamydia*, *Rickettsia* y microorganismos relacionados

1271

INTRODUCCIÓN

1273

Revisión histórica

1273

Evolución de las técnicas de cultivos celulares

1273

Evolución de los servicios de diagnóstico virológico

1273

Niveles de servicio

1274

TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA

1274

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES**VIRALES**

1277

Ortomixovirus

1277

Paramixovirus

1284

Virus parainfluenza

1284

Virus de la parotiditis

1284

Virus del sarampión

1284

Virus sincitial respiratorio

1288

Otros paramixovirus

1288

Picornavirus

1288

Bhabdovirus

1289

Arenavirus

1289

Ellavirus

1290

Togavirus

1291

Bunyavirus

1291

Virus de la encefalitis de California

1291

Hantavirus

1291

Virus de la gastroenteritis humana

1293

Rotavirus

1293

Calicivirus

1294

Astrovirus

1294

Adenovirus entéricos

1294

Coronavirus

1294

Coltivirus

1294

Retrovirus

1294

Herpesvirus

1299

Virus del herpes simple

1300

Citomegalovirus

1301

Virus de Epstein-Barr

1302

Virus de la varicela-zóster

1303

Herpesvirus humano 6 y 7

1303

Herpesvirus humano 8

1303

Virus B

1303

Adenovirus

1304

Poxvirus

1304

Papovavirus

1305

Virus del papiloma

1305

Virus del polio

1306

Parvovirus

1307

Virus de las hepatitis

1307

Virus de la hepatitis A

1307

Virus de la hepatitis B

1308

Virus de la hepatitis C

1309

Virus de la hepatitis D

1309

Virus de la hepatitis E

1309

Enfermedades causadas por priones (encefalopatías espongiformes transmisibles)

1309

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS INFECCIONES VIRALES	1310	Procedimientos serológicos diversos	1345
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES VIRALES	1312	Diagnóstico de otras infecciones virales	1345
Obtención de muestras para el diagnóstico	1312	Pruebas de sensibilidad a los antivirales	1345
Transporte y conservación de las muestras	1316	INFECCIONES POR ESPECIES DE CHLAMYDIA	1346
Aislamiento de virus en cultivo	1316	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1346
Preparación y mantenimiento de cultivos celulares	1316	Características clínicas y epidemiología	1346
Contaminación de cultivos celulares	1318	Obtención de muestras	1347
Aspectos técnicos de los cultivos celulares	1320	Aislamiento de <i>Chlamydia trachomatis</i> en cultivos celulares	1347
Selección de cultivos celulares para el aislamiento de virus	1321	Detección directa de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras clínicas	1347
Siembra e incubación de cultivos celulares	1323	Diagnóstico serológico	1348
Detección de virus e identificación provisoria	1324	Otros métodos de diagnóstico	1348
Efecto citopático	1324	Diagnóstico de abuso sexual	1348
Hemaglutinación y hemadsorción	1324	<i>Chlamydia psittaci</i>	1348
Microscopía óptica	1326	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1349
Microscopía electrónica	1329	INFECCIONES POR RICKETTSIA, COXIELLA, EHRLICHIA Y ANAPLASMA	1349
Diferenciación bioquímica	1329	<i>Rickettsia y Coxiella</i>	1349
Asociación con las células	1329	Características clínicas y epidemiología	1349
Detección de antígenos virales	1329	Obtención de muestras	1350
Artefactos y alteraciones no causados por virus	1329	Aislamiento de <i>Rickettsia y Coxiella</i> en cultivo	1351
Identificación definitiva de los aislamientos	1331	Detección directa de antígeno y ácido nucleico en muestras clínicas	1351
Conservación de los aislamientos virales	1333	Diagnóstico serológico	1351
Resumen de la detección e identificación de los virus en cultivo	1333	Especies de Ehrlichia y Anaplasma	1351
DETECCIÓN DIRECTA DE VIRUS EN MUESTRAS CLÍNICAS	1334	Apéndice I	1361
Detección de cuerpos de inclusión por microscopía óptica	1334	Apéndice II	1377
Detección de partículas virales con microscopía electrónica	1335	Protocolos	
Detección inmunológica de antígenos virales	1336	Protocolo 1-1 Catalasa	1383
Virus respiratorios	1336	Protocolo 1-2 Prueba de solubilidad en bilis	1383
Virus del grupo herpes	1336	Protocolo 1-3 Prueba de la coagulasa en portaobjetos	1384
Otros virus	1336	Protocolo 1-4 Prueba del indol	1385
Técnicas moleculares	1336	Protocolo 1-5 Prueba de la citocromo oxidasa	1387
Virus de la inmunodeficiencia humana	1337	Protocolo 1-6 Prueba PYR	1388
Virus de la hepatitis C	1338	Protocolo 3-1 Prueba de fijación del complemento (FC)	1388
Virus de la hepatitis B	1338	Protocolo 3-2 Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA)	1390
Virus del papiloma humano	1339	Protocolo 6-1 o-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido	1391
Parvovirus B19	1339	Protocolo 6-2 Reducción de nitratos; aplicaciones generales	1392
Virus del Nilo Occidental	1339	Protocolo 6-3 Rojo de metilo	1393
Virus del herpes simple	1339	Protocolo 6-4 Prueba de Voges-Proskauer	1394
Citomegalovirus	1339	Protocolo 6-5 Utilización del citrato	1396
Enterovirus	1339	Protocolo 6-6 Prueba de la ureasa: convencional	1397
Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG)	1339	Protocolo 6-7 Descarboxilasas	1399
Otras infecciones virales	1340	Protocolo 6-8 Fenilalanina desaminasa	1401
Selección de pruebas para el diagnóstico rápido	1340	Protocolo 7-1 Prueba de oxidación-fermentación (Hugh y Leifson)	1402
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES VIRALES	1340	Protocolo 7-2 Tinción para flagelos	1403
Virus de la inmunodeficiencia humana	1340	Protocolo 7-3 Fluorescencia- desnitrificación	1405
Virus de la hepatitis B y virus de Epstein-Barr	1342	Protocolo 7-4 Prueba de hidrólisis de la esculina	1406
Virus de la hepatitis A	1344	Protocolo 8-1 Prueba CAMP	1408
Virus de la hepatitis C	1344	Protocolo 9-1 Prueba de requerimientos de factor X y V	1409
Parvovirus	1344	Protocolo 11-1 Prueba de utilización rápida de hidratos de carbono para la identificación de especies de <i>Neisseria</i>	1410
Virus del herpes simple	1344	Protocolo 12-1 Prueba de furazolidona con disco	1411
Virus de la varicela-zóster	1344		
Citomegalovirus	1345		
Virus del Nilo Occidental	1345		
Rubéola	1345		
Coronavirus del SRAG	1345		
Anticuerpos IgM	1345		

Protocolo 12-2 Prueba de la novobiocina	1411	Protocolo 19-7 Catalasa a 68°C	1439
Protocolo 13-1 Pruebas de sensibilidad a la bacitracina y SXT	1412	Protocolo 19-8 Desarrollo en agar de MacConkey	1440
Protocolo 13-2 Prueba de la bilisesculina	1413	Protocolo 19-9 Inhibición por la hidrazida del ácido tiófen-2-carboxílico (T₂H₂ 1 µg/mL)	1441
Protocolo 13-3 Prueba de sensibilidad a la optoquina	1414	Protocolo 19-10 Captación de hierro	1442
Protocolo 13-4 Prueba de tolerancia a la sal	1414	Protocolo 19-11 Acumulación de niacina	1442
Protocolo 14-1 Coloración de azul de metileno de Loeffler	1415	Protocolo 19-12 Reducción de nitratos: micobacterias	1444
Protocolo 14-2 Medio con suero de Loeffler	1416	Protocolo 19-13 Pirazinamidasas	1445
Protocolo 14-3 Agar de Tinsdales (modificado por Moore y Parsons)	1417	Protocolo 19-14 Tolerancia al cloruro de sodio: micobacterias	1446
Protocolo 14-4 Agar sangre estina telurito	1418	Protocolo 19-15 Hidrólisis de tween-80	1447
Protocolo 15-1 Hidrólisis de la xantina, hipoxantina, tirosina y caseína	1418	Protocolo 19-16 Ureasa: micobacterias	1448
Protocolo 17-1 Prueba de sensibilidad por difusión con disco (Bauer-Kirby) para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales	1420	Protocolo 19-17 Sonditas de DNA para la identificación de micobacterias	1449
Protocolo 17-2 Realización de las pruebas de sensibilidad por microdilución en caldo con bacterias sin requerimientos nutricionales especiales	1421	Protocolo 19-18 Detección, identificación y pruebas de sensibilidad a fármacos de <i>M. tuberculosis</i> por métodos radiométricos	1451
Protocolo 17-3 Prueba de difusión de gradiente (Etest) para sensibilidad bacteriana	1422	Protocolo 20-1 Microscopia en campo oscuro de lesiones genitales	1453
Protocolo 18-1 Coloración de Diene para la identificación de micoplasmas	1423	Protocolo 20-2 Prueba sérica en portaobjetos del Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)	1454
Protocolo 18-2 Prueba de la hemadsorción para la identificación de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1424	Protocolo 20-3 Prueba rápida de reaginas plasmáticas (RPR) en tarjeta	1457
Protocolo 18-3 Prueba de cloruro manganoso urea para la identificación de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	1424	Protocolo 20-4 Prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS)	1461
Protocolo 18-4 Medio para aislamiento de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1425	Protocolo 22-1 Técnicas de concentración de heces para el aislamiento de parásitos intestinales	1465
Protocolo 18-5 Medio para aislamiento de micoplasmas genitales	1427	Protocolo 22-2 Técnica de tinción tricrómica para frotis de heces	1468
Protocolo 18-6 Prueba de reducción del tetrazolio para la identificación presuntiva de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1428	Protocolo 22-3 Preparación de frotis de sangre de gota fina y de gota gruesa	1469
Protocolo 19-1 Digestión y descontaminación: <i>N</i>-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC)	1429	Protocolo 22-4 Calibración del ocular micrométrico	1471
Protocolo 19-2 Coloraciones con carbolfucsina	1431	Protocolo 22-5 Preparación con cinta adhesiva de celulosa para el examen de oxiuros	1473
Protocolo 19-3 Coloración fluorescente: auramina O; auramina-rodamina	1432	Protocolo 23-1 Prueba de hemadsorción	1474
Protocolo 19-4 Prueba NAP (<i>p</i>-nitro-α-acetilamino-β-hidroxipropiofenona); (BACTEC)	1434	Diagrama A-1 Fórmulas de conservantes de heces usados habitualmente	1475
Protocolo 19-5 Arilsulfatasa	1436		
Protocolo 19-6 Determinación de la fotorreactividad de las micobacterias	1437		

Láminas en color

Índice analítico

[I-1](#)

Lista de láminas en color

Láminas en color 1-1

Evaluación por tinción de Gram de frotis de esputo

Láminas en color 1-2

Diversas coloraciones utilizadas en microbiología

Láminas en color 1-3

Identificación presuntiva de bacterias basada en la observación de la morfología celular en preparaciones de frotis teñidos

Láminas en color 1-4

Dificultades y artefactos en la tinción de Gram

Láminas en color 1-5

Identificación presuntiva de las bacterias basada en la observación de la morfología de las colonias

Láminas en color 6-1

Identificación presuntiva de *Enterobacteriaceae*

Láminas en color 6-2

Aspecto de las colonias de *Enterobacteriaceae* en agares de MacConkey y EMB

Láminas en color 6-3

Aspecto de *Enterobacteriaceae* en placas de agar XLD y HE

Láminas en color 6-4

Características diferenciales de *Enterobacteriaceae*

Láminas en color 6-5

Peste humana

Láminas en color 6-6

Sistemas de identificación comerciales

Láminas en color 7-1

Características importantes para distinguir los bacilos gramnegativos no fermentadores

Láminas en color 7-2

Pruebas utilizadas en la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores

Láminas en color 7-3

Morfología de las colonias y microscópica de algunos bacilos no fermentadores

Láminas en color 7-4

Morfología de las colonias y microscópica de algunos bacilos no fermentadores (*continuación*)

Láminas en color 7-5

Morfología de las colonias y microscópica de algunos bacilos no fermentadores (*continuación*)

Láminas en color 8-1

Identificación de laboratorio de especies de *Campylobacter*

Láminas en color 8-2

Identificación de laboratorio de *Vibrio cholerae* y otras especies de *Vibrio*

Láminas en color 9-1

Identificación de especies de *Haemophilus*

Láminas en color 9-2

Identificación de especies de *Haemophilus* (continuación)

Láminas en color 9-3

Especies de *Actinobacillus*, *Cardiobacterium* y *Eikenella*

Láminas en color 9-4

Especies de *Kingella*, *Capnocytophaga* y *Dysgonomonas*

Láminas en color 9-5

Especies de *Pasteurella*, *Brucella* y *Bordetella*

Láminas en color 10-1

Diagnóstico de laboratorio de la legionelosis

Láminas en color 11-1

Identificación de especies de *Neisseria*

Láminas en color 11-2

Identificación de especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*

Láminas en color 12-1

Identificación de estafilococos y especies relacionadas

Láminas en color 12-2

Identificación de estafilococos

Láminas en color 12-3

Identificación de estafilococos (continuación)

Láminas en color 13-1

Identificación de estreptococos

Láminas en color 13-2

Identificación de estreptococos y enterococos

Láminas en color 13-3

Identificación de estreptococos y enterococos y bacterias similares a estreptococos

Láminas en color 13-4

Identificación de enterococos y estreptococos del grupo Viridans

Láminas en color 14-1

Especies de *Listeria* y *Erysipelothrix*

Láminas en color 14-2

Especies de *Erysipelothrix* y *Bacillus*

Láminas en color 14-3

Especies de *Corynebacterium*

Láminas en color 14-4

Especies de *Corynebacterium* (continuación)

Láminas en color 14-5

Especies de *Corynebacterium* (continuación)

Láminas en color 14-6

Especies de *Corynebacterium*, *Arcanobacterium* y *Brevibacterium*

Láminas en color 14-7

Especies de *Rothia*, *Cellulosimicrobium*, *Cellulomonas/Microbacterium* y *Lactobacillus*

Láminas en color 14-8

Especies de *Lactobacillus* y *Gardnerella*

Láminas en color 15-1

Identificación de bacilos grampositivos aerobios y anaerobios facultativos

Láminas en color 16-1

Identificación de bacterias anaerobias: bacilos gramnegativos

Láminas en color 16-2

Identificación de bacterias anaerobias: microorganismos grampositivos no formadores de esporas

Láminas en color 16-3

Identificación de bacterias anaerobias: clostridios

Láminas en color 16-4

Identificación de bacterias anaerobias: clostridios (*continuación*)

Láminas en color 16-5

Identificación de bacterias anaerobias: uso de placas cuadrantes Presumpto y discos en agar sangre para anaerobios

Láminas en color 18-1

Micoplasmas y ureaplasmas

Láminas en color 19-1

Identificación de laboratorio de *Mycobacterium tuberculosis*

Láminas en color 19-2

Identificación de laboratorio de especies de *Mycobacterium* distintas de *M. tuberculosis*

Láminas en color 19-3

Manifestaciones clínicas de algunas enfermedades micobacterianas

Láminas en color 20-1

Diagnóstico de laboratorio de enfermedades producidas por espiroquetas

Láminas en color 21-1

Morfología de las colonias de especies de *Zygomycetes* y especies seleccionadas de *Aspergillus*

Láminas en color 21-1

Morfología de las colonias de hongos filamentosos hialinos aislados con frecuencia

Láminas en color 21-3

Morfología de las colonias de hongos filamentosos dematiáceos aislados

Láminas en color 21-4

Morfología de las colonias de dermatófitos

Láminas en color 21-5

Morfología de las colonias de hongos dimorfos

Láminas en color 21-6

Morfología de las colonias de levaduras aisladas con frecuencia

Láminas en color 22-1

Artificios: "Nadie conoce los escombros que yo he visto"

Láminas en color 22-2

Amebas/flagelados intestinales

Láminas en color 22-3

Flagelados

Láminas en color 22-4

Coccidios

Láminas en color 22-5

Nematodos

Láminas en color 22-6

Cestodos

Láminas en color 22-7

Trematodos

Láminas en color 22-8

Plasmodium

Láminas en color 22-9

Babesiosis/leishmaniasis/tripanosomiasis

Láminas en color 22-10

Filarias

Láminas en color 22-11

Parásitos risulares

Láminas en color 23-1

Inclusión viral

Láminas en color 23-2

Diagnóstico de infecciones causadas por virus,
Chlamydia y *Ehrlichia*

Láminas en color A-1

Identificación de garrapatas

Láminas en color A-2

Identificación de garrapatas y otros artrópodos

Láminas en color A-3

Identificación de otros artrópodos

Introducción a la microbiología

Parte I: El papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas: guía para la práctica y el tratamiento

Introducción

Lineamientos del libro

El mundo de las enfermedades
infecciosas

La tríada de las enfermedades infecciosas

El agente infeccioso

Clases de agentes infecciosos

Interacciones entre huéspedes y agentes
infecciosos

Función de los agentes infecciosos
en la naturaleza

Virulencia

El ambiente

El huésped infectado

Defensa humoral innata (no celular)

Defensa celular innata

Tipos de inflamación

Defensa celular inmunitaria adaptativa

Defensa no celular inmunitaria adaptativa
(humoral)

Signos y síntomas clínicos de infección

Efectos indirectos de los agentes
infecciosos en seres humanos

Fases del ciclo diagnóstico

Fase preanalítica

Recolección de la muestra

Transporte de la muestra

Recepción de la muestra y observaciones
preliminares

Criterios para el rechazo de las muestras

Relación costo-eficacia en la fase
preanalítica

Fase analítica

Examen microscópico

Procesamiento de las muestras

Interpretación de los cultivos

Procedimientos para la identificación
preliminar de las bacterias aisladas

Identificación de microorganismos
diferentes de las bacterias

Antibiograma

Relación costo-eficacia en la fase analítica

Fase posanalítica

Informe de los resultados

Interacción con los epidemiólogos

Análisis de los resultados

Conservación de las muestras
y de los registros

Aspectos administrativos del laboratorio de microbiología

Regulación estatal

Gestión de riesgos

Seguridad del laboratorio

Normas y reglamentaciones generales de seguridad

Precauciones habituales de seguridad

Agentes biológicos

Precauciones universales

Envío de muestras y de agentes etiológicos

Peligros no biológicos

Bioterrorismo

Aseguramiento de la calidad

Control de calidad

Componentes de un programa de control de calidad

Control de los aparatos del laboratorio

Control de los medios de cultivo, reactivos e insumos

Introducción

Lineamientos del libro

Hay casi tantas formas de observar el mundo de las enfermedades infecciosas como cantidad de agentes que las provocan. En este libro nos centraremos en la detección e identificación de los agentes infecciosos en el laboratorio clínico, seguido de la determinación de la sensibilidad a los antibióticos cuando corresponda. Desde el punto de vista conceptual, el libro se divide en tres secciones. Los primeros dos capítulos cubren los principios generales de las enfermedades infecciosas y el laboratorio diagnóstico. En la segunda sección, se presentan las técnicas inmunológicas y moleculares que tienen aplicación casi universal. Por último, la tercera y más amplia sección es un extenso análisis de los grupos de agentes infecciosos y las enfermedades que generan. En un capítulo separado se explican los principios generales de la bacteriología debido a la diversidad de los organismos en este gran grupo de patógenos humanos.

El mundo de las enfermedades infecciosas

Durante la mayor parte de la existencia de la humanidad, las enfermedades infecciosas han sido la causa predominante de enfermedad y de muerte, que no sólo han restringido el bienestar de las personas sino que, además, han cercenado la prosperidad social. Recién en el siglo XX las mejoras en las condiciones de vida, la sanidad y las intervenciones médicas lograron que las sociedades desarrolladas emergieran de la devastación provocada por las enfermedades infecciosas. Lamentablemente, los beneficiarios de estos progresos se concentraron en los países más ricos. El desafío para la comunidad mundial es hacer extensivos estos logros a todo el género humano.

Hacia la década de 1950, los avances de la medicina moderna y de la salud pública parecían tan impresionantes que muchos científicos prominentes se vieron impulsados a predecir el control de las enfermedades infecciosas y la erradicación de plagas como causas de miseria en toda la Tierra. William H. Stewart, un cirujano general de los Estados Unidos, afirmó en 1969: "Es tiempo de concluir el capítulo de las enfermedades infecciosas". Es lamentable que muchos hombres sabios subestimaran la capacidad de adaptación de las diversas y numerosas formas de vida que comparten el planeta con nosotros,

tanto agentes infecciosos como depredadores; por ejemplo, los artrópodos. Tampoco pudieron vislumbrar las consecuencias negativas inesperadas de los principales avances médicos que prolongan la vida, a veces con efectos devastadores sobre los mecanismos de defensa del huésped. Lejos estuvieron también de apreciar los efectos de la incursión humana en el medioambiente o las consecuencias de los desplazamientos irrestrictos de plantas y animales, incluidos los seres humanos, alrededor del mundo. Como resultado, la lista de nuevas enfermedades infecciosas o de enfermedades reactivadas que han resultado una plaga para la humanidad a partir de aquellas predicciones erróneas es larga y sigue creciendo. En el cuadro 1-1 se presenta una enumeración parcial.

La tríada de las enfermedades infecciosas

Para entender las enfermedades infecciosas el estudiante debe considerar las interacciones entre las tres partes que intervienen:

1. **El huésped infectado.** Este huésped será casi siempre un ser humano, en nuestra perspectiva antropocéntrica. Los veterinarios se ocuparán de los huéspedes animales, mientras que un botánico se ocupará de las plantas. El huésped infectado puede, incluso, ser un agente infeccioso.
2. **Un agente infeccioso.** Esta designación es la descripción más amplia para diversas formas de vida que interactúan íntimamente con otras.
3. **El ambiente.** El ambiente natural, inanimado y animado, es esencial para el mantenimiento de la mayoría de los agentes infecciosos y para su transmisión de un huésped a otro.

Una entretenida y muy educativa visión de estas relaciones que merece la pena leer ha sido presentada por E. W. Konecny,³⁴ en *El otro extremo del microscopio: las bacterias cuentan su historia*, donde el autor hace un relato fantástico sobre una asamblea de bacterias que se reunieron para exponer sus quejas respecto del "giro" que los seres humanos impusieron a sus relaciones y pone "patas arriba" nuestra visión tradicional del mundo.

Cedric Mims, el distinguido microbiólogo británico, preparó un relato más tradicional, también muy interesante, sobre la

Cuadro 1-1 Enfermedades infecciosas recién reconocidas y patógenos identificados desde la "conquista de las enfermedades infecciosas"^a

AÑO	AGENTE	ENFERMEDADES
1977	Virus Ébola	Fiebre hemorrágica del Ébola
	Especies de <i>Legionella</i>	Enfermedad de los legionarios
	Virus Hantani	Fiebre hemorrágica con síntomas renales
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis
1982	<i>Escherichia coli</i> 0157 (productora de verotoxina)	Colitis hemorrágica; síndrome urémico hemolítico
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Enfermedad de Lyme
1983	<i>Helicobacter pylori</i>	Úlcera gástrica/duodenal
	Virus de la inmunodeficiencia humana	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
1989	Virus de la hepatitis C	Hepatitis no A, no B
1991	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiosis monocítica humana
	Virus Guarín	Fiebre hemorrágica venezolana
1993	Virus Sin nombre	Síndrome pulmonar por hantavirus
	<i>Bartonella henselae</i>	Enfermedad del arañazo de gato; angiomatosis bacilar
1994	Herpesvirus humano 8	Sarcoma de Kaposi
	<i>Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum</i>	Anaplasmosis (ehrlichiosis) granulocítica humana
1995	Virus Hendra	Enfermedad respiratoria; meningoencefalitis
1996	Lyssavirus australiano	Rabia humana
1997	Virus influenza H5N1	Gripe aviar en seres humanos
1999	Virus Nipha	Enfermedad respiratoria; meningoencefalitis
	Virus influenza H9N2	Nueva variante de la gripe aviar en seres humanos
2001	Metapneumovirus humano	Enfermedad respiratoria
2003	Coronavirus del SARS	Síndrome respiratorio agudo grave

^a Con las contribuciones de Joseph McDade.

dilucidación de las complejas interconexiones entre los seres humanos y los agentes infecciosos. Esta obra ha sido actualizada por sus colegas y es un excelente modo de explorar el fascinante tema de la patogenia.⁶⁹

El agente infeccioso

CLASES DE AGENTES INFECCIOSOS

Los agentes infecciosos pueden dividirse en un número finito de tipos. La mayoría de ellos viven en forma libre, contienen todo lo necesario para el mantenimiento de su especie y son conocidos como **microbios**. Los agentes infecciosos tradicionales son las bacterias, los hongos, los parásitos y los virus.

1. Las **bacterias** comprenden el mayor número de especies patógenas para los seres humanos. Son organismos unicelulares y contienen DNA y RNA, pero no están diferenciadas en núcleo y citoplasma; se reproducen por fisión binaria. Existen unas pocas familias de bacterias que carecen de algunas estructuras necesarias para la replicación y deben interactuar con la célula del huésped para reproducirse, las más sobresalientes son *Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae* y *Chlamydiaceae*.
2. Los **hongos** son agentes unicelulares o multicelulares que presentan un núcleo y un citoplasma definidos. Las **levadu-**

ras son hongos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. Los **mohos** u **hongos filamentosos** son organismos multicelulares más complejos que se reproducen en forma sexual y asexual. Algunos hongos tienen fases levaduriforme filamentosos y se denominan hongos dismórficos.

3. Los **parásitos** son un grupo grande y complejo de microbios. Entre ellos se incluyen los animales unicelulares, como los protozoos, y los organismos multicelulares muy complejos que tienen órganos y tejidos bien definidos, como el tracto gastrointestinal y los sistemas genitales. Algunos de estos parásitos son, en efecto, pequeños animales. Otros, por lo general los protozoos, carecen de las estructuras necesarias para una reproducción independiente y deben obtener del huésped las sustancias que necesitan.
4. Los **virus** comprenden un gran número de agentes infecciosos que, hablando estrictamente, no son microbios porque carecen del equipamiento genético completo para su propia propagación. Salvo raras excepciones contienen DNA o RNA, pero no ambos. Por lo tanto, deben infectar otra forma de vida, como seres humanos, animales, plantas, bacterias e incluso, otros virus. Representan la forma más simple de un agente infeccioso. Los microbios se reproducen por multiplicación; después de la división de su material genético se dividen en dos formas nuevas idénticas. Por el contrario, los virus se reproducen por replicación, hacen copias de sus áci-

dos nucleicos, luego de lo cual los nuevos genomas se empaquetan en forma individual dentro de los límites de la célula infectada.

Además de los agentes infecciosos tradicionales, miembros más evolucionados del reino animal, como los insectos, pueden considerarse una forma de parásitos si su existencia está relacionada en forma íntima con un huésped. En el otro extremo, los **priones**, completamente no convencionales, no contienen ácidos nucleicos y, por consiguiente, no pueden replicarse de acuerdo con las leyes establecidas de la naturaleza. No obstante, su estructura proteica anormal deriva en un proceso similar a una infección con un ciclo de replicación.

INTERACCIONES ENTRE HUÉSPEDES Y AGENTES INFECCIOSOS

Si un agente infeccioso y su huésped coexisten y ninguno de ellos se beneficia o se perjudica, el proceso se denomina **comensalismo** y el agente, **comensal**.

Si el agente infeccioso obtiene un beneficio de su huésped, pero no le causa daño, el agente infeccioso se denomina **saprófito**. Si el agente infeccioso y el huésped obtienen un beneficio del encuentro, el proceso se denomina **simbiosis** o **mutualismo**.

Por otro lado, si el huésped es dañado por el agente infeccioso con beneficio de este último el proceso se denomina **parasitismo** y el agente infeccioso, **parásito** (un uso general de la palabra más allá de la clase de los agentes infecciosos conocidos como parásitos). Todos los tipos de agentes infecciosos pueden ser parásitos.

Cuando los microorganismos viven en la superficie externa (piel o cabello) o interna (vías respiratorias altas y tubo digestivo) del cuerpo, se describen como **flora colonizante**. La relación entre la flora colonizante y el huésped puede ser comensal, saprófita o parásita. Incluso, puede cambiar de un momento a otro si se altera la virulencia del microbio o disminuye la capacidad de resistencia del huésped a la infección.

Un microorganismo capaz de ocasionar infecciones se denomina **patógeno**. Si el microbio produce enfermedad en forma ocasional, es un **patógeno potencial**. Un patógeno potencial se describe como un **agente oportunista** si produce infecciones sólo en las personas que tienen comprometidos los mecanismos de defensa.

Los agentes infecciosos también establecen numerosos tipos de relaciones con sus huéspedes a nivel celular. Los microbios de vida libre (algunas bacterias, los hongos y los parásitos) exis-

ten en forma extracelular y pueden crecer *in vitro* en ausencia de células. Los microbios intracelulares facultativos pueden crecer *in vitro* en ausencia de células; *in vivo* crecen en forma intracelular o extracelular, pero a menudo tienen una relación especial con los macrófagos. Los agentes infecciosos intracelulares estrictos carecen de algunas estructuras necesarias para una vida extracelular; por eso requieren una célula huésped que les suministre los elementos requeridos. Estas relaciones se resumen en el cuadro 1-2.

FUNCIÓN DE LOS AGENTES INFECCIOSOS EN LA NATURALEZA

Aunque las víctimas de los efectos nocivos de los agentes infecciosos tengan una visión diferente, éstos no tienen la función de hacer penosa la vida de los seres humanos. Las bacterias son carnívoras y un componente esencial en la degradación de los tejidos muertos. Además, desempeñan un papel principal en muchas reacciones químicas en la naturaleza y han sido utilizadas para tareas tan desagradables como la descontaminación de los derrames tóxicos.

Por el contrario, los hongos son vegetarianos. Cumplen una función principal en la eliminación de la vegetación en descomposición. Nadie a quien le guste el pan, la cerveza, el vino o el queso necesita que le recuerden la importancia de las levaduras en nuestra sociedad. Y, por supuesto, los hongos superiores sirven como fuente de alimento, desde los champiñones hasta las trufas.

VIRULENCIA

La virulencia es la suma de las características que le dan al agente infeccioso una ventaja en la batalla contra sus huéspedes elegidos (o víctimas). No es un fenómeno de todo o nada; existen grados muy variables de virulencia. La mayoría de los análisis sobre la virulencia se centran en los factores microbianos, pero, en realidad, lo más importante es el balance entre los tres miembros de la tríada.¹¹

El organismo más virulento no causará enfermedad si no tiene acceso a un huésped vulnerable debido a una de estas dos razones:

1. El organismo existe en un compartimento ambiental diferente del huésped potencial. Después de que se interrumpió el ciclo del virus de la fiebre amarilla en los mosquitos urbanos, la transmisión de la enfermedad se detuvo hasta que los

Cuadro 1-2 Relaciones entre los agentes infecciosos y sus huéspedes a nivel celular

RELACIÓN	AGENTES INFECCIOSOS	EJEMPLOS
Independencia	La mayoría de las bacterias, hongos y parásitos	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , protozoos, helmintos
Intracelulares facultativos	Ciertas bacterias, micobacterias, ciertos hongos	<i>Legionella</i> , <i>Brucella</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , hongos dismórficos
Intracelular estricto	Ciertas bacterias, hongos y protozoos; virus	<i>Rickettsia</i> , <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , virus influenza

seres humanos ingresaron en un ciclo de fiebre amarilla, hasta entonces desconocido, con especies de mosquitos que vivían en la selva.

2. Todos los huéspedes disponibles han desarrollado una inmunidad protectora. Por ejemplo, muchas infecciones virales que generan inmunidad protectora, como la del virus del sarampión, se "consumen" luego de que todas las personas susceptibles han sido infectadas. Sólo después de que crezca una nueva generación de individuos no infectados, y por lo tanto vulnerables, puede ocurrir una nueva epidemia.

Por el contrario, un organismo que no causa enfermedad o que lo hace sólo en forma leve en personas inmunocompetentes (esencialmente de baja virulencia) puede provocar una enfermedad devastadora en alguien cuyo sistema inmunitario esté comprometido.

Se podría argumentar que los agentes infecciosos más exitosos son los que tienen las mejores estrategias de supervivencia, que incluyen una virulencia mínima o ausente. Sobre todo para los patógenos intracelulares estrictos, un agente que destruya rápidamente a su huésped pronto quedará excluido. Como ejemplo, se ha establecido una hipótesis acerca de que el virus de Epstein-Barr está diseñado para permanecer en los linfocitos de memoria y ha desarrollado estrategias para reducir los efectos negativos sobre su huésped.¹⁰³

Sin embargo, un organismo puede ser virulento para su huésped humano, pero sobrevivir porque tiene una relación permisiva con otros huéspedes. En otras palabras, los seres

humanos pueden infectarse en forma letal, pero otros huéspedes vertebrados pueden no enfermarse o hacerlo sólo de manera leve.

La virulencia puede ser el resultado de factores que virtualmente operan en cualquier etapa del proceso infeccioso. Si se piensa en términos más amplios, la virulencia debe incluir características más allá de las que propician el desarrollo de la enfermedad en un huésped infectado. En el cuadro 1-3 se resumen algunos ejemplos. Los lectores que deseen información más detallada pueden encontrar referencias excelentes.^{36,41,53,55,62,100,101}

El ambiente

El espectro de huéspedes de algunos agentes infecciosos se limita a los seres humanos. El mantenimiento de estos organismos requiere el acceso a un nuevo huésped vulnerable y la capacidad de sobrevivir durante la transferencia. Por lo tanto, los factores ambientales son relativamente de poca importancia.

No obstante, la mayoría de los agentes infecciosos tienen una fase en la cual viven libres en el medioambiente, infectan huéspedes no humanos o pasan a través de un vector, casi siempre un artrópodo, entre varios huéspedes vertebrados. Algunas de estas interacciones pueden ser extremadamente complejas, con múltiples transferencias a través de diferentes fases del ambiente; por ejemplo, los numerosos estadios de desarrollo de un parásito en una serie de huéspedes animales.

El ambiente es el vínculo entre el agente infeccioso y el huésped final. La transferencia a un nuevo huésped requiere

Cuadro 1-3 Factores de virulencia seleccionados

CATEGORÍA	FACTOR DE VIRULENCIA	EJEMPLO
Supervivencia en el medioambiente	Replicación intracelular en anfitriones de vida libre	Especies de <i>Legionella</i>
	Resistencia a la desecación	Virus de la viruela
Transferencia/transmisión eficaz	Formas móviles que pueden buscar un huésped sensible	Cercaria de esquistosoma
	Adequación a un vector que puede transmitir la infección	<i>Rickettsia rickettsii</i> en las garrapatas
Evasión de las defensas del huésped	Lisis de células polimorfonucleares inflamatorias	Leucocidinas de <i>Streptococcus pyogenes</i>
	Destrucción de tejidos	Proteasas de <i>Pseudomonas</i> sp.
	Destrucción de tejidos	Invasión de los vasos sanguíneos por <i>Aspergillus fumigatus</i>
	Destrucción de linfocitos	Virus de la inmunodeficiencia humana
	Modulación antigénica para subvertir la inmunidad humoral (anticuerpos)	Deriva y cambio antigénico cíclico de <i>Borrelia recurrentis</i>
	Localización intracelular en macrófagos	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Confinamiento en un sitio inaccesible	Localización intracelular en neuronas de los ganglios espinales	Virus varicela-zóster o virus herpes simple
Resistencia a los antibióticos	Resistencia a los desinfectantes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y antisépticos
	Resistencia a los fijadores	Priones y formaldehído
	Resistencia a los agentes antiinfecciosos	<i>Staphylococcus aureus</i> y meticilina
	Resistencia a los agentes antivirales	Virus de la inmunodeficiencia humana; citomegalovirus

Cuadro 1-4 Vías de transmisión y puertas de entrada comunes de los agentes infecciosos

FUENTE DEL AGENTE	MECANISMO DE ENTRADA	PUERTA DE ENTRADA	EJEMPLO
Ser humano infectado	Aerosoles	Respiratoria	Virus influenza
Ser humano infectado	Contacto directo	Cutánea	Virus del herpes simple en los luchadores
Ser humano infectado	Relaciones sexuales	Genital	Sífilis; gonorrea
Ser humano infectado o paciente	Secreciones orales o nasofaríngeas hacia el ojo	Ocular	Conjuntivitis bacteriana o viral
Ser humano infectado	Transfusión de productos de la sangre	Intravascular	Virus de la hepatitis
Ambiente contaminado	Alimentos o agua	Gastrointestinal	Patógenos entéricos bacterianos y virales
Ambiente contaminado	Acondicionadores de aire	Respiratoria	Enfermedad de los legionarios
Animal infectado	Mordeduras de animales	Cutánea	Rabia
Garrapata infectada	Picadura de garrapatas	Cutánea	Enfermedad de Lyme
Paciente	Aspiración de la flora endógena	Respiratoria	Neumonía bacteriana
Paciente	Diseminación de la flora intestinal a través de la pared intestinal dañada	Gastrointestinal	Peritonitis bacteriana
Paciente	Migración de las bacterias desde la orofaringe hacia el oído medio a través de la trompa de Eustaquio	Oído	Otitis media bacteriana

una puerta de entrada. En el cuadro 1-4 se resumen las vías de transmisión y las puertas de entrada más comunes. En el recuadro 1-1 se definen algunos de los términos utilizados para describir enfermedades infecciosas en la población.

El huésped infectado

Una vez que un individuo ha sido infectado, se producen diversas respuestas en el huésped. La respuesta puede ser localizada en el sitio de la infección o generalizada (sistémica). La reacción local a la infección toma la forma de inflamación. **Inflamación** es un término general que hace referencia a la

alteración anormal de los tejidos u órganos causada por el daño o la destrucción del tejido. La inflamación tiene componentes inmunitarios y no inmunitarios. En cada caso, la defensa puede ser celular o no celular (humoral). El sufijo “-itis” se utiliza para indicar inflamación; cuando se lo asocia con un sitio anatómico, describe un proceso de enfermedad. Por ejemplo, la apendicitis es un proceso inflamatorio que afecta el apéndice, mientras que la hepatitis es la inflamación del hígado y la endocarditis es la inflamación del endocardio (el revestimiento de las cámaras del corazón).

La inmunidad innata y la inmunidad adaptativa son los dos brazos principales de la respuesta inmunitaria.^{104,27,28,65} La respuesta innata es la más primitiva de ambas. Proporciona una respuesta inmediata contra los microbios invasores, sin tener en cuenta su carácter inmunitario. Los receptores que hacen contacto entre el invasor y la célula defensora son compuestos denominados lectinas que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. La respuesta innata está limitada por la falta de un sistema de amplificación de defensas específicas. En su lugar, las defensas innatas envían señales que activan el segundo brazo: la inmunidad adaptativa. Para utilizar una analogía militar, la respuesta inmunitaria innata es comparable con una patrulla de frontera con poca dotación de armamentos que envía señales a los rangos superiores del ejército regular cuando detecta que un invasor ha cruzado los límites nacionales.

La respuesta inmunitaria adaptativa es inmunológicamente específica. Responde a componentes que detecta como no propios o “extraños” mediante la multiplicación del número de defensores con armas específicas dirigidas contra un determinado enemigo. Es decir, se adapta para combatir contra una amenaza muy definida, en vez de reaccionar en forma universal a todas las amenazas. Una vez que se activó, la respuesta inmunitaria adaptativa sirve como misión de control para el resto de la campaña hasta la victoria, la derrota u, ocasionalmente, un empate.

Recuadro 1-1 Categorías de las enfermedades infecciosas

- Enfermedad transmisible:** afección que un individuo puede adquirir de una fuente externa, animada o inanimada.
- Enfermedad contagiosa:** afección que puede ser transmitida de un paciente a otro.
- Infección iatrogénica:** infección que se produce como consecuencia de la intervención médica.
- Enfermedad infecciosa:** afección causada por un agente externo que se replica o multiplica.
- Infección intrahospitalaria:** infección que se adquiere en un centro de salud.
- Infección oportunista:** infección en un paciente con las defensas comprometidas causada por un agente de baja virulencia que no produciría infección en una persona sana.
- Infección subclínica:** infección que produce respuesta inmunitaria pero no síntomas clínicos (también llamada infección asintomática).

DEFENSA HUMORAL INNATA (NO CELULAR)

La defensa más básica en esta categoría es el muco que reviste todas las superficies mucosas (p. ej., el muco gástrico o la sustancia tensioactiva [surfactante] que reviste la membrana pulmonar) y los líquidos que barren los potenciales patógenos hacia afuera (p. ej., el flujo del líquido biliar, las lágrimas y la orina). Además, ciertos compuestos antibacterianos, como la lisozima, pueden ayudar a disminuir el número de bacterias. Por último, algunas defensas "primitivas" o "preinmunitarias" desempeñan un papel importante en la defensa del huésped. Estos compuestos se denominan en forma general reactantes de fase aguda.¹⁶ El primero que se identificó, en 1930, fue la proteína C reactiva, que reaccionaba con el polisacárido del neumococo C. La vía alternativa del sistema del complemento es una defensa temprana contra algunas infecciones bacterianas antes de que se desarrollen los anticuerpos específicos. Finalmente, las defensas celulares innatas producen diversos moduladores inflamatorios entre los que se encuentran los quimioattractantes para otras células inflamatorias. Estos compuestos son el medio por el cual una célula se comunica con otra y se denominan **citocinas** (a veces mencionadas como quimiocinas o linfocinas).²¹ La primera citocina que se descubrió (interleucina 1 o IL-1), el principal mediador responsable para la respuesta febril, es sintetizada por los monocitos y los macrófagos.²⁰ Como se describe más adelante, las citocinas también cumplen una función preponderante en la respuesta inmunitaria adaptativa.

DEFENSA CELULAR INNATA

Las células primarias no inmunitarias son los macrófagos fijados a los tejidos (histiocitos), sus contrapartes circulantes (monocitos) y los neutrófilos polimorfonucleares. Los macrófagos de tejido son las defensas primarias contra algunos agentes infecciosos invasores. Por ejemplo, los macrófagos alveolares son muy efectivos para desechar las bacterias invasoras; mientras que los organismos que pueden sobrevivir en los macrófagos (p. ej., micobacterias o especies de *Legionella*) tienen una ventaja competitiva. Los macrófagos tisulares del hígado, el bazo y los ganglios forman el sistema reticuloendotelial; son críticos para la eliminación de partículas circulantes, como los agentes infecciosos de la sangre. Los pacientes a quienes se les ha eliminado el bazo o cuyo hígado está dañado tienen un mayor riesgo de contraer infecciones bacterianas serias.

Una segunda defensa celular es un sistema efector constituido por las células *natural killer* (NK). Este sistema es activo principalmente contra los microorganismos.

Por último, pero no menos importante, las barreras físicas de la piel, el aparato respiratorio, el tubo digestivo y el aparato genitourinario tienen un importante papel en la resistencia a las infecciones. Las terribles consecuencias de los procesos infecciosos en las heridas por quemaduras son el testimonio de la eficacia de la piel. La barrera física del aparato respiratorio se complementa con la acción de los cilios ubicados en su superficie que eliminan de él los materiales extraños. Esta defensa en forma conjunta con el revestimiento no celular se denomina "escalador mucociliar".

TIPOS DE INFLAMACIÓN²²

Inflamación aguda supurativa (o purulenta). Una infección aguda supurativa evoca una respuesta en la cual se forma pus. El pus

es un material líquido que contiene gran número de células inflamatorias y que tiene una densidad que excede 1.013. La células combatientes iniciales y dominantes son los neutrófilos polimorfonucleares.⁶¹ Luego, los macrófagos ingresan en el área para ayudar en la limpieza de los desechos y los fibroblastos pueden activarse en el proceso de cicatrización (fibrosis o tejido cicatrizal).

El término **celulitis** se utiliza a menudo para describir la afectación del tejido conectivo subcutáneo laxo en el cual se dispersa el exudado purulento entre las capas del tejido involucrado. **Necrosis** hace referencia a la muerte celular o a la disolución del tejido, la cual puede ser ocasionada por la acción de enzimas destructivas o por la restricción de nutrientes en ese sitio, debido casi siempre al bloqueo del flujo sanguíneo. **Absceso** es el término que se utiliza cuando los neutrófilos segmentados se ubican en un área no delimitada de inflamación supurativa, con la resultante destrucción del tejido.

La inflamación purulenta es un marcador de las infecciones causadas por las bacterias y algunos hongos, aunque ciertos virus y parásitos también pueden provocar una respuesta inflamatoria supurativa o aguda. Sin embargo, los abscesos son casi exclusivamente causados por bacterias y algunas levaduras. La respuesta inmunitaria humoral suele ser importante en las infecciones supurativas.

Inflamación granulomatosa. La infección granulomatosa es un subtipo de infección crónica en la cual se forman granulomas. Un **granuloma** puede definirse como la concentración focal de macrófagos o histiocitos grandes activados que tienen una capacidad aumentada de fagocitosis y digestión de partículas extrañas. Estas células también se denominan "epitelioides" porque en ocasiones se alinean de manera que se asemejan a las células epiteliales escamosas. Los macrófagos suelen agregarse para formar células gigantes multinucleadas. Otros componentes celulares del granuloma son los linfocitos y los fibroblastos. La activación de los macrófagos se produce por medio de los productos de los linfocitos inmunológicamente específicos.

Ciertos granulomas contienen un tipo particular de necrosis, la necrosis caseosa, en la cual el tejido tiene una consistencia similar al queso. (Cabe destacar cuán a menudo los patólogos han utilizado las analogías con los alimentos para describir los procesos de las enfermedades). La presencia de células gigantes multinucleadas y la necrosis caseosa son características de la tuberculosis, pero también pueden verse en otras infecciones, sobre todo en las provocadas por hongos dimórficos. Si el granuloma es sólido y las células están intactas, se lo describe como no necrosante o no caseoso.

Los granulomas se encuentran en las infecciones por micobacterias y hongos y en algunas infecciones bacterianas y parasitarias. El correlato inmunitario de los granulomas es la inmunidad mediada por células.

Inflamación linfohistiocítica. Algunas infecciones, en especial las causadas por virus, desencadenan una respuesta inflamatoria compuesta por linfocitos y macrófagos. Están involucradas las respuestas inmunitarias humoral y celular.

Inflamación atópica. Las reacciones alérgicas están mediadas por un grupo diferente de células: los eosinófilos, los basófilos y los mastocitos (basófilos fijados a los tejidos). El alérgeno estimulante puede ser químico, como la hierba y el polen, que afectan a las personas alérgicas durante los diferentes periodos estacionales.⁶² Ciertos patógenos, sobre todo los parásitos, desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por los eosinófilos.

DEFENSA CELULAR INMUNITARIA ADAPTATIVA

La "estación central" de las defensas inmunitarias es el linfocito, del cual existen dos clases principales. Los linfocitos B y las células plasmáticas son responsables de producir anticuerpos inmunológicamente específicos y componen el sistema inmunitario humoral.

Sin embargo, el "intimidador" del sistema inmunitario es el linfocito T, que conforma la inmunidad celular. Los linfocitos T se dividen en 1) linfocitos *helper* (fenotipo CD4), responsables de la memoria inmunitaria y de la secreción de las citocinas que modulan la respuesta inmunitaria, y 2) los linfocitos supresores (fenotipo CD8), que son citotóxicos y responsables de la eliminación del material celular extraño (p. ej., las células infectadas por virus). Los linfocitos supresores a veces se los menciona en forma alarmante como "linfocitos T asesinos." A su vez, los linfocitos CD4 se dividen en células de tipo 1 (Th1) y de tipo 2 (Th2) de acuerdo con las citocinas que secretan.

DEFENSA NO CELULAR INMUNITARIA ADAPTATIVA (HUMORAL)

Estas defensas humorales son conducidas y producidas por células inmunitarias específicas. El sofisticado sistema de comunicación que coordina la actividad de todas las defensas del huésped se compone de sustancias químicas producidas por los linfocitos denominadas **citocinas**.²³ Las citocinas también actúan como efectores moleculares de los linfocitos citotóxicos.

Otra defensa humoral importante es el sistema del complemento, que consiste en una cascada de enzimas que da como resultado un grupo de compuestos (C7-C8-C9) conocido en forma conjunta como complejo de ataque.^{117,118} Estos compuestos son moléculas efectoras críticas en la defensa contra ciertos patógenos, como los meningococos. El sistema del complemento funciona en forma similar al sistema de la coagulación. Los componentes intermediarios del sistema, en particular C3a y C5a, son extremadamente importantes como quimioattractantes, es decir, reclutan las diversas células inflamatorias hacia el sitio de la infección.

El sistema del complemento tiene dos ramas que convergen en C3; más allá de ese punto, la vía es la misma. La rama clásica es inmunológicamente específica; los complejos de antígenos y sus correspondientes anticuerpos desencadenan su activación. La rama alternativa (antes conocida como sistema de la properdina) y el sistema de unión a las lectinas, más recientemente reconocido, no son inmunológicamente específicos y forman parte de la respuesta inmunitaria innata.

En ocasiones, la respuesta inmunitaria se puede desviar. Durante el desarrollo normal el sistema inmunitario reconoce los constituyentes del huésped como "propios", fenómeno denominado tolerancia.²¹ El problema surge cuando los componentes normales del tejido se consideran por error "extraños" o "no propios" y son atacados. La fiebre reumática es el ejemplo clásico de un daño no intencional, que ocurre cuando la respuesta inmunitaria confunde la miosina de las fibras del músculo cardíaco con la proteína M de *Streptococcus pyogenes*, que es muy similar.⁶³ Además, a menudo hay un "daño colateral" cuando el tejido normal se daña o incluso se destruye durante el proceso de eliminación del agente invasor o del tumor. Esta respuesta anómala se conoce como autoinmunidad.²⁶ Los defectos en el sistema inmunitario innato también pueden causar enfermedades serias y respuestas inflamatorias anómalas.¹⁷

El sistema inmunitario es el resultado del control de los agentes infecciosos y la vigilancia de los cambios neoplásicos de las células. No podemos sobrevivir sin él y nos encontramos frente a un gran riesgo cuando está comprometido, ya sea por defectos naturales o por productos químicos. Estos últimos pueden provenir del ambiente o pueden administrarse en forma terapéutica, dado que son necesarios para la atención médica. El ejemplo clásico es el huésped receptor de un órgano trasplantado. Para evitar que el cuerpo rechace el órgano extraño, el sistema inmunitario debe suprimirse, al menos en forma temporaria. Durante este proceso, las defensas contra los microbios invasores y las células tumorales se encuentran comprometidas, a veces con consecuencias imprevisibles.⁶⁶

La complejidad del sistema inmunitario es muy admirable. Su complicación es asombrosa y aún no se comprende por completo. El lector interesado puede referirse a varias revisiones excelentes sobre este tema.^{104,127,28,62}

SIGNOS Y SÍNTOMAS CLÍNICOS DE INFECCIÓN

Los signos y síntomas de infección pueden ser generales o sistémicos o bien, focales o localizados en un órgano o un sistema determinado. Los primeros médicos griegos y romanos reconocían cuatro signos principales de la inflamación:

1. Dolor
2. Calor
3. Rubor (enrojecimiento)
4. Tumor (tumefacción)

Los mecanismos subyacentes que predisponen a estos signos no se han dilucidado aún por completo. El mecanismo fisiopatológico inicial es la dilatación de los vasos sanguíneos causada por una compleja cascada de aminas vasoactivas y otros mediadores químicos.²³ La liberación local de mediadores químicos da como resultado 1) aumento del flujo sanguíneo con congestión capilar y venosa (calor y rubor) y 2) aumento de la permeabilidad de los vasos que lleva a la extravasación de los líquidos, la sangre y las proteínas hacia los espacios extracelulares (dolor y tumor). Los neutrófilos segmentados son atraídos por las sustancias quimiotácticas hacia el área de irritación y se escapan a través de la vasculatura permeable hacia los espacios extracelulares (formación de pus).

Signos y síntomas generales o sistémicos de infección. En la fase aguda de la infección, el paciente puede presentar fiebre (a menudo alta y en picos), escalofríos, ruborización (vasodilatación) y pulso rápido. Los pacientes con infecciones subagudas o crónicas pueden padecer síntomas mínimos o vagos, como fiebre leve intermitente, pérdida de peso o fatiga y cansancio. Las reacciones tóxicas a los productos bacterianos pueden producir eccemas o reacciones hemorrágicas en la piel o bien diversos signos y síntomas neuromusculares, cardiorrespiratorios o gastrointestinales, que son los primeros indicadores de una infección subyacente.

Las radiografías muestran infiltrados pulmonares, engrosamiento fibroso del revestimiento de las cavidades, presencia de gas y tumefacción de los tejidos blandos, masas radiopacas o acumulación de líquido dentro de las cavidades o los órganos.

Los parámetros de laboratorio que sugieren infección en los pacientes con síntomas mínimos o incipientes son elevación de la velocidad de sedimentación globular (eritrosedimentación), leucocitosis o monocitosis en sangre periférica y alteraciones en las proteínas plasmáticas. Otros indicadores pueden ser la elevación de las γ -globulinas; la presencia de ciertas proteínas

reactivas, como la proteína C reactiva, o la producción de anticuerpos tipo-específicos.

Signos locales de infección. Los signos principales de inflamación son una manifestación inequívoca de infección local. Puede observarse enrojecimiento localizado, calor y tumefacción o una masa tumerosa si se presentan en las superficies externas, o se detectan en las radiografías con otras técnicas no invasivas (ecografía, tomografía computarizada, resonancia magnética, etc.). Si las terminaciones nerviosas están irritadas o estiradas por la masa que se expande o por sustancias químicas irritantes, se puede sentir dolor en el área inmediata o en otros sitios a través de las vías eferentes complementarias (conocido como dolor "referido"). Un seno con secreciones y los exudados purulentos son también indicadores de un proceso inflamatorio o infeccioso localizado. Cualquiera de estos signos y síntomas señalan al médico la necesidad de obtener material para examen microscópico directo y cultivo.

En el capítulo 2 se detallan los signos y los síntomas específicos de infección que se manifiestan en diversos aparatos (respiratorio, gastrointestinal, urinario, genital y otros).

EFFECTOS INDIRECTOS DE LOS AGENTES INFECCIOSOS EN SERES HUMANOS

Las luchas que los seres humanos hemos librado contra los agentes infecciosos han generado muchos cambios en nuestra impronta genética. El desarrollo del sistema inmunitario es el ejemplo más espectacular e importante, pero se pueden encontrar otros. El paludismo es una de las infecciones más prevalentes y devastadoras del mundo, aunque no es común en los Estados Unidos. Es posible que la aparición de la hemoglobina S, que reduce en una infección menos grave por *Plasmodium falciparum*,⁵⁸ sea un cambio adaptativo. Lamentablemente, cuando desaparece la exposición a la infección, las consecuencias negativas de esta hemoglobina, puestas de manifiesto como anemia drepanocítica, son relevantes. De manera similar, la entrada de merozoítos de *P. vivax* a los eritrocitos requiere el antígeno Duffy de grupo sanguíneo. A pesar de que es un antígeno prevalente, el reconocimiento de este fenómeno biológico proporcionó las herramientas para la creación de vacunas que bloquean la entrada de los parásitos causantes del paludismo en sus células diana.⁶⁶

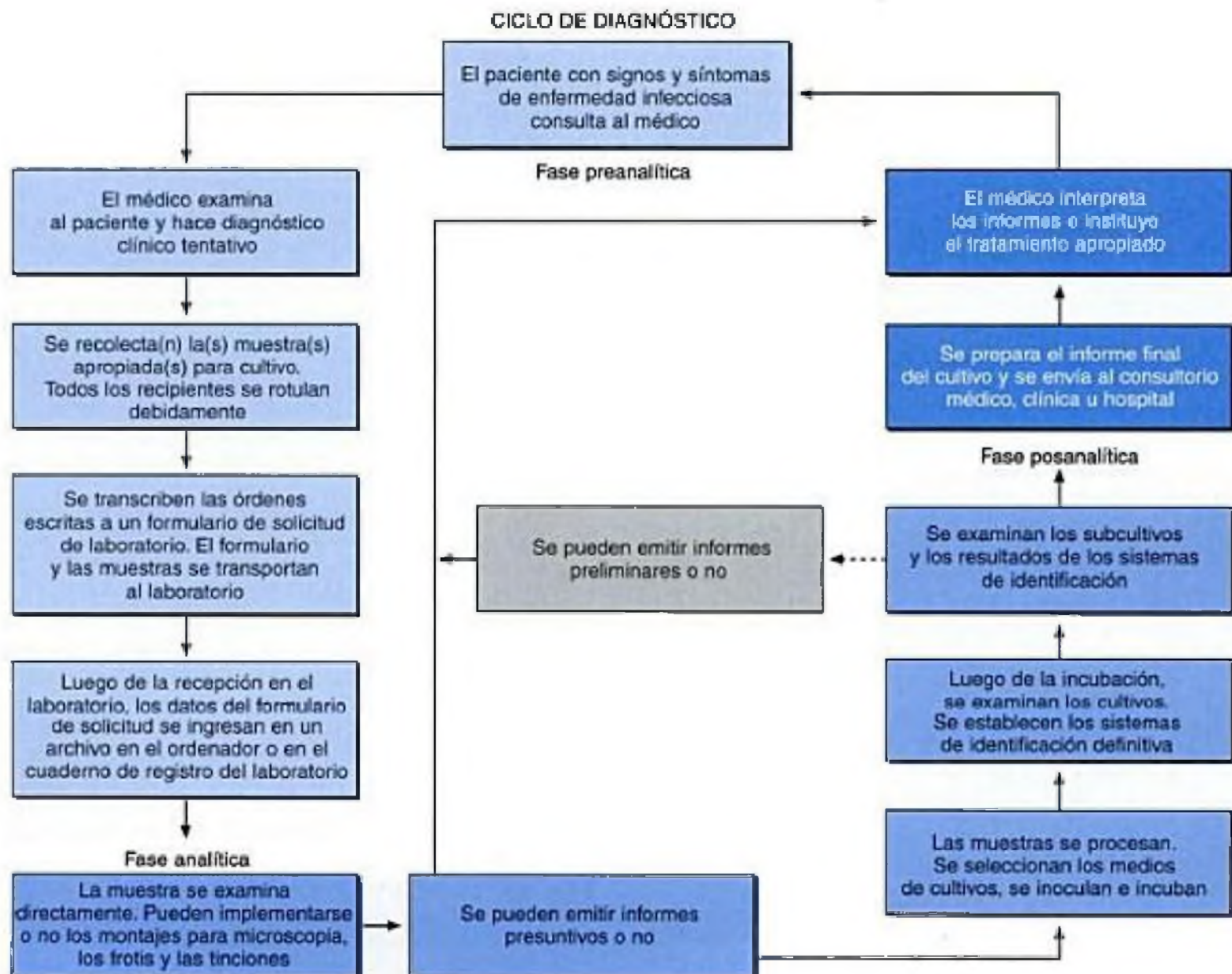


Figura 1-1 Diagnóstico clínico y de laboratorio de las enfermedades infecciosas: revisión esquemática del ciclo de diagnóstico.

Fases del ciclo diagnóstico

Es útil considerar los exámenes de laboratorio como una secuencia de diversos sucesos (fig. 1-1). Tradicionalmente, los microbiólogos, al igual que otros bioquímicos, se concentraron en las mediciones científicas, la fase analítica. En la actualidad, está claro que los sucesos que ocurren antes de la medición (fase preanalítica) y luego de que la determinación científica se haya completado (fase postanalítica) son tan importantes como la exactitud de la medición. El control del funcionamiento a través del ciclo completo es parte del aseguramiento de la calidad para el laboratorio,³⁴ como se analizará más adelante en este capítulo.

Fase preanalítica

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Una vez que se sospecha una enfermedad infecciosa deben ordenarse las pruebas apropiadas. Los enfoques diagnósticos posibles son: el cultivo, la detección serológica de antígenos o anticuerpos, o la detección molecular de ácidos nucleicos. Como se analizará en los capítulos 3 y 4, se utiliza cada vez con mayor frecuencia la detección directa de los antígenos y los ácidos nucleicos en las muestras clínicas, como también la aplicación de este enfoque para la identificación de los microorganismos aislados. En la mayoría de las instituciones y comunidades, los patólogos, los microbiólogos y los auxiliares de laboratorio colaboran con los médicos en la selección de las muestras adecuadas para el cultivo y en la elección de las pruebas apropiadas para lograr la máxima eficiencia de aislamiento y detección de los microorganismos.

Los adecuados recolección y transporte de una muestra al laboratorio para su análisis es un paso crítico y principal en la confirmación de que determinado microorganismo es responsable de una enfermedad infecciosa.³⁵ Una muestra mal recolectada puede impedir el aislamiento de los agentes infecciosos importantes; más aún, puede conducir a terapias incorrectas e

incluso perjudiciales en el caso de que el tratamiento se dirija contra un microorganismo comensal o contaminante. Por ejemplo, presuponer que *Klebsiella pneumoniae*, un reconocido agente causal de la neumonía, como su nombre de especie lo indica, se aisló del esputo de un paciente con neumonía clínica. Se sabe que *Klebsiella pneumoniae* también coloniza la nasofaringe. Si el esputo de este caso hipotético fue mal recolectado y consiste principalmente en saliva, el aislamiento de *K. pneumoniae* podría no reflejar la verdadera causa de la neumonía, sino simplemente la colonización de la nasofaringe. El tratamiento podría ser inadecuado o sólo eficaz por causalidad si la especie bacteriana que causa la neumonía tiene el mismo patrón de sensibilidad a los antibióticos que *K. pneumoniae*. Si el agente causal hubiera sido *Pseudomonas aeruginosa*, el tratamiento hubiese sido equivocado. Esta situación teórica ocurrió realmente en Pensilvania en 1976. Los concurrentes a la convención anual de la Legión Americana de Pensilvania se infectaron en el hotel de la convención en Filadelfia, pero se enfermaron luego cuando regresaron a sus hogares. Fueron tratados con antibióticos ineficaces contra bacilos entéricos que colonizaban las vías aéreas altas. El patógeno real, *Legionella pneumophila*, no se conocía en ese entonces y, lamentablemente, se utilizó un enfoque terapéutico equivocado sobre la base de los inconducentes resultados de laboratorio.³³

A continuación se enumeran los principios que hay que tener en cuenta para la recolección de la muestra:

1. El material debe provenir del sitio real de la infección y recolectarse con un mínimo de contaminación de los tejidos, órganos y secreciones adyacentes. Por ejemplo, los hisopados de garganta para la búsqueda de estreptococos deben tomarse de la fosa peritonsilar y de la pared posterior de la faringe, evitando el contacto del hisopo con otras áreas de la boca. Debe también reducirse al mínimo la contaminación del esputo o de las muestras de las vías aéreas bajas con secreciones orofaríngeas. Otras situaciones en que una muestra recolectada en forma inadecuada puede conducir a un resultado erróneo son:

- No cultivar la zona más profunda de una herida o el drenaje de una cavidad sin tocar la piel adyacente.
- Limpieza incorrecta del tejido periuretral y perineal antes de recolectar una muestra de orina del chorro medio de la micción obtenida en condiciones adecuadas de higiene en una mujer.
- Contaminación de una muestra de endometrio con secreciones vaginales.
- No acceder a la parte profunda de un absceso con agujas o cánulas de aspiración.

En general, los hisopados no constituyen un método adecuado de recolección de muestras en la mayoría de los casos; debería alentarse la utilización de punciones y aspiración a través de agujas y catéteres. Los recipientes protectores para descartar los objetos cortopunzantes deben estar accesibles y ser aptos para la eliminación de las agujas con el fin de reducir el riesgo de accidentes.

2. Se deben establecer los tiempos óptimos de recolección de muestras para proporcionar la mejor oportunidad de recuperar los microorganismos que son agentes causales. El conocimiento de la evolución natural y de la fisiopatología de los procesos infecciosos es importante para determinar el momento correcto de la recolección de muestras. A pesar de que la fiebre tifoidea es ahora poco común en los Estados Unidos, la progresión del proceso infeccioso en esta enfermedad es un ejemplo ilustrativo de la importancia de recolectar las muestras adecuadas en diferentes

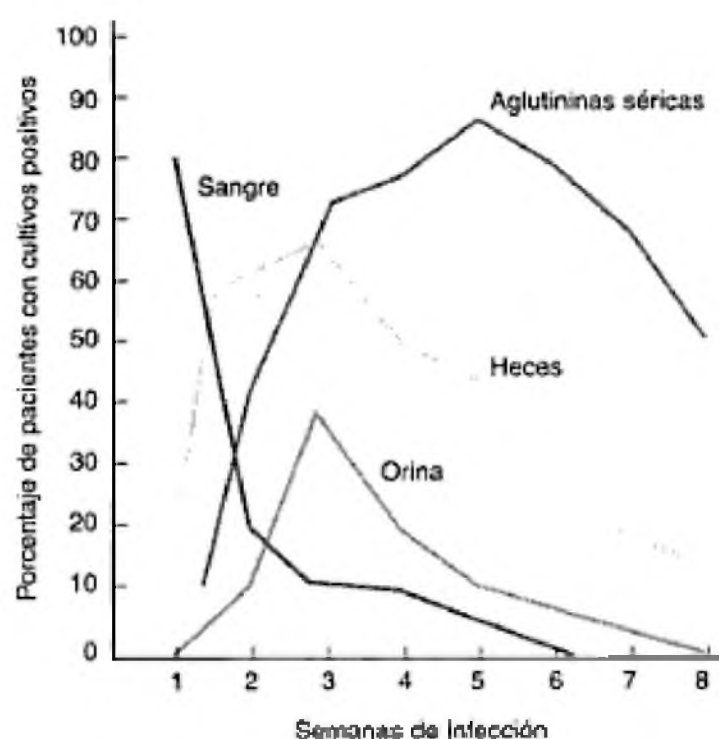


Figura 1-2 Diagnóstico de fiebre tifoidea por cultivo y serología.

momentos (fig. 1-2). La bacteria causal puede aislarse en forma óptima en muestras de sangre durante la primera semana de enfermedad. El cultivo de heces o de orina es casi siempre positivo durante la segunda y la tercera semanas. Las aglutininas séricas comienzan a aumentar durante la segunda semana, alcanzan un pico a la quinta semana, y se pueden detectar durante varias semanas después de la remisión clínica de la enfermedad, pero no se las suele utilizar con fines diagnósticos en los laboratorios modernos.

No deben recolectarse muestras clínicas para cultivo durante 24 horas, en especial esputo u orina, porque el riesgo de contaminación o de sobrecrecimiento de las bacterias comensales de rápido crecimiento es mayor que si se toma una muestra única y se envía al laboratorio.

3. La muestra debe obtenerse en una cantidad suficiente para la realización de los análisis requeridos. Se deben establecer guías para definir el volumen de material requerido para los análisis. En la mayoría de las infecciones bacterianas activas se produce suficiente cantidad de pus o secreción purulenta de modo que el volumen no debería significar un problema. Sin embargo, muchas veces, un médico que no lo sabe puede enviar una muestra pequeña y descartar el resto del material.

En las formas crónicas o leves de infección, puede ser difícil obtener material suficiente. El envío al laboratorio de un hisopo seco o de una muestra escasa de secreciones con la esperanza de poder aislar algún patógeno es a menudo un ejercicio inútil y, posiblemente, de un costo considerable para el paciente. O lo que es peor aún, se puede considerar de manera incorrecta que la lesión no estaba infectada basándose en un cultivo falso negativo.

En forma frecuente se envía al laboratorio una muestra de 0.5 mL o menos de un material rotulado como "esputo" o "lavado bronquial" y se solicitan pruebas de rutina, tinciones para bacterias ácido-álcohol resistentes y cultivo para hongos. Estas muestras pueden no representar las secreciones pulmonares del sitio de la infección y el pequeño volumen puede resultar insuficiente para permitir la realización de todos los procedimientos requeridos. Se pueden suministrar tubos que contienen medios de transporte como solución fisiológica (no nutritivo) o caldo de fosfato, levadura y glucosa (PYG) (nutritivo). El médico puede inocular directamente cualquier cantidad de material que pueda recolectar. Así, la muestra puede dividirse en el laboratorio para inocularla en numerosos medios de aislamiento primario. En algunas instituciones, se proveen varios tubos cada uno de los cuales contiene los medios de cultivo óptimos para el aislamiento de micobacterias, hongos y virus. Si las secreciones que se obtuvieron son mínimas, el médico deberá elegir el tubo basándose en las consideraciones clínicas.

Cuando el tamaño de la muestra es demasiado pequeño para cumplir con los requisitos en forma apropiada, es conveniente comunicarse con el médico para establecer las prioridades de cultivo. El informe debe indicar que el material enviado para análisis era escaso.

4. Para asegurar la recuperación óptima de los microorganismos se deben utilizar dispositivos de recolección de muestras, recipientes y medios de cultivo apropiados. Se deben utilizar recipientes estériles para la recolección de la mayoría de las muestras. Es importante que estén diseñados para facilitar esa recolección, sobre todo si el paciente debe tomar su propia muestra. Los frascos de boca angosta no son útiles para muestras de esputo o de orina. Los recipientes también deben tener tapas que cierran en forma ajustada para evitar los derrames o la contaminación durante el transporte.

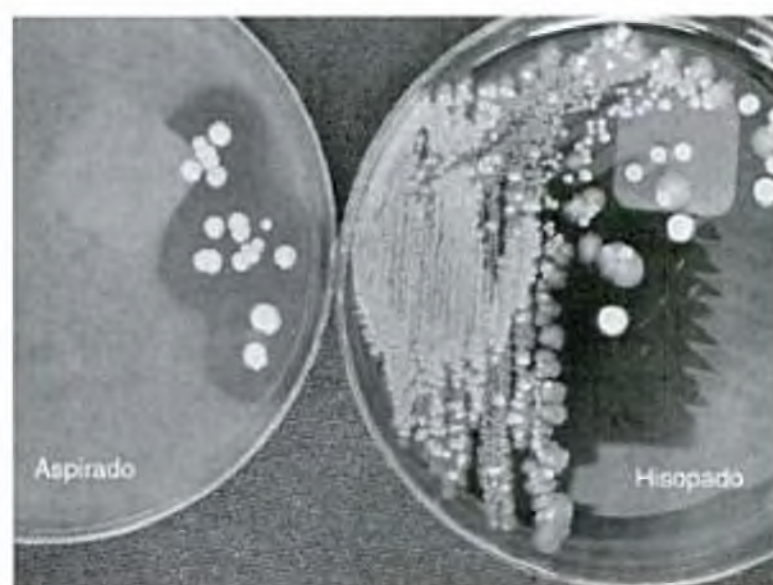


Figura 1-3 Comparación de muestras de una articulación infectada, obtenidas por aspiración (pus) e hisopado. La aspiración dio origen a un cultivo puro de *Staphylococcus aureus* positivo. El estafilococo también se aisló en la muestra recolectada con el hisopo, pero estaba mezclado con otras bacterias de la flora contaminante. La interpretación con el aspirado fue inmediata; la determinación del significado del cultivo del hisopado es problemática, aun en presencia de un patógeno potencial.

Los hisopos se utilizan para obtener diferentes tipos de muestras para cultivo; sin embargo, suelen ser menos convenientes que otros métodos para la recolección de muestras, por lo tanto, en la medida de lo posible, se debe desalentar su uso. Si se los utiliza, hay que tomar ciertas precauciones. Los hisopos de algodón pueden tener ácidos grasos residuales y el alginato de calcio puede liberar productos tóxicos que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias con requerimientos nutricionales especiales (*fastidious*). En general son preferibles los hisopos con puntas de poliéster de Dacron® o de Rayon®. No se debe permitir que las muestras estén en contacto con el hisopo más tiempo que el necesario. Además de la toxicidad, la capacidad de los hisopos de absorber y luego liberar las muestras varía con el material utilizado en su fabricación.

Los hisopos deben colocarse en un medio de transporte o en un recipiente húmedo para evitar que las bacterias se sequen y mueran. Se ha demostrado un buen aislamiento de la mayoría de las especies bacterianas en estos tubos hasta 48 horas o más luego de la recolección de la muestra. La utilización de tubos que contienen medio de transporte semisólido de Stuart o de Amies, con carbón o sin él, también son útiles para mantener los hisopos de cultivo durante el transporte. Existen algunas excepciones a esta normativa. Las muestras de raspado de piel o de cortes de uñas para el aislamiento de hongos dermatofíticos deben enviarse secas en un recipiente limpio para evitar el sobrecrecimiento de las bacterias. Los hisopados de garganta para aislamiento de *Streptococcus pyogenes* pueden enviarse en medio de transporte, pero el aislamiento de esta bacteria "resistente a la sequedad" mejora si se envía el hisopo seco porque mueren otras bacterias que colonizan la orofaringe.

La capacidad para recolectar casi cualquier muestra con un hisopo es un problema aún mayor que la toxicidad y la retención de material. Mientras un aspirado o una biopsia garantizan una muestra que puede generar resultados interpretables, positivos o negativos, un hisopo puede haberse utilizado para tomar una muestra de un proceso inflamatorio o de la flora que colo-



Figura 1-4 Sistemas de transporte de hisopos. El sistema más simple consta de un único hisopo en un tubo de transporte que contiene un medio sin nutrientes para mantener la humedad (arriba). Se comercializa un sistema similar con dos hisopos en un único tubo de transporte (abajo); en este caso uno de los hisopos puede utilizarse para cultivo y el segundo hisopo, para realizar un frotis directo.

niza. A veces, el verdadero patógeno puede estar escondido en una mezcla de bacterias que se tomaron con un hisopo, pero es casi imposible estar seguro. Se puede llegar a interpretar en el caso de un microorganismo que es un patógeno documentado y nunca coloniza a seres humanos, pero esos criterios se cumplen rara vez. En la figura 1-3 se comparan los resultados del cultivo de un aspirado y de un hisopo del mismo sitio.

Es posible hacer un frotis y un cultivo a partir de un único hisopo si el portaobjetos se flamea para esterilizarlo antes de que se prepare el extendido. Sin embargo, muchos laboratorios requieren que se envíen dos hisopos, uno para el frotis y otro para el cultivo, de modo que haya material adecuado para ambos. En ese caso es importante proveer sistemas de

transporte con dos hisopos al personal auxiliar para evitar que envíen un único hisopo en un pedido de extendido y de cultivo (fig. 1-4).

En particular, se desaconseja la obtención de muestras con hisopos para el aislamiento de bacterias anaerobias; en cambio, para este fin se recomiendan la aspiración con aguja y jeringa. Las muestras recolectadas deben siempre protegerse de su exposición al oxígeno ambiental y evitar que se sequen hasta que puedan procesarse en el laboratorio. Los sistemas de transporte seleccionados para las muestras anaerobias se enumeran en el cuadro 1-5.

Se requiere educación continua para impedir la utilización errónea de los hisopos, que constituye un hábito muy arraiga-

Cuadro 1-5 Recipientes para el transporte de muestras anaerobias

RECIPIENTE	FUNDAMENTO O DESCRIPCIÓN
Jeringa y aguja para aspiración	Los exudados frescos o las muestras líquidas pueden transportarse al laboratorio luego de expeler con cuidado las burbujas de la jeringa e insertar la punta de la aguja en un tapón estéril. Este procedimiento es válido sólo si la muestra puede ser transportada al laboratorio sin demora. Esta práctica está bajo discusión dada la probabilidad de transmisión de HIV por heridas con la aguja.
Tubo o frasco ampolla	Tubos o frascos ampolla que contienen un medio semisólido, una atmósfera con 5% de CO_2 , un agente reductor y el indicador resazurina para dar una señal visual de anaerobiosis. El tubo se utiliza principalmente para la inserción de muestras en hisopos; los frascos ampolla se utilizan para la inoculación de las muestras líquidas.
Hisopo con sistema de cubierta plástica	El tubo o cubierta plástica incluye un hisopo y contiene el medio Cary-Blair. Antes de transporte o premeducido (PRAS). El sistema Culturette® también incluye un frasco ampolla o cámara separada por una membrana que contiene sustancias químicas que generan catalizadores de CO_2 y desecantes para "atrapar" el O_2 residual que pueda quedar dentro del sistema.
Bolsa para materiales biológicos o bolsa de plástico	Bolsas de plástico transparentes para materiales biológicos que contienen un sistema generador de CO_2 , un catalizador de paladio y un indicador anaeróbico. La bolsa es lo suficientemente grande como para guardar una placa de Petri inoculada que contiene un medio premeducido o una bandeja de microtubos de identificación bioquímica, como las utilizadas para realizar las pruebas Minitek®. La bolsa para materiales biológicos o bolsa de plástico se sella luego que se introdujo en ella la placa inoculada y se activó el sistema generador de CO_2 . La ventaja de estos sistemas es que las placas pueden observarse directamente a través del plástico transparente y delgado de la bolsa para efectuar la visualización del crecimiento temprano de las colonias.

do. La educación se puede realizar mediante instrucciones de recolección de muestras impartidas por la dirección de los servicios del laboratorio, a través de boletines informativos o comentarios en los informes de muestras que se han enviado en hisopos.

En el quirófano no existen motivos que justifiquen la obtención de muestras con hisopos. Se debe llevar a cabo una campaña para eliminarlos del quirófano y evitar su reingreso. Un medio útil para lograr este objetivo es la comunicación con los enfermeros del quirófano. En la Vermont University diseñamos un método propio para la recolección de muestras en el quirófano, porque no están disponibles comercialmente los recursos adecuados. En el laboratorio se preparan frascos ampolla estériles que contienen una rosca en la parte superior con un diafragma de goma. En el fondo del frasco se coloca una capa delgada de agar no nutritivo para mantener la humedad. Luego se lo coloca en un envase adecuado para ponerlo en el autoclave; de este modo, un asistente puede colocar el envase estéril sobre la bandeja de instrumentación en el quirófano. El cirujano puede inyectar el material a través del diafragma de goma o colocar el tejido dentro del frasco ampolla luego de desenroscar la tapa. El tejido se encuentra en un ambiente lo suficientemente anaerobio y, por lo tanto, el sistema es perfecto para el aislamiento de microorganismos anaerobios y facultativos. Sin la protección del envoltorio, el frasco ampolla sirve como medio general de transporte (fig. 1-5).

Cualquiera que sea el sistema de transporte utilizado, la principal tarea es reducir al mínimo la demora entre la recolección de la muestra y su inoculación en el medio. Por ejemplo, si se utilizan los hisopados rectales para el aislamiento de *Shigella* de pacientes con disentería bacilar, el material recolectado debe inocularse directamente sobre la superficie del medio de MacConkey o en un caldo para enriquecimiento de gramnegativos. La utilización de un medio de mantenimiento o de transporte puede poner en peligro el aislamiento de ciertas cepas. Las secreciones uretrales o cervicales que se obtienen para el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* también deben ser inoculadas en una superficie de agar chocolate y en uno de los numerosos medios de cultivo selectivos. En su defecto, se puede utilizar un sistema de transporte comercial que incluye una tableta de la generación de CO₂ (BD BBL® Jembec® system; BD, Franklin Lakes, NJ) para el aislamiento de *N. gonorrhoeae*. En forma similar, las muestras de las vías aéreas altas para el aislamiento de *Bordetella pertussis* deben inocularse sobre agar Bordet-Gengou, carbón Regan-Lowe⁹⁴ recientemente preparado, o un medio equivalente a la cabecera del paciente o en la clínica, a menos que se utilice un medio de transporte adecuado (como el medio Regan-Lowe).

5. Cuando sea posible, deben obtenerse los cultivos antes de la administración de los antibióticos. Se recomienda la obtención de los cultivos antes de prescribir los antibióticos, sobre todo para el aislamiento de los microorganismos que son muy sensibles a ellos, como los estreptococos β -hemolíticos de las muestras de hisopado de garganta, *N. gonorrhoeae* de las muestras del aparato genitourinario o *Haemophilus influenzae* o *N. meningitidis* del líquido cefalorraquídeo. La administración de antibióticos no impide siempre el aislamiento de los microorganismos de las muestras clínicas; en estas circunstancias, obtener una muestra puede ser mejor que no hacerlo, en tanto y en cuanto los médicos entiendan que los resultados deben analizarse con cierto reparo.

6. En muchas instancias, además de los cultivos se deben realizar frotis. Los frotis proporcionan una información extremadamente útil que complementa al cultivo. En ciertas situaciones el fro-

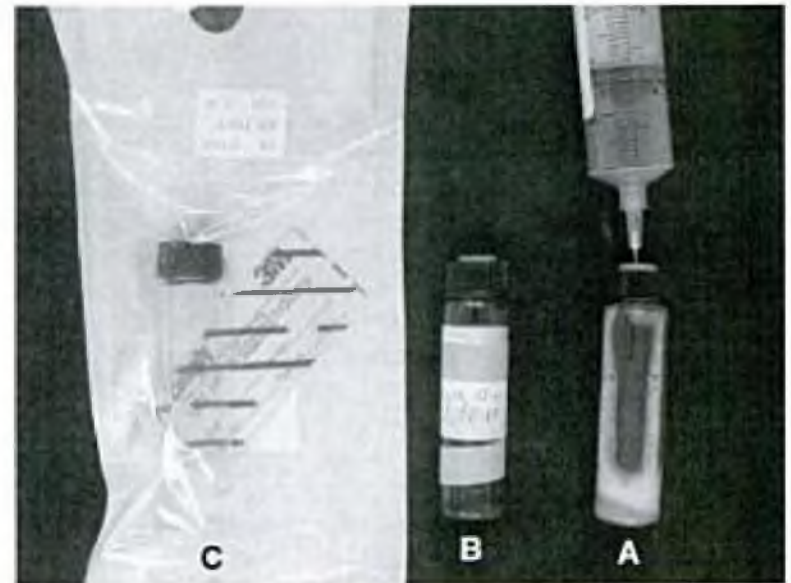


Figura 1-5 Sistema de transporte para cultivos aerobios o anaerobios. Se cierra un frasco ampolla con una tapa a rosca que contiene un diafragma de goma. Una capa de agar en el fondo del frasco ampolla mantiene la humedad; un indicador de oxidoreducción en el agar indica visualmente la oxigenación de la atmósfera. El frasco ampolla A contiene un líquido aspirado que ha sido inoculado a través del diafragma de goma. El frasco ampolla B contiene un fragmento de tejido que se colocó dentro del frasco ampolla destapado en la cirugía. El frasco ampolla C ha sido esterilizado dentro de un envoltorio fabricado para instrumentos quirúrgicos; está listo para abrirse sobre un campo estéril.

tis es mucho más útil que el cultivo, como en el caso del esputo expectorado. Los extendidos permiten la determinación de la naturaleza inflamatoria de una muestra e indican si los resultados del cultivo tienen significado clínico. Por ejemplo, la muestra de una herida que no contiene neutrófilos polimorfonucleares y da un cultivo positivo de flora bacteriana mixta no puede considerarse válida. Es muy probable que los médicos que confían en los resultados de este cultivo se sientan decepcionados.

Además, las tinciones de Gram indican la flora microbiana presente. Un frotis que tiene muchos bacilos gramnegativos que no pueden crecer en un cultivo aerobio clásico indica que las condiciones del cultivo no eran las óptimas o que los microorganismos no eran viables. Las condiciones de cultivo subóptimas incluyen una atmósfera incorrecta de incubación (anaerobios) o un medio incorrecto (organismos con requerimientos nutricionales especiales como *Legionella* o *Bordetella*). Los microbios pueden no ser viables como consecuencia de una terapia antimicrobiana apropiada o de una respuesta inflamatoria eficaz.

Las reglamentaciones estatales sobre fraude y abuso exigen que un laboratorio realice sólo los análisis que le han sido solicitados. Más adelante se comentarán los mecanismos para intensificar el uso apropiado del laboratorio en la fase preanalítica.

7. El recipiente de cultivo debe estar rotulado en forma adecuada. Cada recipiente de cultivo debe tener una etiqueta legible, con la siguiente información mínima:

Nombre del paciente
Número de identificación del paciente
Fuente de la muestra
Médico
Fecha y hora de la recolección

Utilice el nombre completo del paciente y evite las iniciales. El número de identificación debe ser el número del hospital, del consultorio o de la clínica, la dirección de su casa o el número del seguro social, según las circunstancias. El nombre del médico o del contacto en el consultorio es necesario por si se requiere alguna consulta o adelantar un informe. El origen de las muestras debe anotarse para que, si es necesario, se seleccione un medio especial de cultivo. La fecha y hora de la recolección deben aparecer en la etiqueta para determinar su procesamiento a tiempo. Otra información útil es el diagnóstico clínico y la historia de tratamiento con antibióticos del paciente.

TRANSPORTE DE LA MUESTRA

El objetivo principal del transporte de la muestra para diagnóstico, ya sea dentro del hospital, desde la clínica o su envío por correo hacia un laboratorio de referencia, es mantenerla, dentro de lo posible, de la manera más parecida a su estado original. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁶⁵ ha creado diversas guías para los fabricantes de los dispositivos para la recolección y el transporte de muestras. Los peligros para las personas que manipulan las muestras se reducen si los dispositivos de recolección cierran en forma ajustada y se colocan dentro de recipientes de protección adecuados. Para mantener la integridad de la muestra se deben evitar las condiciones ambientales adversas, como la exposición al frío o al calor extremos, los cambios rápidos de presión (durante el transporte aéreo) o el secado excesivo. Si se estima una demora prolongada hasta el procesamiento de la muestra (p. ej., más de 4 días), es preferible congelarla a -70°C . Para períodos cortos de almacenamiento, un congelador con temperaturas de -20°C puede ser útil para algunas muestras siempre que el aparato no sea del tipo que no produce escarcha. Muchos virólogos creen que las muestras para cultivo de virus (y los aislamientos virales) nunca deben almacenarse a -20°C .

Las muestras de esputo que se recolectan principalmente para el aislamiento de micobacterias y hongos en recipientes de propileno o polietileno pueden enviarse sin ningún acondicionamiento posterior. No se deben utilizar recipientes de vidrio para evitar roturas durante el transporte.

La mayoría de las muestras líquidas deben ser transportadas al laboratorio lo antes posible. En un hospital, se recomienda un máximo de 2 horas entre la recolección y el envío de la muestra.^{3,40} Este límite de tiempo resulta un problema para las muestras que se toman en el consultorio médico. Si no es posible su transporte rápido, se pueden utilizar recipientes con una pequeña cantidad de ácido bórico para el transporte de orina. De manera alternativa, las muestras de orina pueden refrigerarse hasta 24 horas antes de su cultivo. Para la mayoría de las otras muestras se puede utilizar un medio de mantenimiento o transporte, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los medios de transporte empleados con mayor frecuencia son Stuart, Amies y Carey-Blair (recuadro 1-2).

Estos medios son esencialmente soluciones amortiguadoras (buffers) con hidratos de carbono, peptonas y otros nutrientes, sin factores de crecimiento, diseñados para mantener la viabilidad de las bacterias durante su transporte pero sin permitir su multiplicación. Se les agrega tioglicolato de sodio como reductor para mejorar el aislamiento de las bacterias anaerobias y la pequeña cantidad de agar les proporciona una consistencia semisólida que evita la oxigenación y el derrame durante el transporte. Para enviar a laboratorios distantes muestras en las que se sospecha la presencia de micobacterias, se recomienda

Recuadro 1-2 Medio de transporte de Stuart

Cloruro de sodio	3 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato disódico	1.25 g
Fosfato monopotásico	0.2 g
Tioglicolato de sodio	1 g
Cloruro de calcio, 1% en agua	10 g
Cloruro de magnesio, 1% en agua	10 g
Agar	4 g
Agua destilada cantidad suficiente para pH = 7.3	1 L.

una solución de borato de sodio como conservante.⁶⁶ Para el aislamiento de ciertos virus, como los del herpes, un buen medio buffer de transporte es sacarosa-fosfato-glutamato. En algunos centros también se utilizan con éxito los hisopos Culturette[®] para el transporte de muestras para aislamientos virales.¹⁰⁷

RECEPCIÓN DE LA MUESTRA Y OBSERVACIONES PRELIMINARES

En la mayoría de los laboratorios clínicos se designa un área para la recepción de las muestras. Las observaciones iniciales y la manipulación deben realizarse en una cabina de seguridad biológica (véase más adelante) debido al riesgo de que el personal pueda sufrir una infección adquirida en el laboratorio a partir de muestras que contienen patógenos. El personal debe vestirse con indumentaria de protección adecuada, bata, guantes de goma y, en ciertos casos, máscaras de protección. Estas precauciones se tomaban antes sólo con las muestras que llevaban etiquetas de peligro. Sin embargo, es imposible determinar si un paciente está infectado con un agente transmisible o si una muestra contiene un patógeno muy contagioso. Por lo tanto, es prudente tener un cuidado especial cuando se manipulan todas las muestras (cuidados universales).

El procesamiento de las muestras incluye: 1) el registro de los datos fundamentales en un cuaderno o base de datos de ordenador, 2) el examen visual y la evaluación de si se cumplen todos los criterios para aceptarla (véase la sección inmediata adelante sobre los criterios para el rechazo de una muestra) y 3) para ciertas muestras, el examen microscópico de los montajes directos o las tinciones de los frotis para establecer un diagnóstico presuntivo.

CRITERIOS PARA EL RECHAZO DE LAS MUESTRAS

En todos los laboratorios se deben establecer los criterios para el rechazo de las muestras que no son adecuadas para el cultivo.¹¹² A pesar de que existen normas generales y de que las agencias acreditadas han establecido los estándares, cada director de laboratorio debe decidir los parámetros por utilizar, según las condiciones locales. Se deben verificar los formularios de pedido y las etiquetas de las muestras para corroborar que se incluya toda la información fundamental y que ésta sea coherente. Ante un problema, la recolección de una nueva muestra es lo más recomendable. Si la muestra no puede tomarse nuevamente, se debe buscar a una persona responsable para adoptar las medidas pertinentes. Se debe incluir un comentario en el informe final en el cual se indique que la muestra fue recibida con un problema (específico) y agregar el

nombre de quien resolvió ese problema. Si es posible determinar el tipo de muestra, puede aceptarse que en ciertos casos se incluya en el informe: "la muestra parece ser..."; de lo contrario, se la debe rechazar. Siempre que haya discrepancia, se debe hacer un informe escrito de cómo se manejó la situación y de los nombres de las personas que se contactaron, en la parte de atrás de la solicitud del estudio, en el cuaderno de registro o en la base de datos del ordenador.

En el recuadro 1-3 se enumeran los tipos de muestras y los pedidos de cultivos que deben aparecer en una lista de rechazos y que no deben procesarse.

Cuando se rechaza una muestra, debe contactarse a la persona que la envió y ponerla al tanto sobre la situación. Se debe intentar en lo posible no rechazar las muestras difíciles de recolectar nuevamente, como el líquido cefalorraquídeo o los lavados bronquiales. Si no se puede resolver un problema en forma expeditiva, se deben realizar los cultivos para evitar la pérdida de la integridad de la muestra. La decisión sobre informar o no los resultados se puede tomar con posterioridad. Si corresponde, las condiciones de la muestra se deben incluir en el informe. Luego, el médico tendrá la responsabilidad sobre la interpretación del informe a la luz de los datos disponibles.

Recuadro 1-3 Tipos de muestras o solicitudes de cultivo que deben rechazarse

1. Cualquier muestra recibida en formol. La única excepción podrían ser las muestras grandes con un corto tiempo de exposición al formol (menos de 1 hora). En estas circunstancias, el tejido deberá ser cortado en dos con una cuchilla o tijera estéril y se tomará una muestra de la porción más interna para su cultivo.
2. Los esputos recolectados durante 24 horas. Es difícil evitar la contaminación y las muestras individuales que contienen una alta concentración de microorganismos se diluirán por las muestras siguientes menos concentradas.
3. Los frotis de secreciones del cuello interno, del canal vaginal o de ano para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* por tinción de Gram.
4. Hisopado único enviado para múltiples solicitudes, por ejemplo: "aerobios, anaerobios, hongos y tuberculosis".
5. El envío en un recipiente inadecuado, no estéril u obviamente contaminado, en el cual parte de la muestra se ha derramado. Cualquier recipiente con filtraciones que tenga un rótulo de peligro biológico debe ser manipulado con extremo cuidado.
6. Las placas de cultivo que están sobrecrecidas o reseca. Una excepción podría ser una placa de cultivo de un aislamiento de uno de los hongos patógenos (véase cap. 19). A veces, uno de los hongos patógenos de crecimiento más lento puede aún crecer por encima de bacterias u otro hongo filamentoso. Puede ser adecuada la consulta con el médico.
7. Las muestras que están obviamente contaminadas como lo pone en evidencia la presencia de materiales extraños, como bario, colorantes coloreados o sustancias químicas oleosas.
8. Las siguientes muestras no son aceptables para cultivos anaerobios: lavados gástricos, orina del chorro medio, secreciones prostáticas por recolección transuretral, heces (excepto para el aislamiento de especies de *Clostridium* asociadas con enfermedad gastrointestinal como *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. septicum*), hisopados de ileostomía o colostomía, muestras de faringe, nariz u otras zonas orofaríngeas (excepto las muestras obtenidas de un tejido profundo durante una cirugía bucal), piel superficial y cultivos del ambiente.

Los criterios de rechazo deben enumerarse en forma clara en las directivas de los servicios del laboratorio. Se debe instruir al personal del hospital sobre la importancia del envío de muestras aptas para el cultivo. Además, se deben publicar los problemas recurrentes y sus soluciones en los boletines del laboratorio y en otras publicaciones que estén al alcance del personal del hospital y de los médicos de planta.

RELACIÓN COSTO-EFICACIA EN LA FASE PREANALÍTICA

La relación costo-eficacia fue una mala palabra durante muchos años en microbiología clínica. Los microbiólogos tradicionales consideraban este tema antiacadémico, impuro e incluso peligroso. Sin embargo, otro punto de vista es la aplicación de lo que es clínicamente relevante al diagnóstico microbiológico. El objetivo no es identificar todo microorganismo que pueda ser aislado o hacer el antibiograma a cada uno que crece en el laboratorio. La idea es proporcionarle a los médicos la información que les permita brindar la mejor atención a los pacientes. Desde este enfoque, el trabajo del microbiólogo puede ser usualmente más económico que hacer todo lo que sea posible. Es decir, el criterio de relevancia clínica iguala a la relación costo-eficacia. La relación costo-eficacia no significa barato; significa el mejor valor para el dinero.

Raymond Barlett, un distinguido patólogo y director durante muchos años del laboratorio de microbiología del Hartford Hospital de Connecticut, es reconocido como el padre del criterio de relevancia clínica en los laboratorios de diagnóstico microbiológico. Aún hoy es importante que los microbiólogos lean su libro original sobre el tema.⁵⁶ Todos los que siguieron al doctor Barlett tienen con él una deuda de gratitud.

En cada paso del procesamiento de laboratorio debe informarse la relevancia clínica y la relación costo-eficacia. En el cuadro 1-6 se detallan algunas sugerencias para la fase preanalítica. Se pueden lograr ahorros sustanciales de materiales y tiempo.⁷⁶ Las condiciones varían en cada institución, por lo tanto, cada director de laboratorio debe decidir sobre las opciones más adecuadas.

Fase analítica

EXAMEN MICROSCÓPICO

Se han enfatizado las razones por las cuales se debe realizar el examen microscópico de los materiales clínicos.⁵⁷

1. El número y el porcentaje de neutrófilos segmentados que están presentes indican la magnitud y el tipo de respuesta inflamatoria. La calidad de la muestra se puede validar.
2. La observación de bacterias, elementos miceliales, formas de levaduras, estructuras de parásitos o inclusiones virales puede proporcionar información suficiente para la elaboración de un diagnóstico presuntivo inmediato.
3. El examen microscópico directo puede también proporcionar evidencia presuntiva inmediata de la presencia de bacterias anaerobias. Con estos datos en la mano, el médico puede tomar una decisión más racional sobre el tratamiento antimicrobiano inicial.

El examen por microscopía de contraste de fase o de campo oscuro de material sin tinción de muestras húmedas es útil para demostrar movilidad y la resistencia de espiroquetas y endosporas. Las tinciones de Giemsa, de Wright o naranja de acridina pueden ser de ayuda para la observación de formas bacteria-

Cuadro 1-6 Relación costo-eficacia en la fase preanalítica de las pruebas

ACCIÓN	FUNDAMENTO	COMENTARIOS
Cultivo selectivo de LCR para hongos ⁷⁹	Bajo rendimiento en pacientes inmunocompetentes que tienen valores normales en las pruebas químicas y en el recuento de células en el LCR	<i>Cryptococcus neoformans</i> puede causar infección crónica sin pleocitosis en el LCR
Cultivo selectivo de LCR para micobacterias ⁷⁰	Bajo rendimiento en pacientes inmunocompetentes que tienen valores normales en las pruebas químicas y en el recuento de células en el LCR	En las poblaciones con bajo riesgo de tuberculosis el rendimiento puede ser aún menor
Cultivo selectivo de heces para patógenos bacterianos o análisis para huevos y parásitos ^{70,105}	Bajo rendimiento en pacientes que han sido hospitalizados durante más de 3 días	
Cultivo selectivo de aspirados endotraqueales o exputos expectorados ⁷⁹	Incremento en el aislamiento de flora orofaríngea contaminante si se observan más de 10 células epiteliales pavimentosas por campo de bajo aumento	Los investigadores han aplicado varios criterios diferentes
Utilización selectiva de caldos de cultivo de apoyo para los cultivos bacterianos	Utilidad cuestionable excepto para biopsias de tejidos y ciertos líquidos, como pacientes con desvíos de LCR o que son sometidos a diálisis peritoneal crónica	Los caldos de cultivo pueden utilizarse en otras situaciones si se examinan sólo cuando un microorganismo presente en frotis no se recuperó en las placas. Estos nunca deben aplicarse a muestras de las superficies mucosas
No utilizar pruebas de antígenos bacterianos en LCR ^{70,101}	Escasa sensibilidad y especificidad que limitan su utilidad	
Cultivo selectivo de líquido peritoneal	Patrón de aislamiento de patógenos y perfiles de sensibilidad predecibles en pacientes con peritonitis secundaria (adquirida en la comunidad)	Cultivos indicados en peritonitis primaria (peritonitis bacteriana espontánea) y en peritonitis adquirida en el hospital
Cultivo selectivo de muestras de faringe	<i>Streptococcus pyogenes</i> es el principal agente etiológico de la faringitis; el "cultivo de rutina" con múltiples medios probablemente proporcione información falsa	Los cultivos para <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> o virus del herpes simple deben solicitarse específicamente si es apropiado. <i>Acinetobacterium hemolyticum</i> causa faringitis en niños mayores y adolescentes, pero se aísla en medios aptos para <i>Streptococcus pyogenes</i>
Cultivo selectivo de bacterias anaerobias	Los cultivos de anaerobios deberían realizarse en forma sistemática sólo en tejidos o líquidos aspirados/pus	Nunca realizar cultivos de anaerobios en muestras de sitios que pueden estar contaminadas con flora de las mucosas o heces
Limitar la frecuencia del cultivo	Las muestras de faringe, orina y heridas se limitan a una cada 24 horas; las muestras de sangre se limitan a dos o tres cultivos (10 a 20 mL por cultivo) cada 24 horas	Se debe sugerir el cultivo con una frecuencia no menor de 48 a 72 horas (tiempo requerido para evaluar la primera muestra)
Limitar la frecuencia de los exámenes de huevos y parásitos	El rendimiento a partir de los exámenes de <i>Giardia</i> como mínimo luego de tres muestras, las cuales deberán recolectarse en días alternos	Para otros parásitos intestinales probablemente sea adecuado realizar menos de tres exámenes
Limitar la frecuencia de pruebas para <i>C. difficile</i> ⁷⁰	Rendimiento luego de dos exámenes negativos como mínimo	
Limitar las pruebas de DNA para virus del herpes simple en LCR ^{106,110}	Rendimiento mínimo si el recuento de células en LCR es normal y no hay evidencias de lesiones focales por resonancia magnética	Se describieron excepciones, especialmente en niños
Limitar el envío de muestras duplicadas del mismo sitio en el mismo día	Unificar las muestras o seleccionar la mejor muestra (basado en la tinción de Gram o el tiempo de transporte)	Si existe cualquier incertidumbre en lo que se refiere a la equivalencia de las muestras, consultar con el médico antes del procesamiento; cuando sea dudoso, procesarlas de inmediato en forma separada y consultar en el tiempo libre; preservar las muestras al menos por 24 horas
Limitar la repetición de muestras de un sitio no estéril dentro de un periodo definido	Enviar las muestras siguientes a la evaluación previa; si la muestra siguiente ha sido inoculada en un medio y se presentan diferencias sustanciales con la muestra original, consultar con el médico acerca de las opciones futuras	Preservar las muestras al menos por 24 horas; preservar las placas inoculadas que son evaluadas de manera incompleta por un periodo definido (p. ej., 7 días)
No cultivar puntas de catéteres urinarios permanentes ¹¹⁸	Rechazar la muestra para cultivo	Informar al médico que debe remitirse la orina

LCR = líquido cefalorraquídeo.

Para más información el lector puede consultar las referencias⁷⁰⁻⁷⁹.

Recuadro 1-4 Sistema de clasificación de Bartlett para la evaluación de la calidad de las muestras de esputo

Número de neutrófilos por campo de bajo aumento (10 ×)	Grado
< 10	0
10-25	+1
> 25	+2
Presencia de moco	+1
Número de células epiteliales por campo de bajo aumento (10 ×)	
10-25	-1
> 25	-2
Total*	

* Promedie el número de células epiteliales y neutrófilos de alrededor de 20 a 30 campos separados de observación a 10 × y calcule el total. Un resultado final de 0 o menos indica ausencia de inflamación activa o contaminación con saliva. Debe pedirse una nueva muestra de esputo.

nas que se tiñen débilmente o que tienen poco contraste con el material de fondo.

También se puede utilizar la tinción de Gram directa sobre los materiales clínicos para determinar si una muestra es representativa del sitio de infección. Esta técnica se aplica para la evaluación de las muestras de esputo. A partir del número de células epiteliales escamosas y de neutrófilos segmentados de las muestras de esputo teñidas con Gram en forma directa, Bartlett⁵ diseñó un sistema de graduación para evaluarlas (recuadro 1-4). En este sistema se le asignan números negativos a un frotis en el que se observan células epiteliales escamosas, lo cual indica la contaminación con secreción orofaríngea (saliva). Cuando se observa la presencia de neutrófilos segmentados se le asignan números positivos, que indican la presencia de inflamación activa. La magnitud de esta calificación negativa y positiva depende de la cantidad relativa de células epiteliales y neutrófilos segmentados, como se observa en el esquema del sistema de graduación de Bartlett. Un puntaje final de 0 o menor indica la ausencia de respuesta inflamatoria o la presencia de contaminación significativa con saliva y, por lo tanto, invalida la muestra. En la lámina en color 1-1 se observan microfotografías que ilustran este sistema de graduación en preparaciones de esputo con tinción de Gram.

Murray y Washington⁷² propusieron un sistema similar (recuadro 1-5). El número elevado de células epiteliales en los grupos 1 a 4 de este sistema indica contaminación con secreciones orofaríngeas e invalida la muestra. Sólo las muestras del

Recuadro 1-5 Sistema de clasificación de Murray y Washington para la evaluación de la calidad de las muestras de esputo

	Células epiteliales por campo de bajo aumento	Leucocitos por campo de bajo aumento
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	< 10	25

grupo 5 se consideran clínicamente relevantes. En un estudio clínico, Van Scoy¹¹³ recomendó que las muestras de esputo que contuvieran más de 25 neutrófilos se acepten para el cultivo aun si tenían más de 10 células epiteliales (grupo 4). Este criterio sugerido de evaluación ha sido valorado mediante su aplicación a muestras apareadas de secreciones respiratorias obtenidas por expectoración y por aspiración transtraqueal, una técnica que evita la contaminación con la flora de la orofaringe.⁷⁹

El sistema de graduación de los esputos no puede aplicarse si se sospechan infecciones pulmonares causadas por micobacterias, la mayoría de los hongos, especies de *Legionella* y virus. Además, el significado de la presencia de neutrófilos polimorfonucleares se altera en algunas situaciones: 1) cuando el paciente está neutropénico a causa de una enfermedad o de un tratamiento, 2) cuando el paciente no presenta una respuesta inflamatoria eficaz y 3) cuando un cuerpo extraño causa irritación de la superficie de la mucosa. La neutropenia puede ser el resultado de una deficiencia hereditaria o de que las células inflamatorias o sus precursores se destruyen por un proceso de enfermedad o por la quimioterapia para el tratamiento de una enfermedad. En ciertas condiciones, la capacidad de los neutrófilos de migrar hacia el sitio de la infección está disminuida. Es poco probable que el microbiólogo clínico pueda determinar si un paciente está neutropénico a partir de la información que le proporcionan los médicos. Una de las excepciones, que aún no se comprende con claridad, es la movilización deficiente de los neutrófilos observada en la infancia.²⁴ La edad exacta a la cual se puede instalar una respuesta de neutrófilos completa no está bien definida, pero en el caso de niños muy pequeños (menores de 2 meses) las decisiones de rechazar una muestra o de evaluar un aislamiento en forma incompleta no debe basarse en la ausencia de neutrófilos en la muestra.

Las dos situaciones en las que un cuerpo extraño modifica la interpretación acerca de los neutrófilos son la presencia de un catéter endotraqueal en las vías aéreas bajas o la de un catéter permanente, como un catéter de Foley, en el tracto urinario inferior. En cada una de estas situaciones la aparición de neutrófilos en la muestra puede reflejar irritación causada por el catéter en lugar de un agente infeccioso (a pesar de que ambos factores pueden estar presentes). En las vías aéreas, la inflamación puede originarse de una infección local (traqueítis) en vez de una neumonía, incluso si hay un elemento infeccioso. En el tracto urinario inferior, la presencia de leucocitos no puede utilizarse como indicador de infección clínica importante si se ha colocado un catéter en el lugar,¹⁰⁸ o incluso, si se realizaron cateterismos en forma intermitente.⁴⁰ La infección sintomática es el factor determinante para el tratamiento de una infección del tracto urinario en el paciente con cateterismo crónico (véase cap. 2). La presencia de neutrófilos en muestras respiratorias no puede utilizarse como indicador de neumonía; este diagnóstico se realiza en forma clínica y radiográfica, como se analiza en el capítulo 2.

Técnicas de microscopía. Se pueden utilizar diversas técnicas en el examen microscópico directo de la muestra clínica para demostrar la presencia de microorganismos o para observar ciertas características bioquímicas, fisiológicas o serológicas. Las técnicas más comunes en los laboratorios de microbiología clínica se enumeran en el cuadro 1-7. Como el índice de refracción de las bacterias y de otros microorganismos es similar al del medio de montaje, éstos no son visibles cuando se los examina con luz brillante. En consecuencia, se puede necesitar cierta manipulación de la fuente de luz. A menudo, es de gran ayuda reducir la cantidad de luz que ingresa en el campo a través del cierre del iris del diafragma, lo cual aumenta el con-

Cuadro 1-7 Técnicas para el análisis directo de muestras no teñidas

MÉTODOS Y MATERIALES	PROPÓSITO	TÉCNICAS
Preparación con solución fisiológica Cloruro de sodio, 0,85% (acuoso) Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos Mezcla parafina-vaselina (Vaspar®)	Para determinar la actividad biológica de los microorganismos, como movilidad y reacciones a ciertos químicos o reactividad serológica contra sueros específicos. Esto último incluye la reacción de hinchazón capsular de Neufeld usada para identificar diferentes tipos capsulares <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i>	Dispersar una pequeña cantidad de la muestra para ser examinada dentro de una gota de solución fisiológica en un portaobjetos de vidrio. Cubrir con un cubreobjetos y examinar directamente con un objetivo (de inmersión) del microscopio de 40 × o 100 ×, mientras se cierra el iris del diafragma para reducir la cantidad de luz transmitida. Para evitar que se seque, se realiza un círculo sobre el cubreobjetos con una pequeña cantidad de parafina-vaselina antes de cubrir la gota de muestra que se encuentra en el portaobjetos
Procedimiento de la gota gruesa Portaobjetos para gota gruesa (este es un portaobjetos de vidrio con un pocillo central cóncavo) Cubreobjetos Solución fisiológica o agua Mezcla parafina-vaselina	La preparación de la gota gruesa sirve para el mismo propósito que la preparación con solución fisiológica, excepto que existe menor distorsión debida al peso del cubreobjetos y puede lograrse un campo de foco más profundo dentro de la gota. Esta técnica se utiliza por lo general para el estudio de la movilidad bacteriana	Se coloca una pequeña cantidad de mezcla parafina-vaselina alrededor del reborde del pocillo en la superficie inferior del portaobjetos para gota gruesa. Se colocan las bacterias de una colonia que se va a examinar en el centro del cubreobjetos, dentro de una pequeña gota de agua o solución fisiológica. Se invierte el portaobjetos y se presiona sobre el cubreobjetos, guiando la gota de la suspensión bacteriana dentro del centro del pocillo. El portaobjetos se lleva con cuidado a la posición derecha para el examen directo con el microscopio
Preparación con yodo Solución yodada de Lugol: Cristales de yodo, 5 g Yoduro de potasio, 10 g Agua destilada, 100 mL Disolver el KI en agua y adicionar lentamente los cristales de yodo hasta su disolución. Filtrar y guardar en una botella con tapón apretado. Diluir 1:5 con agua antes de usar Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos	La preparación con yodo suele utilizarse en paralelo con la preparación de solución fisiológica cuando se examinan heces u otros materiales para la búsqueda de protozoos o huevos de helmintos intestinales. El yodo tiñe el núcleo y los orgánulos intracitoplasmáticos de manera que son más fáciles de visualizar. La preparación con yodo no pueden utilizarse en reemplazo de las preparaciones con solución fisiológica dado que el yodo paraliza la movilidad de bacterias y trofozoitos de protozoos	Una pequeña cantidad de materia fecal u otro material se mezcla en una gota de solución yodada en un portaobjetos. Esto se mezcla para formar una suspensión y se coloca un cubreobjetos sobre la gota. Luego, el preparado se examina directamente con el microscopio. Si el examen directo se rehusa o si se desea realizar una preparación semipermanente para un estudio futuro, los bordes del cubreobjetos pueden sellarse con una mezcla de parafina-vaselina
Preparación con hidróxido de potasio (KOH) Hidróxido de potasio, 10% (acuoso) Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos	La preparación con KOH se utiliza para ayudar en la detección de elementos fúngicos en materiales mucosos gruesos o muestras que contengan material queratinoso, como escamas de piel, uñas o pelos. El KOH disuelve el fondo de queratina y, por lo tanto, desenmascara los elementos fúngicos y los hace más evidentes	Se prepara una suspensión con las escamas de piel, uñas o pelos en una gota de KOH al 10%. Se coloca un cubreobjetos sobre la gota y se deja a temperatura ambiente por alrededor de media hora. El preparado se puede entonar suavemente a la llama de un mechero Bunsen para acelerar el proceso de clarificación. No hervir la preparación. Examinar con el microscopio para visualizar hifas fúngicas o esporas
Preparación con tinta china Tinta china (Pelikan®) o Nigrosina (granulur®) Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos	Las preparaciones con tinta china o nigrosina se utilizan para el examen microscópico directo de las cápsulas de muchos microorganismos. Los gránulos finos de la tinta china o la nigrosina dan un fondo semiopaqueo contra el cual las cápsulas claras son fáciles de visualizar. Esta técnica se utiliza sobre todo en la visualización de las grandes cápsulas de <i>Cryptococcus neoformans</i> en líquido cefalorraquídeo, esputo y otras secreciones	Se centrifuga ligeramente el líquido cefalorraquídeo u otra muestra líquida para concentrar cualquier microorganismo en el sedimento. Se emulsiona una pequeña cantidad del sedimento dentro de una gota de tinta china o nigrosina sobre un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos. No realizar la emulsión de contraste demasiado gruesa o la luz transmitida puede bloquearse por completo. Examinar el preparado directamente con el microscopio, usando el objetivo de 10 × para la búsqueda inicial y el objetivo de 40 × para la confirmación de sospecha de microorganismos encapsulados
Examen en campo oscuro Microscopio equipado con un condensador de campo oscuro Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos Solución fisiológica Palillos aplicadores o raspadores de étergla Mezcla parafina-vaselina	El análisis en campo oscuro se utiliza para visualizar ciertos microorganismos delicados que son invisibles en el examen microscópico con campo brillante óptico y se tiñen sólo con gran dificultad. Este método se utiliza sobre todo en la demostración de espiroquetas en chancros sífilíticos en los que se sospecha <i>Treponema pallidum</i>	Se obtiene del paciente la secreción para ser examinada. En el caso de un chancre, la costra de la superficie se raspa con bisturí y una pequeña cantidad del material seroso se coloca sobre un portaobjetos. Realizar un círculo sobre un cubreobjetos con una mezcla de parafina-vaselina y colocar sobre la gota de material

(Continúa)

Cuadro 1-7 Técnicas para el análisis directo de muestras no teñidas (cont.)

MÉTODOS Y MATERIALES	PROPÓSITO	TÉCNICAS
		Examinar el preparado directamente con el microscopio adaptado con un condensador de campo oscuro con objetivos de 40 × o 100 ×. Las espiroquetas aparecerán como "sacacorebos" móviles y brillantes contra un fondo negro
Reacción de hinchazón capsular de Neufeld Suero homólogo anticapsular Solución fisiológica Portaobjetos de vidrio, 7,5 × 2,5 cm Cubreobjetos	Cuando las especies de bacterias encapsuladas se ponen en contacto con un suero que contiene anticuerpos anticapsulares homólogos, sus cápsulas experimentan un cambio en el índice de refracción para producir "hinchazón" que es visible en el examen microscópico. El procedimiento serológico se utiliza para la identificación de varios tipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> en líquidos biológicos o en cultivos	Se dispersa el volumen de un ansa de material, como esputo emulsionado, líquido corporal o caldo de cultivo, sobre un área de 1 cm en dos lugares en los extremos opuestos de un portaobjetos de vidrio. El volumen de un ansa de suero anticapsular específico de tipificación se dispersa sobre el área de una de las preparaciones secas, se recubre el área opuesta con un ansa de solución fisiológica que sirve como control. Cada área se recubre con un cubreobjetos y se examina con el microscopio usando un objetivo de 100 × (de inmersión). Los microorganismos que muestran una reacción positiva aparecen rodeados con un halo esmerilado, refractario que corresponde a la hinchazón de la cápsula. Compare la preparación de la prueba con un control con solución fisiológica donde no existe hinchazón capsular

* Disponible en Harleco Co., Filadelfia, PA.

traste entre el objeto que se está observando y el fondo. Se debe desalentar la práctica habitual de bajar el condensador para lograr este efecto.

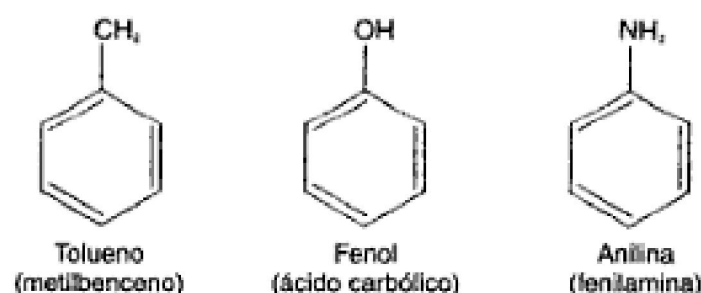
Tinciones directas. Para visualizar las bacterias de manera adecuada y demostrar los detalles finos de sus estructuras internas, en general se requieren tinciones biológicas. La introducción de las tinciones a mediados del siglo XIX fue, en gran parte, responsable de los principales avances que tuvieron lugar en la microbiología y en otros campos de la microscopía de diagnóstico durante los últimos 100 años. Hoy dependemos tanto de las tinciones biológicas que es difícil darse cuenta cómo hubiera progresado el estudio de las bacterias sin su implementación. En el cuadro 1-8 se enumeran las fórmulas químicas, los componentes y las aplicaciones de las tinciones que se utilizan con mayor frecuencia en el laboratorio microbiológico.

Las tinciones consisten en preparaciones acuosas u orgánicas de colorantes o grupos de colorantes que proporcionan una variedad de colores a los microorganismos y a los tejidos vegetales y animales, u otras sustancias de importancia biológica. Los colorantes pueden utilizarse como tinciones directos de materiales biológicos, como indicadores de cambios de pH en los medios de cultivo, como indicadores de oxidación-reducción para demostrar la presencia o la ausencia de condiciones anaerobias o para demostrar las funciones fisiológicas de los microorganismos utilizando las técnicas denominadas supravitales.

Casi todos los colorantes con utilidad biológica son derivados del alquitrán de hulla. La estructura química básica de la mayoría de los colorantes es el anillo de benceno. Los colorantes están compuestos, en general, por dos o más anillos de benceno conectados por enlaces químicos bien definidos (cromóforos) que se asocian con la producción de color. A pesar de que el mecanismo subyacente del desarrollo del color no se comprende por completo, en teoría, ciertos radicales químicos tienen la propiedad de absorber la luz a diferentes longitudes de

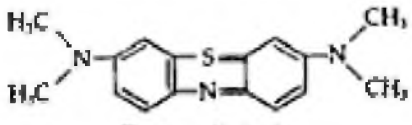
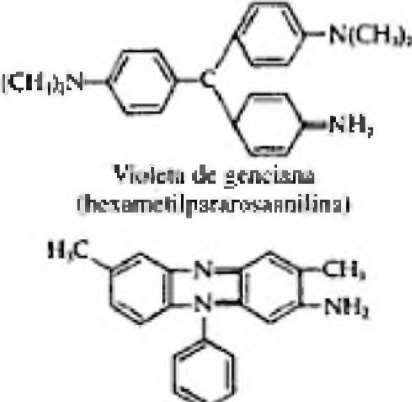
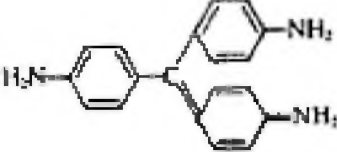
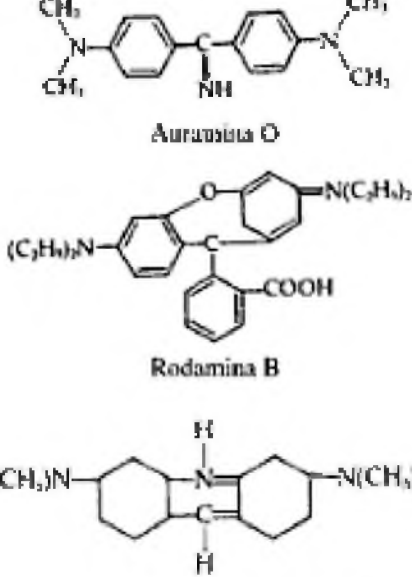
onda y actúan así como prismas químicos. Algunos de los grupos cromóforos más comunes que se encuentran en los colorantes son: C=C, C=O, C=S, C=N, N=N, N=O y NO₂. (Nótese la presencia de estos grupos en las fórmulas químicas de los colorantes que se muestran en el cuadro 1-8). La intensidad del color de un colorante es proporcional al número de radicales cromóforos presentes en el compuesto.

Los colorantes difieren unos de otros en el número y el ordenamiento de estos anillos y en la sustitución de los átomos de hidrógeno con otras moléculas. Por ejemplo, existen tres sustituciones únicas claves para un átomo de hidrógeno del benceno que constituyen la estructura básica de la mayoría de los colorantes: 1) sustitución con un grupo metilo para formar tolueno (metilbenceno), 2) sustitución con un grupo hidroxilo para formar fenol (ácido carbólico) y 3) sustitución con un grupo amino para formar anilina (fenilamina). La mayoría de los colorantes utilizados en microbiología son derivados de la anilina y por eso se denominan colorantes anilina.



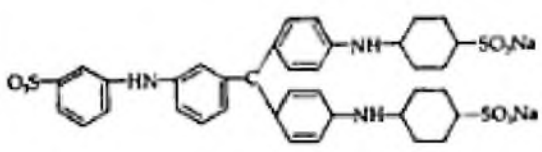
Todos los colorantes biológicos tienen alta afinidad por el hidrógeno. Cuando todos los sitios de la molécula que pueden unir hidrógeno están completos, el colorante se encuentra en su estado reducido y, por lo general, es incoloro. En este estado, se lo denomina compuesto leuco. Siguiendo con este razonamiento, pero de manera opuesta, un colorante retiene su color sólo en la medida en que su afinidad por el hidrógeno no esté

Cuadro 1-8 Tinciones biológicas comunes utilizadas en bacteriología

TINCIÓN	FÓRMULA QUÍMICA	INGREDIENTES	PROPÓSITO
Azul de metileno de Loeffler	 Tetrametil tionina	Azul de metileno 0.3 g Alcohol etílico, 95% 30 mL Agua destilada 100 mL	Esta es una tinción simple y directa utilizada para una variedad de microorganismos. se utiliza específicamente para detectar bacterias en frotis de líquido cefalorraquídeo en casos de sospecha de meningitis bacteriana.
Tinción de Gram	 Violeta de genciana (hexametilparosanilina) Dimetil feno-safranina	Violeta de genciana 2 g Violeta de genciana 20 mL Alcohol etílico, 95% 20 mL Oxalato de NH ₄ 0.8 g Agua destilada 100 mL Yoduro de Gram Yoduro de potasio 2 g Cristales de yodo 1 g Agua destilada 100 mL Decolorante Acetona 50 mL Alcohol etílico, 95% 50 mL Contracoloración Safranina O 2.5 g Alcohol etílico, 95% 100 mL Adicionar 100 mL al agua destilada 100 mL	Esta es una tinción diferente que se utiliza para demostrar las propiedades de tinción de bacterias de todo tipo. Las bacterias grampositivas retienen el colorante violeta de genciana luego de la decoloración y se observan de color azul intenso. Las bacterias gramnegativas no son capaces de retener la tinción de violeta de genciana luego de la decoloración y se tiñen de rojo con el colorante safranina. Las características de la tinción de Gram pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos, muertos o degenerados. Tinción de formas quísticas de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (modificación de Gram-Weigert)
Tinción de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes	 Carbolfucsina (trinitrotrifenilmetano)	Carbolfucsina 2.5 mL Cristales de fenol 5 mL Alcohol, 95% 0.5 g Fucsina básica 100 mL Agua destilada 3% HCl, concentrado 3 mL Alcohol, 70% 100 mL Azul de metileno 0.5 g Azul de metileno 0.5 mL Ácido acético glacial 100 mL Agua destilada	Los bacilos ácido-alcohol resistentes se denominan así porque están recubiertos por una cubierta cerosa que es resistente a la tinción. Se requiere calor o un detergente (Tergitol®) para permitir que el colorante penetre la cápsula. Una vez teñidas, estas bacterias resisten la decoloración, mientras que otras bacterias se destiñen con ácido-alcohol.
Fluorocromo	 Auramina O Rodamina B Naranja de acridina (AO)	Auramina O 1.5 g Rodamina B 0.75 g Glicerol 75 mL Fenol 10 mL Agua destilada 50 mL AO en polvo 20 mg Buffer acetato de sodio (pH 3.5) (Adicionar alrededor de 90 mL de HCl 1 M a 100 mL de acetato Na 1 M) 190 mL	Este colorante fluorocromo tiñe selectivamente micobacterias porque se une a los ácidos micólicos de la pared celular. Esta tinción muestra mejor a la micobacterias que la tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes convencional y permite el cribado de los frotis a bajo aumento porque los organismos se ven más fácilmente. El naranja de acridina es una coloración particularmente adaptada para la demostración de bacterias en hemocultivos, frotis de líquido cefalorraquídeo y uretrales u otros exudados donde pueden estar presentes en un relativo bajo número, tanto como 10 ⁴ UFC/mL, o cuando son oscurecidos por un fondo intenso de leucocitos polimorfonucleares u otros desechos. A un pH por debajo de 4, las bacterias y las levaduras se tiñen de naranja brillante contra un fondo negro, verde claro o amarillo.

(Continúa)

Cuadro 1-8 Tinciones biológicas comunes utilizadas en bacteriología (cont.)

TINCIÓN	FÓRMULA QUÍMICA	INGREDIENTES	PROPÓSITO
Wright-Giemsa	Azul de metileno policromático Azul de metileno Azur de metileno Eosina  Azul B de metileno	Colorante de Wright en polvo 9 g Colorante de Giemsa en polvo 1 g Glicerina 90 mL Alcohol metílico absoluto 2 910 mL Mezclar en una botella color caramelo y dejar reposar un mes antes de usar	La tinción de Wright-Giemsa se utiliza comúnmente para teñir los elementos celulares de frotis de sangre periférica. Es útil en microbiología para demostrar la presencia de organismos intracelulares como <i>Histoplasma capsulatum</i> y las especies de <i>Leishmania</i> (véase lámina en color 1-2G). La tinción también es de uti- lidad para demostrar inclusiones intrace- lulares en frotis directos de piel o mucos- sas, como raspados de córnea para tracoma
Azul de anilina en lactofenol	 Azul de anilina	Cristales de fenol 20 g Ácido láctico 20 g Glicerol 40 mL Agua destilada 20 mL Disolver los ingredientes, luego adicionar: Azul de anilina 0,05 g	El colorante es fuertemente ácido debido a los grupos sulfónicos y ha sido utilizado como contraincoloración para tejidos no fijados, bacterias y protozoos, en combi- nación con otros colorantes. Actualmente se utiliza para la tinción directa de miceli- os fúngicos y estructuras de fructifica- ción, las cuales toman un delicado color azul claro

satisfecha por completo. Dado que el oxígeno suele tener mayor afinidad por el hidrógeno que muchos colorantes, se retiene color en presencia de aire. Esto permite la utilización de ciertos colorantes, como el azul de metileno, como indicadores de oxidación-reducción en ambientes anaerobios, dado que el indicador se vuelve incoloro en ausencia de oxígeno.

En términos generales, los colorantes se clasifican como ácidos o básicos; esta denominación no indica necesariamente su pH de reacción en solución, sino en cambio, si una parte significativa de la molécula es aniónica o catiónica. Desde el punto de vista práctico, los colorantes básicos tiñen estructuras ácidas, como la cromatina del núcleo de las células; los colorantes ácidos reaccionan con sustancias básicas, como las estructuras citoplasmáticas. Si en un preparado se quieren teñir las estructuras del núcleo y del citoplasma, se pueden utilizar combinaciones de colorantes ácidos y básicos. Un ejemplo común es la hematoxilina (básica) y la eosina (ácida), o coloración H y E, utilizada para el análisis de cortes de tejido.

Utilización de colorantes en microbiología. Es conveniente que los microbiólogos realicen un análisis microscópico directo de las muestras enviadas para cultivo. Esto no sólo le puede proporcionar al médico un rápido diagnóstico presuntivo, sino además, la detección de microorganismos específicos puede servir como guía para seleccionar el medio de cultivo adecuado y suministrar un valioso control de calidad comparativo con los aislamientos obtenidos. En el cuadro 1-9 se enumeran, sobre una selección de muestras que se envían en forma habitual a los laboratorios de microbiología, los hallazgos positivos de varios procedimientos de tinción y las enfermedades asociadas. A continuación se hace una breve descripción de las tinciones más utilizadas.

Tinción de Gram. La tinción de Gram, descubierta hace poco más de 100 años por Hans Christian Gram, suele utilizarse para el examen directo por microscopía de las muestras y los subcultivos (en el cuadro 1-8 se puede hallar la fórmula). En el recuadro 1-6 se explica el procedimiento de la tinción.

El violeta de genciana (cristal violeta) es el colorante principal; se une a la pared bacteriana luego del tratamiento con una solución débil de yoduro, que actúa como mordiente para fijar el colorante. Algunas especies de bacterias, como consecuencia de la naturaleza química de sus paredes celulares, tienen la capacidad de retener el violeta de genciana aun luego del tratamiento con un decolorante orgánico, como la mezcla de partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%. Las bacterias que retienen el colorante aparecen de color azul-negro cuando se observan con el microscopio y se denominan grampositivas. Ciertas bacterias pierden el colorante principal violeta de genciana cuando se las trata con el decolorante, debido tal vez al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias cambian de color, toman la contraincoloración de safranina y aparecen de color rojo vistas con el microscopio: son las gramnegativas (lámina en color 1-2A). Se puede mejorar la visualización de ciertos bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales mediante el agregado de 0,05% de carbofucsina al contraincolorante safranina. Esta reacción de Gram puede emplearse para hacer identificaciones presuntivas cuando se la utiliza en forma conjunta con la observación de la morfología (cocos y bacilos) y con la disposición bacteriana.

Friedly ha revisado las aplicaciones comunes de la tinción de Gram.³⁴ Los cocos grampositivos dispuestos en grupos sugieren estafilococos; la disposición en cadena indica estreptococos. Los diplococos grampositivos, con forma de lanceta son característicos de *Streptococcus pneumoniae* cuando se los observa en los frotis de muestras de esputos; estas características no pueden utilizarse como diagnósticas en otras muestras ya que la apariencia de los enterococos es similar. Los diplococos gramnegativos arriñonados son característicos de las especies de *Neisseria*. Los bacilos grandes grampositivos denotan especies de *Bacillus* o *Clostridium*; los bacilos pequeños grampositivos sugieren especies de *Listeria* o alguna de las corineformes (diferoides) si se observan ordenamientos similares a las "letras chinas". Los bacilos gramnegativos curvos en

Cuadro 1-9 Diagnóstico de enfermedades infecciosas por análisis directo de muestras de cultivo

MUESTRAS	ENFERMEDAD SUPUESTA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	HALLAZGOS POSITIVOS
Cultivo faríngeo	Difteria	Tinción de Gram	Delicados bacilos grampositivos pleomórficos en una disposición similar a letras chinas
		Tinción con azul de metileno	Bacilos teñidos de azul claro; con gránulos metacromáticos prominentes
	Faringitis estreptocócica aguda	Técnica de fluorescencia directa con anti-cuerpo (luego de 4-6 horas de incubación en caldo de Todd-Hewitt)	Cocos encadenados fluorescentes; usar controles positivos y negativos en cada tinción
Úlceras orofaríngeas	Enfermedad de Vincent	Tinción de Gram	Presencia de bacilos gramnegativos y bacilos delgados con forma de espiral
Espasmo Aspirados transtraqueales Lavados bronquiales	Neumonía bacteriana	Tinción de Gram	Variedad de tipos bacterianos; <i>Streptococcus pneumoniae</i> con cápsulas particularmente diagnósticas
	Tuberculosis Micosis pulmonar	Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes Tinción de Gram, tinción de Wright-Giemsa o blanco de calcofluor Tinción de Gram-Weigert	Bacilos ácido-alcohol resistentes Levaduras en brotación, pseudohifas, hifas verdaderas o cuerpos de fructificación
Lesiones cutáneas o drenajes purulentos de senos subcutáneos	Celulitis bacteriana	Tinción de Gram	Variedad de tipos bacterianos; sospecha de especies anaerobias
	Gangrena gaseosa (mionecrosis)	Tinción de Gram	Bacilos grampositivos que sugieren <i>Clostridium perfringens</i> ; usualmente no se observan esporas
	Micetoma actinomicótico	Preparación directa con solución fisiológica Tinción de Gram o tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes modificada	"Gránulos sulfurados" Delicados filamentos ramificados grampositivos; las especies de <i>Nocardia</i> pueden ser débilmente ácido-alcohol resistentes
	Micetoma eumicótico	Preparación directa con solución fisiológica Tinción de Gram o montaje azul de algodón en lactofenol	Gránulos blancos, grisáceos o negros Hifas verdaderas con ramificación focal o clamidosporos
Líquido cefalorraquídeo	Meningitis bacteriana	Tinción de Gram	Bacilos gramnegativos pleomórfos pequeños (<i>Haemophilus influenzae</i>) Diplococos gramnegativos (<i>Neisseria meningitidis</i>) Diplococos grampositivos (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) Formas bacterianas que se tiñen azul-negro
		Tinción con azul de metileno	
		Tinción con naranja de acridina	Formas bacterianas que resplandecen naranja brillante bajo iluminación ultravioleta
	Meningitis neumocócica	Reacción de hinchazón capsular de Neufeld (amistado tipo específico)	Hinchazón o apariencia de vidrio esmerilado de las cápsulas bacterianas
	Meningitis criptocócica	Tinta china o preparación con nigrosina	Levaduras encapsuladas con brotes unidos por una hebra fina
	Listeriosis	Tinción de Gram Preparación de la gota gruesa	Bacilos grampositivos delicados Bacterias con movilidad "en paraguas" (tumbling)
Orina	Infección por levaduras	Tinción de Gram o tinción de Wright-Giemsa	Pseudohifas o levaduras en brotación
	Infección bacteriana	Tinción de Gram	Variedad de tipos bacterianos
	Leptospirosis	Examen en campo oscuro	Espiroquetas levemente espiraladas móviles

(Continúa)

Cuadro 1-9 Diagnóstico de enfermedades infecciosas por análisis directo de muestras de cultivo (cont.)

MUESTRAS	ENFERMEDAD SUPUESTA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	HALLAZGOS POSITIVOS
Secreción uretral-purulenta	Gonorrea	Tinción de Gram	Diplococos gramnegativos intracelulares
	Infección por <i>Chlamydia</i>	Técnica de fluorescencia directa con anti-cuerpo del frotis	Cuerpos elementales
Secreción vaginal purulenta	Infección por levaduras	Examen directo o con tinción de Gram	Pseudohifas o levaduras en brotación
	Infección por tricomonas	Examen directo	Flagelados con rápida movilidad
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Tinción Pap o tinción de Gram Medición del pH de las secreciones vaginales	Células epiteliales cubiertas con cocoecilus (<i>células clave</i>) o pH vaginal > 5,5
Úlcera de pene o vaginal (chancro)	Sífilis primaria	Montaje para el examen en campo oscuro de la secreción del chancro	Espiroquetas fuertemente espiraladas móviles
	Chancroide	Tinción de Gram de la secreción de la úlcera o del aspirado del bubón (forúnculo) inginal	Bacilos pequeños gramnegativos intracelulares o extracelulares
Ojo	Conjuntivitis purulenta	Tinción de Gram	Variedad de especies bacterianas
	Tracoma	Tinción de Giemsa del raspado de córnea	Agrupamientos de inclusiones perinucleares intracelulares
Heces	Enterocolitis purulenta	Tinción de Gram	Neutrófilos y agregados de estafilococos
	Cólera	Examen directo con agua peptonada alcalina de enriquecimiento	Bacilos con movilidad rápida característica; sin neutrófilos
	Enfermedad parasitaria	Examen directo con solución fisiológica o yodo	Parásitos adultos o fragmentos de parásitos; protozoos o huevos
Raspado de piel, fragmentos de uñas o pelos extraídos	Dermatofitosis	Examen de las muestras obtenidas por purgas	Hifas delicadas o agrupamiento de esporas
	Tiña versicolor	Preparación con KOH al 10%	Hifas y esporas que se asemejan a espaguetis y albóndigas
Sangre	Fiebre recurrente (<i>Borrelia</i>)	Preparación con KOH al 10% o con azul de algodón en lactofenol	Espiroquetas con morfología típica
	Parásitos sanguíneos: paludismo, tripanosomiasis, filariasis	Tinción de Wright o de Giemsa Examen en campo oscuro Tinción de Wright o de Giemsa Examen directo de sangre anticoagulada para la búsqueda de microfilarias	Parásitos intracelulares (plasmodium, babesia) Formas extracelulares: tripanosomas o microfilarias

muestras de heces diarreicas indican especies de *Vibrio*, o si también se ven formas de sacacorchos sugieren especies de *Campylobacter*. Los bacilos gramnegativos son las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos e incluyen *Enterobacteriaceae*, bacilos no fermentadores, especies de *Haemophilus* y una variedad con requerimientos nutricionales especiales. En la lámina en color 1-3 se incluyen imágenes seleccionadas de tinciones de Gram, las cuales se analizarán con mayor detalle en una sección posterior de este capítulo.

La tinción de Gram es un procedimiento engañosamente simple. Puede realizarse en forma rápida y fácil. Sin embargo, la preparación e interpretación de los frotis es otro tema. Es esencial una considerable experiencia y un cuidadoso entrena-

miento para su ejecución correcta. Un observador casual no lo hará tan bien como alguien que mira regularmente las tinciones y tiene la oportunidad de cotejar los hallazgos morfológicos con los resultados del cultivo. Un ejemplo excelente de este hecho es un interesante estudio que comparó el desempeño del personal del hospital respecto de los microbiólogos experimentados en el diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad.³¹ El personal del hospital fue mejor para obtener el esputo purulento que el personal de enfermería, pero la preparación e interpretación de los frotis fue inferior a la de los microbiólogos.

Algunas razones técnicas y microbiológicas justifican la importancia de la experiencia. La mayoría de las veces la morfología de las bacterias coincide con las descripciones clási-

Recuadro 1-6 Técnica de la tinción de Gram

1. Realice un frotis fino del material de estudio y déjelo secar al aire.
2. Fije el material al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero Bunsen, de manera que el material no se lave durante la tinción. Algunas personas ahora recomiendan la utilización de alcohol para la fijación de material para teñir con tinción de Gram (cubrir el frotis por completo con metanol o etanol durante algunos minutos).
3. Coloque el frotis en un soporte para tinción y recubra la superficie con solución de violeta de genciana.
4. Luego de 1 minuto (se puede utilizar menos tiempo con algunas soluciones) de exposición al colorante violeta de genciana, lave exhaustivamente con agua destilada o buffer.
5. Cubra el frotis con solución yodada de Gram durante 1 minuto. Nuevamente, lave con agua.
6. Sujete el frotis entre el pulgar y el dedo índice e impregne la superficie con unas gotas de decolorante alcohol-acetona, hasta que el lavado deje de tener color violeta. Esto suele tomar 10 segundos o menos.
7. Lave con agua corriente y coloque el frotis nuevamente en el soporte para tinción. Cubra la superficie con la tinción de safranina durante 1 minuto. Lave con agua corriente.
8. Coloque el frotis en posición vertical en el soporte para tinción, para permitir que el exceso de agua drene y el frotis se seque.
9. Examine el frotis teñido bajo el objetivo de 100 x (de inmersión) de un microscopio. Las bacterias grampositivas se tiñen de azul oscuro; las bacterias gramnegativas aparecen de color rosa o rojo.

cas. Lamentablemente, las bacterias no siempre leyeron el reglamento. Los microbiólogos con buen entrenamiento, práctica y deseos de aprender de los errores pueden superar las

dificultades. En el cuadro 1-10 se resumen algunas de las “trampas” clásicas que puede presentar la tinción de Gram. La regla esencial es que la interpretación final debe hacerse sobre la base del color de la tinción, la morfología bacteriana y las variantes que se conocen. Para complicar aún más la situación, diversos artefactos pueden asemejarse a los agentes infecciosos y ser informados de manera errónea como microbios. En la lámina en color 1-4 se ilustran algunas de estas posibles fuentes de error. Si se considera la posibilidad de un artefacto, una estrategia es teñir otro frotis con naranja de acridina (véase más adelante); con esa tinción se puede establecer si la estructura contiene DNA, y por lo tanto, es biológica. A pesar de que el procedimiento es simple, el paso de cambio de color puede ocasionar problemas si no se realiza de manera adecuada. Si se utiliza acetona como decolorante, debe tenerse especial cuidado porque actúa en forma muy rápida. El cambio de color insuficiente puede controlarse observando el núcleo de las células inflamatorias; si éstas no están completamente gramnegativas, el cambio de color del frotis no se realizó en forma adecuada. La única receta para detectar un exceso en el cambio de color es la comparación entre la reacción de Gram y la morfología de la bacteria. Si el programa de aseguramiento de la calidad (véase más adelante) incluye una revisión de los frotis que no se correlacionan con los cultivos, es posible detectar el cambio de color inadecuado y los artefactos no bacterianos que se informaron de manera errónea y el observador puede aprender del error.

La tinción de Gram también puede aplicarse a la identificación de formas no bacterianas, como tricomonas, larvas de strongiloides, quistes de *Pneumocystis jirovecii* (carinii) y trofozoitos de *Toxoplasma gondii*, aunque no es tan sensible como otras tinciones especiales que se utilizan para visualizar estos microorganismos. Estas diversas aplicaciones demuestran la versatilidad de la tinción de Gram.

Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes. Las micobacterias están recubiertas con un material grueso y ceroso resistente a la tinción. Sin embargo, una vez que se tiñen, las bacterias resis-

Cuadro 1-10 Dificultades en la interpretación de la tinción de Gram

MICROORGANISMO	PRESENTACIÓN CLÁSICA	VARIANTE DE PRESENTACIÓN	COMENTARIOS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Diplococos grampositivos con forma de lanceta	Cocos alargados, semejantes a bacilos cortos	Puede ser mal interpretado como una mezcla de microorganismos
Especies de <i>Acinetobacter</i>	Cocobacilos gramnegativos	Cocos gramnegativos	Puede confundirse con especies de <i>Neisseria</i> e informarse como cocos gramnegativos; buscar el frotis para comprobar la presencia de algunos microorganismos que demuestren las formas alargadas, las cuales no han sido vistas en las especies de <i>Neisseria</i>
		Cocos grampositivos	Puede confundirse con <i>Streptococcus pneumoniae</i> e informarse como cocos grampositivos; cuando a la forma de coco las células retienen fuertemente el cristal violeta durante la decoloración
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacilos grampositivos en tándem	Bacilos gramnegativos o con tinción de Gram variable	Puede confundirse con bacilos gramnegativos; la forma de vagón es un indicio de que el organismo es grampositivo; otros clostridios y las especies de <i>Bacillus</i> pueden también aparecer en forma similar
Levaduras, especialmente <i>Cryptococcus neoformans</i>	Células grampositivas redondas u ovales con brotaciones	Células con tinción de Gram variable	Puede confundirse con artificios; el tamaño y la forma los distinguen de las bacterias

ten el cambio de color con solventes orgánicos fuertes, como el ácido-alcohol. En consecuencia, se las conoce como bacilos ácido-alcohol resistentes, un fenómeno descrito por primera vez en 1881 por Ziehl y Neelsen.

Para esta tinción se requiere un tratamiento especial con el fin de que el colorante primario, la carbolfucsina, penetre el material ceroso de los bacilos ácido-alcohol resistentes. En la técnica convencional de Ziehl-Neelsen se utiliza el calor. Luego de que la superficie del frotis que se va a teñir se cubre con una capa de carbolfucsina, se flamea por debajo del portaobjetos con la llama de un mechero Bunsen hacia adelante y hacia atrás. El frotis se calienta hasta que se observa la presencia de vapor, justo antes de que hierva. La modificación de la tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes realizada por Kinyoun se denomina "método frío", porque se utiliza un detergente tensioactivo, como Tergitol®, en lugar del tratamiento con calor.

Con cualquiera de estas tinciones, los bacilos ácido-alcohol resistentes aparecen de color rojo contra un fondo verde o azul, según el contracolor utilizado (lámina en color 1-2B). A pesar de que este método es satisfactorio para la mayoría de las micobacterias, ciertas cepas de bacilos ácido-alcohol resistentes débiles de especies de rápido crecimiento (complejo *Mycobacterium fortuitum/chelonae*) se pueden teñir mejor con el método de Ziehl-Neelsen (en el capítulo 19 se encuentra un análisis más detallado). Además, ciertas bacterias, como las especies de *Nocardia*, muestran de manera característica una débil o parcial tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes.

Tinciones por fluorescencia. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el isetionato de tetrametilrodamina (TMR) son dos fluorocromos utilizados con frecuencia, que en su estado excitado por acción de la luz ultravioleta o visible de corta longitud de onda emiten ondas de luz en el espectro visible, con una absorción máxima de 490 nm y 555 nm, respectivamente. Estos fluorocromos se unen químicamente con diversas proteínas, como antígenos y anticuerpos, y funcionan como una etiqueta o marca a través de la cual se pueden visualizar las reacciones inmunitarias en frotis directos de líquidos biológicos o secreciones, o en cortes de tejidos. La variación en la relación fluorocromo/proteína de los diferentes reactivos permite lograr una óptima tinción de los objetos deseados con un mínimo de fondo no específico. El desarrollo actual de los anticuerpos monoclonales, que son monoespecíficos para sus antígenos respectivos, condujo a la preparación de reactivos fluorescentes para la detección directa o indirecta de numerosos patógenos: *Chlamydia trachomatis*, especies de *Legionella*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* y varios virus, como varicela-zóster, herpes simple, influenza, citomegalovirus y sincitial respiratorio, entre otros.

La microscopia de fluorescencia es una técnica minuciosa que requiere un microscopio de alta calidad, la combinación adecuada de los objetivos, condensadores de campo brillante y oscuro, un arco de mercurio o una fuente de luz ultravioleta halógena y la combinación adecuada de los filtros de excitación y barrera o supresión.²¹ Los objetivos acromáticos son apropiados para la mayoría de las aplicaciones, excepto en investigación, en que pueden requerirse lentes apocromáticas de mayor costo para alcanzar el máximo de iluminación y resolución. Para un rendimiento óptimo es crítica la selección de portaobjetos y cubreobjetos de grosor adecuado y la utilización de aceites de inmersión y líquidos de montaje de baja fluorescencia.

La elección de los filtros para el microscopio de fluorescencia también es decisiva para un trabajo exitoso. Se requieren cuatro filtros en forma secuencial: 1) uno que absorba el calor

(para evitar el daño al filtro excitador), 2) un filtro excitador con un ancho de banda de onda apropiado para la longitud de onda de la luz que produce el fluorocromo excitado, 3) un filtro que absorba el color rojo para bloquear cualquier luz roja que emitan los filtros de excitación azul y 4) un filtro barrera para que absorba cualquier luz residual de excitación incidental de corta longitud de onda (que dañaría los ojos del operador del microscopio) y que permita sólo el pasaje de la luz visible de mayor longitud de onda. El rendimiento subóptimo de un microscopio de fluorescencia se debe a menudo a la mala selección de la combinación de los filtros. Los fabricantes de microscopios proporcionan la información y el asesoramiento de modo que los usuarios puedan obtener un rendimiento óptimo. Hoy se comercializan, con un precio aceptable para la mayoría de los laboratorios clínicos, los sistemas de fluorescencia que utilizan 1) epiluminación, 2) lámparas halógenas de luz azul que no requieren transformadores de alto costo y 3) filtros de interferencia con máximos picos de absorción con longitudes de onda visibles más largas.

Tinciones con fluorocromos para micobacterias. Para demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes se pueden utilizar los fluorocromos colorantes auramina y rodamina. Los bacilos aparecen de color amarillo, rojo o naranja cuando se los observa con el microscopio de fluorescencia (según la combinación de filtros y los colorantes utilizados) y el fondo es oscuro si se emplea permanganato de potasio como contracoloración (lámina en color 1-2C). La utilización del procedimiento de fluorescencia facilita el examen de los frotis, sobre todo con un objetivo de 25 ×. Este objetivo proporciona un aumento lo suficientemente bajo como para examinar campos microscópicos amplios, y lo suficientemente alto para ver los puntos de luz amarilla que emanan de las bacterias fluorescentes (lámina en color 1-2C). Se puede utilizar mayor aumento para confirmar los objetos sospechosos observados con la lente de 25 ×.

La tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes se puede utilizar también para la identificación de microorganismos diferentes de las micobacterias. Los ovocitos de las especies de *Cryptosporidium* y de *Isospora belli*, dos microorganismos coccídeos que han resultado importantes agentes etiológicos de las gastroenteritis, son ácido-alcohol resistentes y pueden detectarse con facilidad en preparaciones de heces teñidas de manera adecuada (lámina en color 1-2J).

Naranja de acridina. La tinción con naranja de acridina (NA) se está utilizando cada vez más en los laboratorios de microbiología para detectar bacterias en frotis preparados de líquidos y exudados, en los cuales se espera que las bacterias se hallen en baja concentración (10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias [UFC]/mL) o están atrapadas dentro de un denso agregado de desechos del fondo, lo cual dificulta visualizarlas mediante los procedimientos de tinción convencionales. En un principio, la tinción con NA fue utilizada por los microbiólogos para demostrar la presencia de bacterias en muestras de tierra. En forma similar a cuando se aplican colorantes fluorocromos para el estudio de los bacilos ácido-alcohol resistentes, los frotis teñidos con NA y examinados bajo luz ultravioleta pueden ser explorados de manera más rápida y eficiente con bajo aumento (100 ×) y se examinan con aumento de 450 × o mayor cuando se visualizan formas sospechosas. Esta tinción detecta bacterias vivas y muertas, pero no indica si son grampositivas o gramnegativas. Una vez que la bacteria se ha sido detectada utilizando la tinción con NA, se debe aplicar tinción de Gram para establecer sus características diferenciales de tinción (lámina en color 1-2D).

Recuadro 1-7 Preparación de una tinción NA

Ingredientes: NA en polvo 20 mg, buffer acetato de sodio 290 mL, HCl 1 M

Preparación del reactivo: agregar 20 mg de NA en polvo (JT Backer Chemical Co, Philipsburg NJ) a 290 mL de buffer acetato de sodio (solución de reserva 100 mL de 2 molar [M] $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 90 mL de 1 M HCl); el HCl 1 M debe agregarse en cantidad suficiente para mantener la tinción diferencial de las bacterias contra el fondo de desechos.⁴⁶ La solución debe ser almacenada en una botella color caramelo a temperatura ambiente.

Procedimiento: la tinción se realiza cubriendo completamente la superficie del frotis del material para ser examinado, previamente fue secado al aire y fijado con metanol, con el colorante NA durante 2 minutos, seguido por un lavado con agua corriente. Los portaobjetos teñidos se secan y examinan con un microscopio equipado con una fuente de luz ultravioleta.

Lauer y cols. encontraron que la tinción con NA es más sensible que la de Gram para detectar bacterias en los sedimentos de LCR, sobre todo cuando están presentes bacterias gramnegativas.⁴⁶ La tinción con NA también es útil para el análisis de muestras de orina en busca de bacteriuria significativa.⁴⁷ En el recuadro 1-7 se esquematiza la preparación de la tinción con NA.

Azul de toluidina y azul de metileno. El azul de toluidina, un colorante muy relacionado con el azul A y el azul de metileno, se utiliza para teñir improntas de biopsias de pulmón y frotis de secreciones respiratorias para la detección de *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) en forma rápida. Las tinciones con azul de metileno se pueden realizar sobre sedimentos de líquido cefalorraquídeo en forma conjunta con la tinción de Gram. Las bacterias gramnegativas *H. influenzae* y *N. meningitidis*, no suelen resaltar sobre el fondo teñido de rojo en la tinción de Gram. Con el azul de metileno, los leucocitos polimorfonucleares se tiñen de azul y las bacterias que también se tiñen de azul intenso son más fáciles de detectar contra el fondo teñido de gris claro (lámina en color 1-2E). La tinción con azul de metileno debería considerarse un complemento de la tinción de Gram en los laboratorios donde la falta de acceso al microscopio de fluorescencia imposibilita la utilización del procedimiento de tinción con NA.

Blanco de calcoflúor. El blanco de calcoflúor, un colorante incoloro utilizado en la industria para blanquear telas y papeles, tiene dos propiedades que lo hacen útil en microbiología: 1) la unión a los polisacáridos con uniones β 1-3 o β 1-4 (específicamente a la celulosa y a la quitina) y 2) la fluorescencia cuando es expuesto a luz ultravioleta de longitudes de onda larga y a la luz visible de longitud de onda corta. El blanco de calcoflúor es una valiosa tinción con fluorocromo para la detección rápida de hongos en preparados húmedos, frotis y cortes de tejido, debido a que la pared celular de los hongos y las plantas es rica en quitina. Esta tinción ha sido útil principalmente en la detección de levaduras, hifas y pseudohifas en raspados de piel y de mucosas. Cuando se lo mezcla con hidróxido de potasio al 10%, se puede realizar la búsqueda rápida de dermatofitos en los montajes de raspado de piel. Las estructuras fúngicas muestran un color verde manzana brillante o un blanco azulado fantasmal, según la longitud de onda de la luz de

excitación y de la combinación de filtros utilizada, cuando se las observa con el microscopio bajo luz ultravioleta (lámina en color 1-2F). Los hongos se diferencian con facilidad de los desechos del fondo, las células y los fragmentos de tejidos. El blanco de calcoflúor tiene como ventaja adicional que los cortes de tejidos pueden teñirse luego con ácido peryódico de Schiff (PAS), metenamina argéntica de Gomori (GMS) u otras tinciones especiales sin interferencia, si se desea la confirmación de los hallazgos o disponer de frotis permanentes. La técnica es rápida y proporciona una buena definición de las finas estructuras fúngicas y un mejor contraste respecto del fondo que la tinción con azul de anilina en lactofenol ampliamente utilizada.⁴²

Tinción de impregnación argéntica. Ciertas bacterias, por ejemplo las espiroquetas (incluido el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi*) y los pequeños microorganismos con forma de bacilo asociados con la enfermedad del arañazo de gato (*Bartonella henselae* y *Bartonella quintana*), no se tiñen con los métodos convencionales. Estos microorganismos son muy delgados para ser visualizados por microscopía de campo brillante, no se encuentran presentes en concentración suficiente como para ser detectados o su composición química no interactúa con los colorantes. La microscopía de campo oscuro ha sido utilizada para identificar *Treponema pallidum*, el agente etiológico de la sífilis y otras espiroquetas no treponémicas, como *Leptospira interrogans*, el agente causal de la leptospirosis. Una limitación del procedimiento de campo oscuro es la necesidad de examinar enseguida las muestras húmedas que contienen microorganismos vivos ya que la visualización de la bacteria en movimiento es esencial para su detección. La tinción argéntica se ha sido utilizado para observar estos microorganismos en cortes de tejido y se dispone de reactivos inmunofluorescentes para la detección de algunos patógenos, como *T. pallidum*.

Las tinciones de impregnación argéntica de Warthin-Starry, Dieterle y Steiner se han utilizado durante años para demostrar la presencia de espiroquetas en cortes de tejidos fijados en formal. Estas técnicas se realizan en forma equivalente.

Tinción de Wright-Giemsa. La tinción de Wright-Giemsa suele utilizarse para teñir los elementos celulares de los frotis de sangre periférica. Tiene poca utilidad para teñir bacterias, pero se utiliza principalmente para detectar las formas de levaduras intracelulares de *Histoplasma capsulatum* o los amastigotes intracelulares de las especies de *Leishmania* o *Trypanosoma cruzi* (lámina en color 1-2G). También es de utilidad para demostrar ciertas inclusiones virales intracelulares (véase cuadro 1-8).

Ácido peryódico de Schiff. La tinción con ácido peryódico de Schiff se basa en la oxidación de las hexosas y las hexosaminas por medio del ácido peryódico, que rompe sus anillos de piranos y produce dialdehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff. Éste es un colorante trifenilmetano preparado a partir de fucsina básica o *p*-rosanilina mediante la reducción con ácido sulfúrico. La mayoría de las sustancias que contienen hexosas o hexosaminas son PAS positivas y se tiñen de color rojo contra un fondo verde o azul de acuerdo con la contracoloración utilizada. Esta tinción se utiliza en forma muy frecuente para demostrar la presencia de hongos en cortes de tejidos (lámina en color 1-2H).

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez recibida la muestra para cultivo en el laboratorio de microbiología, se deben tomar las siguientes decisiones:

1. Seleccionar el medio de cultivo primario apropiado para la muestra en particular.
2. Determinar la temperatura y la atmósfera de incubación para el aislamiento de todos los microorganismos potencialmente importantes.
3. Determinar cuál de los aislamientos que se recuperaron en el medio primario requieren caracterización posterior.
4. Establecer la necesidad de realizar el antibiograma.

No se puede esperar que un único enfoque cubra todas las necesidades de los laboratorios y del ámbito clínico. El protocolo utilizado en un hospital de 50 camas de una comunidad rural diferirá del que se emplea en un gran centro médico con múltiples departamentos. Sin embargo, todos reconocen las dificultades de mantener la calidad del servicio frente a la demanda cada vez más exigente en la contención de los costos. Los directores y los supervisores deben eliminar gran parte del trabajo sin relevancia clínica que se realizaba en el pasado. Se espera que los tiempos del "pancultivo" (la solicitud indiscriminada de cultivos de todos los sitios accesibles del cuerpo con la esperanza de aislar un patógeno) se hayan terminado. Durante las décadas pasadas muchos microbiólogos han tratado de ejercer lo que Barlett llama "control del procesamiento";³ "restricción del procesamiento e informe de muestras para cultivo sólo a aquellas que proporcionarán una información previsiblemente útil".

Selección del medio para un cultivo primario. En un laboratorio diagnóstico se requieren sólo unos pocos medios de uso diario. Comúnmente se utilizan placas de agar. La inoculación de caldos de cultivo para el aislamiento primario de microorganismos debe limitarse a algunos tipos de muestras para las cuales se ha demostrado la utilidad de estos caldos suplementarios (véase cuadro 1-6). En la mayoría de los laboratorios se ha abandonado la práctica de inocular de rutina el caldo de tioglicolato para el aislamiento de anaerobios o como un proceso de enriquecimiento para recuperar patógenos de las heces. En casi todas las circunstancias, el aislamiento de un microorganismo en caldo de cultivo luego de 4 o 5 días de incubación tendrá muy poca relevancia clínica. La incubación de los caldos de cultivo por períodos prolongados también lleva al aislamiento frecuente de contaminantes.³¹ Los aislamientos bacterianos en muy baja concentración rara vez son significativos y el tiempo prolongado de aislamiento suele dar información irrelevante para el tratamiento eficaz del paciente. En algunos laboratorios se inoculan los caldos de cultivo para ciertas muestras, pero sólo se los examina si no se detecta crecimiento en las placas de agar o si las bacterias, cuya morfología se observó en un frotis directo de un material de un paciente, no se aislaron en el agar.

En algunas situaciones los caldos de cultivo son útiles o incluso esenciales. El caso más obvio es el hemocultivo, en el cual la mayoría de las veces se espera un único patógeno y no flora comensal. Otras situaciones clínicas cumplen con estos principios y en ellas los caldos de cultivo pueden ser útiles: la peritonitis bacteriana espontánea (primaria) (opuesta a la peritonitis que se produce luego de la rotura de una víscera abdominal),⁹ las infecciones peritoneales en pacientes que reciben diálisis peritoneal² y la artritis séptica.⁴⁰

Los medios pueden ser selectivos o no selectivos. Los medios no selectivos no contienen inhibidores y en ellos pueden crecer la mayoría de los microorganismos que se aíslan en los laboratorios clínicos. El medio no selectivo más utilizado es el agar sangre de camero al 5% y se lo incluye en el conjunto de los medios de aislamiento primarios para casi todas las mues-

tras clínicas. Para el aislamiento de *Haemophilus influenzae* se necesita agar sangre de caballo, agar sangre de camero con aditivos, como IsoVitaleX® (o un suplemento similar que incluya nicotinamida adenina dinucleótido [NAD] y un producto derivado del hemo) porque no tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento bacteriano y es una fuente rica de factor X. El agar chocolate también es importante para el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae*.

El agar sangre puede hacerse selectivo mediante el agregado de antibióticos o inhibidores químicos. Es una regla general que los agares con inhibidores no deben utilizarse solos, porque suelen inhibir los organismos de interés, sólo menos que a la otra flora. Muchas veces la inhibición es sólo parcial, por lo tanto el crecimiento en un agar selectivo no debe tomarse como prueba de que se aisló el microorganismo diana. Por ejemplo, los enterococos y las levaduras a menudo crecen y producen pequeñas colonias en el agar de MacConkey sobre todo si la formulación no contiene violeta de genciana.

También se puede lograr que un medio sea diferencial mediante el agregado de ciertos colorantes u otras sustancias químicas y obtener así algunos indicios acerca de la identidad del microorganismo aislado. En el cuadro 1-11 se resumen algunos de los medios inhibidores y diferenciales preparados con agar.

Técnicas para la transferencia y el cultivo de muestras clínicas. Una vez que una muestra "superó" los numerosos criterios de rechazo y fue aceptada para su cultivo, se deben transferir cantidades adecuadas de ésta a los medios de cultivo ya descritos. Esta actividad suele llevarse a cabo en un área del laboratorio diseñada para tal fin. La transferencia de todas las muestras a los medios de cultivo debe realizarse en una cabina de seguridad biológica (véase más adelante). La mejor política es manipular todas las muestras como si fueran altamente infecciosas. Se debe exigir que el personal utilice guantes de goma cuando manipula la mayoría de las muestras; el uso de una máscara de cirugía es opcional, ya que no es necesario para gran parte de los procedimientos que se realizan en el laboratorio de diagnóstico microbiológico (excepto para la micobacteriología).

El área de inoculación debe estar equipada con todos los implementos necesarios y se debe contar con reserva de medios de cultivo. Para un almacenamiento prolongado, la mayoría de los medios deben refrigerarse, pero se los debe templar a temperatura ambiente para su inoculación.

A pesar de que el personal que trabaja tiempo completo en el área de organización puede conocer de memoria los medios de cultivo que requiere cada tipo de muestra, es esencial tener los protocolos adecuados y las instrucciones escritas en un boletín de anuncios o incluidas en el manual de políticas y procedimientos para las personas que realizan estas tareas en forma ocasional. Se debe procurar que el procesamiento de las muestras sea llevado a cabo por personal bien entrenado, bajo una estricta supervisión. Los errores o los juicios equivocados que se cometen durante esta fase del ciclo de diagnóstico pueden anular toda la pericia profesional que se pueda aplicar en la lectura e interpretación de los cultivos. Los microbiólogos y los técnicos expertos a menudo no pueden llegar a un diagnóstico definitivo porque se seleccionó un medio inadecuado o incorrecto para una muestra.

Técnicas para el cultivo de las muestras. El equipamiento necesario para la inoculación primaria de las muestras es bastante simple. Se recomienda el uso de un ansa o ansa recta de inoculación de Nichrome® o de platino (fig. 1-6), con un extremo insertado en una empuñadura cilíndrica para facilitar su utili-

Cuadro 1-11 Agares diferenciales e inhibidores utilizados con mayor frecuencia				
AGAR INHIBIDOR (I) O DIFERENCIAL (D)	COMPUESTOS AGREGADOS (I O D)	MICROORGANISMOS INHIBIDOS	MICROORGANISMOS ENRIQUECIDOS	COMENTARIOS/REFERENCIA DE CAPÍTULO
<i>Bacterioides bilis-esculina</i> (BEE) (I, D)	Sales biliares (I); esculina (D)	Mayoría de las bacterias	Grupo de <i>Bacteroides fragilis</i>	La bilis estimula el crecimiento de <i>B. fragilis</i>
Campy-BAP (I)	Bacitracina, novobiocina, colistina, cefalotina, polimixina B (I)	Mayoría de las bacterias	<i>Campylobacter jejuni</i>	La incubación a 42 °C también selecciona a <i>C. jejuni</i>
CCFA (I, D)	Cicloserina, Cefoxitina (I); Fructosa (D)	Mayoría de las bacterias	<i>Clostridium difficile</i>	Colonias amarillas; muy inhibidor
CHROMagar (D)	Varios (D)	ND (no disponible)	Varios	El color sugiere la identificación de las colonias
CIN (I)	Cefsulodina, Irgasan, novobiocina (I)	Mayoría de las bacterias	Especies de <i>Yersinia</i> Especies de <i>Aeromonas</i>	Varias formulaciones disponibles
CNA (I)	Colistina, ácido nalidíxico (I)	Bacterias gramnegativas	Bacterias grampositivas	Se inhiben la mayoría de las cepas de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ³⁴ y algunas cepas de <i>S. aureus</i>
EMB (I, D)	Eosina (E); eosina, azul de metileno, lactosa, sacarosa (D)	Bacterias grampositivas	Bacterias gramnegativas	Ligeramente selectivo (inhibidor); los organismos fermentadores de lactosa o sacarosa producen colonias azul-negro (los fermentadores de sacarosa, como <i>Yersinia enterocolitica</i> , aparecen idénticos a los fermentadores de lactosa); los fuertes fermentadores de lactosa (como <i>Escherichia coli</i> o <i>Candida kefyr</i>) producen brillo verde característico
Hektoen entrérico (HE) (I, D)	Sales biliares (I); lactosa, sacarosa, salicina, azul de bromotimol, fucsina ácida (D); tiosulfato de sodio, citrato amónico férrico para la producción de sulfuro (D)	Bacterias grampositivas	Patógenos entréricos*	Moderadamente inhibidor; los fermentadores de lactosa (sacarosa, salicina) producen colonias verdes; los productores de sulfuro de hidrógeno forman colonias negras
LKV (I)	Kanamicina, vancomicina (I)	Bacterias aerobias; bacterias grampositivas anaerobias	Bacilos gramnegativos anaerobios, particularmente <i>Bacteroides</i>	Se agregu sangre hemolizada como fuente de nutrientes; en este medio pueden seleccionarse enterococos resistentes a la vancomicina
MacConkey (I, D)	Sales biliares, cristal violeta (I); lactosa, rojo neutro (D)	Bacterias grampositivas	Patógenos entréricos*	Moderadamente inhibidor (selectivo); los fermentadores de lactosa producen colonias rojas; están disponibles formulaciones sin cristal violeta
Manitol-sal (I, D)	NaCl (I); Manitol, rojo fenol (D)	Bacterias gramnegativas; bacterias grampositivas que no sean <i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Los estafilococos coagulasa negativos crecen en agar sal, pero no fermentan manitol
Micobidílico/micosel (I)	Cloranfenicol, cicloheximida (I)	Bacterias; hongos saprofíticos (y algunos patógenos fúngicos)	Dermatofitos, hongos dimórficos	

(Continúa)

Cuadro 1-11 Agares diferenciales e inhibidores utilizados con mayor frecuencia (cont.)

AGAR INHIBIDOR (I) O DIFERENCIAL (D)	COMPUESTOS AGREGADOS (I O D)	MICROORGANISMOS INHIBIDOS	MICROORGANISMOS ENRIQUECIDOS	COMENTARIOS/REFERENCIA DE CAPÍTULO
PC (<i>Pseudomonas</i> [<i>Burkholderia</i>] <i>cepacia</i>) (I, D)	Violeta de genciana, sales biliares para bacterias grampositivas (I); polimixina B, ticarcilina para bacterias gramnegativas (I); piruvato (D)	Bacterias grampositivas; la mayoría de las bacterias gramnegativas	<i>Burkholderia cepacia</i>	Alta selectividad; las colonias rosas no son completamente específicas para <i>B. cepacia</i>
PEA (I)	Feniletanol alcohol (I)	Bacterias gramnegativas	Bacterias grampositivas	
<i>Salmonella-Shigella</i> (SS) (I, D)	Sales biliares, verde brillante (I); lactosa, rojo neutro (D); tiosulfato de sodio, citrato amónico férrico para sulfuro de hidrógeno (D)	Bacterias grampositivas	Patógenos entéricos*	Más inhibidor (selectivo) que el agar de MacConkey y el agar EMB; pueden inhibirse las especies de <i>Shigella</i>
Sorbitol- MacConkey (I, D)	Sales biliares, violeta de genciana (I); sorbitol, rojo neutro (D)	Bacterias grampositivas	<i>Escherichia coli</i> O157 (sorbitol negativa)	Agar para búsqueda de <i>E. coli</i> productora de verotoxina
TCBS (I, D)	Tiosulfato de sodio, citrato de sodio, NaCl para bacterias gramnegativas (I); sales biliares, NaCl para bacterias grampositivas (I), sacarosa, azul de timol-azul de bromotimol (D)	Bacterias grampositivas; la mayoría de las bacterias gramnegativas	Especies de <i>Vibrio</i>	Las especies fermentadoras de sacarosa aparecen amarillos, las especies que utilizan citrato aparecen azules
Medio selectivo GC (Thayer-Martin, Martin-Lewis, etc. modificados) (I)	Vancomicina para bacterias grampositivas (I); colistina para bacterias gramnegativas (I); trimetoprima para los abundantes <i>Proteus</i> (I); nistatina, anfotericina B o anisomicina para levaduras (I); suplementos para el crecimiento	Bacterias grampositivas; bacilos gramnegativos	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Múltiples formulaciones disponibles. Algunas cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> se inhiben con vancomicina. De manera óptima debería inocularse también agar chocolate
XLD (I, D)	Sales biliares, NaCl (I); lactosa, sacarosa, xilosa, rojo fenol (D); tiosulfato de sodio, citrato amónico férrico para producción de sulfuro de hidrógeno (D)	Bacterias grampositivas	Patógenos entéricos*	Funciona de manera similar al agar de Hektoen entérico

* Patógenos entéricos = especies de *Salmonella*, especies de *Shigella* y especies de *Yersinia*.

zación. La muestra puede ser inoculada de diferentes maneras sobre la superficie del agar en la placa de Petri, una de las cuales se muestra en la figura 1-7. La inoculación primaria puede realizarse con un ansa, un hisopo u otro dispositivo adecuado. Una vez que se realizó el inóculo primario, se puede utilizar un ansa o un ansa recta para esparcir el material dentro de los cuatro cuadrantes de la placa, como se muestra en la figura 1-8. El inóculo se siembra en estría con un movimiento hacia atrás y hacia adelante dentro de cada cuadrante girando la placa en ángulos de 90°. El ansa o el ansa recta debe esterilizarse entre las sucesivas siembras en estría en cada cuadrante. El propósito de este proceso es diluir suficientemente el inóculo sobre la superficie del medio con agar de manera de obtener colonias de bacterias bien aisladas, conocidas como unidades formadoras de colonias (UFC). Las colonias aisladas pueden subcultivarse de manera individual en otro medio para obtener poblaciones puras de microorganismos para su estudio posterior. Cuando se siembran en estría en una placa de agar sangre los hisopados faríngeos enviados para la búsqueda de estreptococos, se deben realizar múltiples punzadas en las áreas de ino-

culación para desenmascarar las hemolisinas lábiles a la presencia de oxígeno, lo cual aumenta la detección de estreptococos β -hemolíticos. También se deben sumergir en la profundidad del agar los pequeños fragmentos de tejido que se enviaron para el aislamiento de hongos. El crecimiento inicial de muchas especies de hongos se ve favorecido por la atmósfera microaerófila que se encuentra debajo de la superficie del agar.

En la figura 1-9 se muestra la técnica de siembra en estría utilizada para inocular el agar para el recuento semicuantitativo de colonias. Las ansas de inoculación desechables de plástico o de materiales diferentes del hierro (Nichrome® o de platino), calibradas para contener 0.01 o 0.001 mL de líquido, se sumergen en una muestra de orina no centrifugada. Luego, se retira el ansa con cuidado y se coloca el volumen completo sobre la superficie del agar haciendo una única estría a través del centro. El inóculo se esparce de modo uniforme en ángulos rectos respecto de la primera estría; luego se gira la placa 90° y se esparce el inóculo hasta cubrir la superficie completa. En algunos laboratorios, se inoculan dos placas, una con el ansa de 0.01 mL y la otra con la de 0.001 mL, lo cual se utiliza como

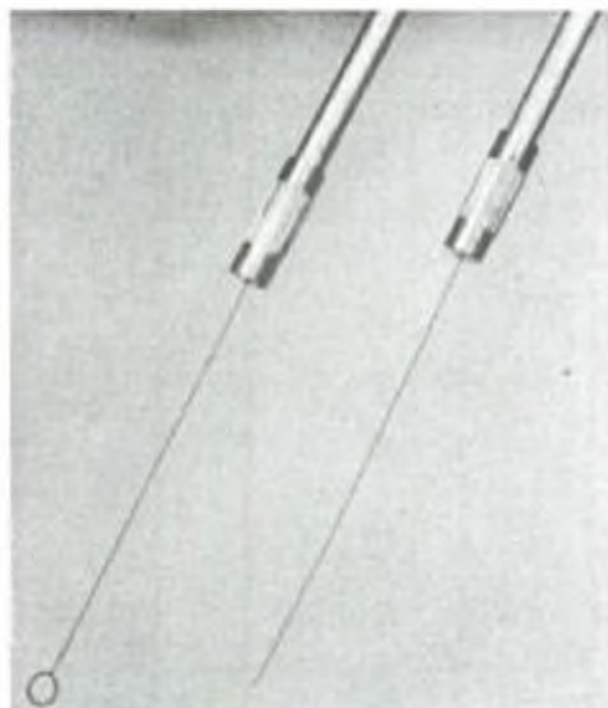


Figura 1-6 Ansa y ansa recta utilizadas para la transferencia e inoculación de muestras y cultivos.

control de calidad. A pesar de que las ansas de inoculación están calibradas para tomar el volumen de orina establecido, la exactitud tiene una tasa de error de $\pm 50\%$ sobre todo cuando se utiliza el ansa de 0,001 mL.¹ La toma de muestra en posición vertical de un recipiente pequeño puede sólo contener el 50% del volumen establecido; mientras que la toma de muestra horizontal en un ángulo de 45° de un recipiente grande puede contener 150% del volumen. Los microbiólogos deben estar alertados sobre estos posibles errores y utilizar un ángulo estándar para el muestreo en el laboratorio, basándose en el volumen de los recipientes.

Se pueden realizar estudios de exactitud y precisión del volumen del inóculo: 1) en forma fotométrica, agregando un ansa de violeta de genciana tomada a partir de un recipiente de

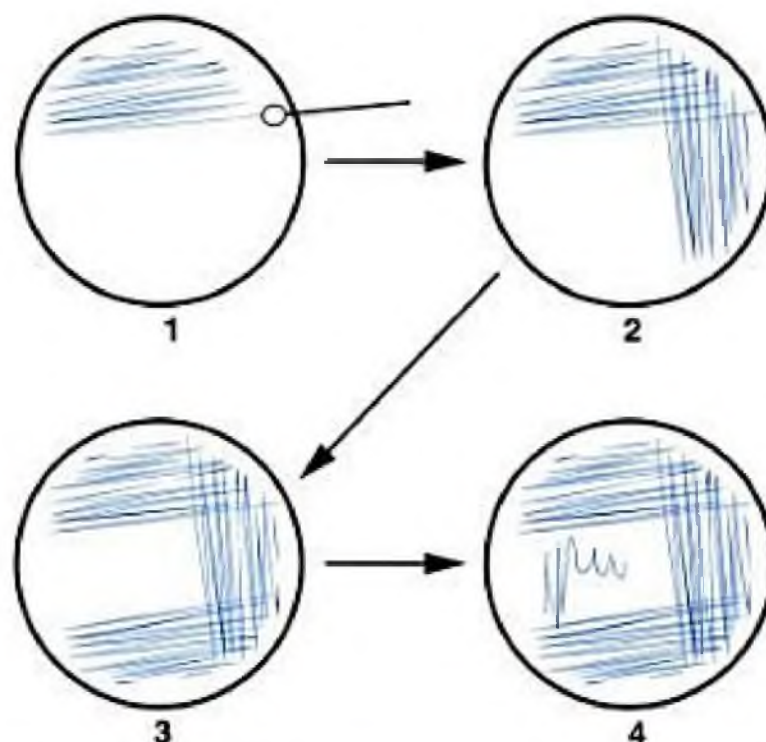


Figura 1-8 Patrón de siembra en estría para la inoculación de muestras sobre placas de cultivo para obtener colonias bacterianas aisladas.

60 mL de colorante a una cubeta con 2 mL de agua que luego se lee en un espectrofotómetro a 590 nm, o 2) en forma manométrica, anotando el cambio en el peso de un disco de papel de filtro ubicado sobre la bandeja de una balanza analítica muy sensible, cuando se le agrega un ansa de agua. Existen dispositivos para tomar un inóculo estándar a partir de muestras líquidas.²⁹

Luego de 18 a 24 horas de incubación se estima el número de bacterias en una muestra de orina mediante el recuento de colonias sobre la superficie del agar. Como se muestra en la figura 1-10, hay aproximadamente 50 colonias. Si se utilizó un ansa de 0,001 mL para inocular el medio, el número de colonias debe multiplicarse por 1 000. Por lo tanto, el recuento de esta figura es 50 000 UFC/mL.

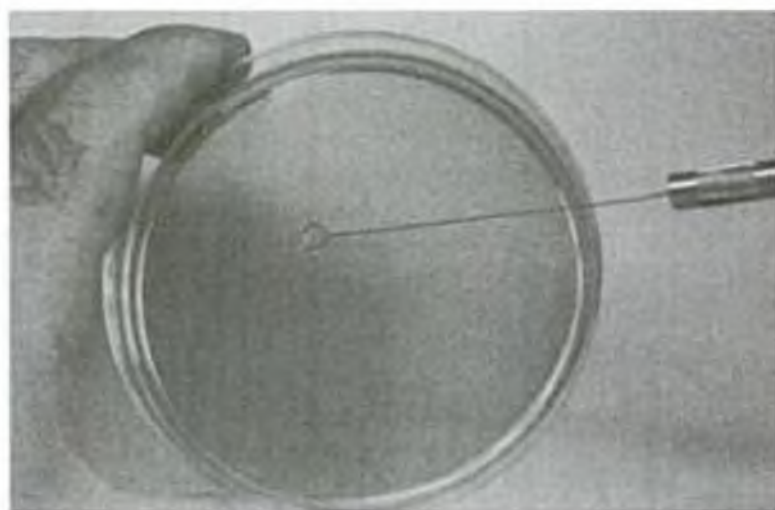


Figura 1-7 La superficie de una placa de agar se inocula con una muestra contenida dentro de un ansa de inoculación. La inoculación se logra tocando primero la superficie del agar en un área pequeña, luego haciendo un movimiento en forma de estría de un lado u otro sobre la superficie mediante un patrón que se muestra en la figura 1-8.

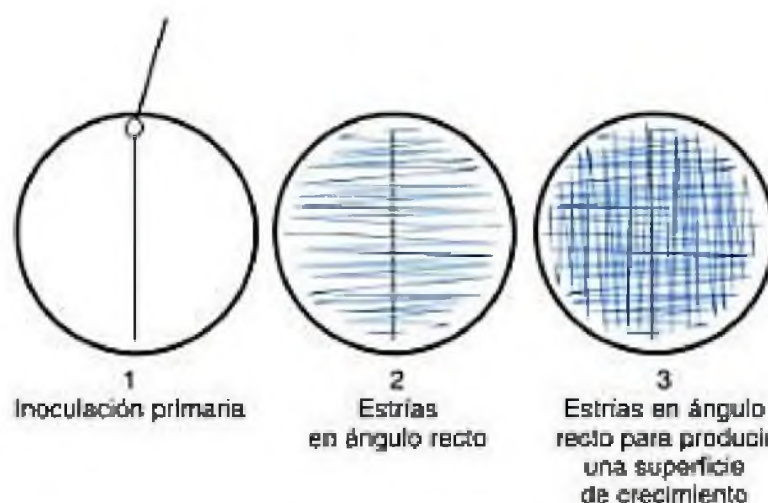


Figura 1-9 Placas de cultivo donde se muestran los patrones de siembra en estría de muestras en las cuales se realizará un recuento semicuantitativo de bacterias.

Las técnicas semicuantitativas se utilizan más a menudo con las muestras de orina, pero también se han empleado para otros tipos de situaciones. La cuantificación de bacterias aisladas de las vías aéreas bajas por técnicas de broncoscopia puede ayudar en la interpretación de estos cultivos.²⁰ Cuando las bacterias están presentes en concentraciones mayores de 10^3 – 10^4 UFC, la probabilidad de que sean el agente causal de la neumonía es mayor que cuando se encuentran en menor cantidad. Se puede evitar un trabajo considerable si no se realiza el análisis de los recuentos bajos que corresponderían a flora contaminante de la faringe.

Para evaluar la probabilidad de que los catéteres intravasculares sean la fuente de una bacteriemia, suelen emplearse los cultivos semicuantitativos. A pesar de que se han utilizado numerosas técnicas, el enfoque más usual es hacer rodar el segmento amputado del catéter sobre la superficie del agar.⁶⁰ Si los recuentos muestran más de 15 colonias bacterianas, existe una asociación estadística entre el aislamiento de la bacteria y la bacteriemia relacionada con los catéteres. En este enfoque, el catéter se extrae con el objeto de realizar el análisis. La cuantificación de las bacterias en una muestra de sangre obtenida a través de un catéter intravascular permanente se ha utilizado, además, para determinar el papel del catéter en un proceso infeccioso.³²

La cuantificación también puede ser de utilidad en virología para determinar el significado de un virus, como citomegalovirus, que puede provocar una infección persistente.¹⁸ Además, puede controlarse la eficacia de la quimioterapia antiviral a través del seguimiento de la cantidad de virus presente.⁴⁷ Muchos de los análisis cuantitativos para las enfermedades virales (cargas virales) emplean la detección molecular en lugar de los cultivos.

Los medios en los tubos pueden ser líquidos, semisólidos (0,3% a 0,5% de agar) o sólidos (1% a 2% de agar). El agar semisólido es adecuado para ensayos de movilidad. Un tubo con caldo puede inocularse con los métodos que se muestran en la figura 1-11. El tubo debe inclinarse en un ángulo aproximado de 30° y el ansa de inoculación con la muestra debe tocar la superficie interna del vidrio, justo por arriba del punto donde la superficie del caldo forma un ángulo agudo. Cuando el tubo de cultivo retorna a su posición vertical, el área de inoculación queda sumergida por debajo de la superficie. Los directores de laboratorio y los supervisores de microbiología deben determinar qué muestras deben transferirse a caldos de cultivo de rutina (véase cuadro 1-6).

El agar “en pico de flauta” (en tubo inclinado) se inocula punzando primero la profundidad del agar y luego haciendo una estría sobre el agar inclinado desde abajo hacia arriba con un movimiento de S a medida que se retira el ansa recta de inoculación (figs. 1-12 y 1-13). Cuando se inocula un tubo de agar semisólido para ensayos de movilidad, es importante que el ansa recta de inoculación se retire exactamente por el mismo sitio en que se punzó el medio. Un movimiento en abanico puede dar como resultado un patrón de crecimiento a lo largo de la línea de punción que puede interpretarse en forma errónea como movilidad bacteriana.

Ciertas muestras pueden necesitar centrifugación o filtrado para concentrar cualquier microorganismo presente. Las muestras densas y mucosas de esputo pueden hacerse más líquidas con *N*-acetilcisteína (Mucomyst®, WellSpring Pharmaceutical Corp., Neptune, NJ) para facilitar la siembra en estría sobre la superficie del agar. Las muestras de esputo que se procesan para el aislamiento de las especies de *Mycobacterium* deben también tratarse con hidróxido de sodio para reducir el sobre-

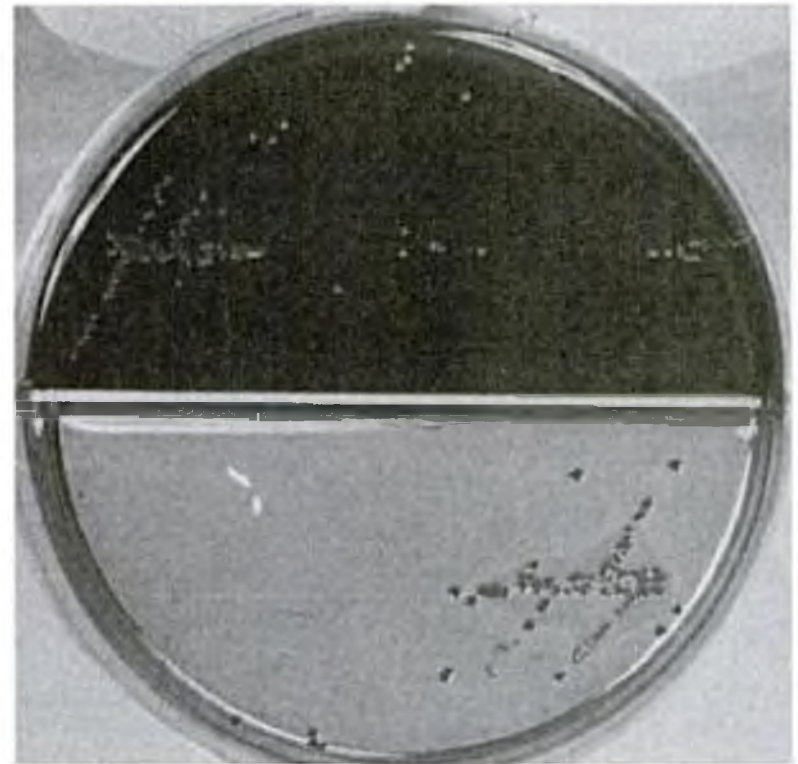


Figura 1-10 Placa doble de agar sangre-agar de MacConkey previamente estriada para un recuento semicuantitativo de colonias como se ilustra en la figura 1-9. Aparecen, aproximadamente, 50 colonias a cada lado de la placa. Si se utilizó para la siembra en estría en cada medio un ansa de inoculación de orina semicuantitativa calibrada de 0,001 mL, el recuento de colonias sería de 50 (X10) unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

crecimiento de las bacterias contaminantes. Otras muestras que se envían para el aislamiento de micobacterias, como la orina o la suspensión de heces, también pueden ser tratadas brevemente con NaOH para eliminar las bacterias colonizantes. De manera similar, se pueden utilizar antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo y en las monocapas de células que se emplean para el aislamiento de virus.

Los líquidos corporales, como los obtenidos por toracentesis y paracentesis, primero deben dejarse sedimentar, luego de lo

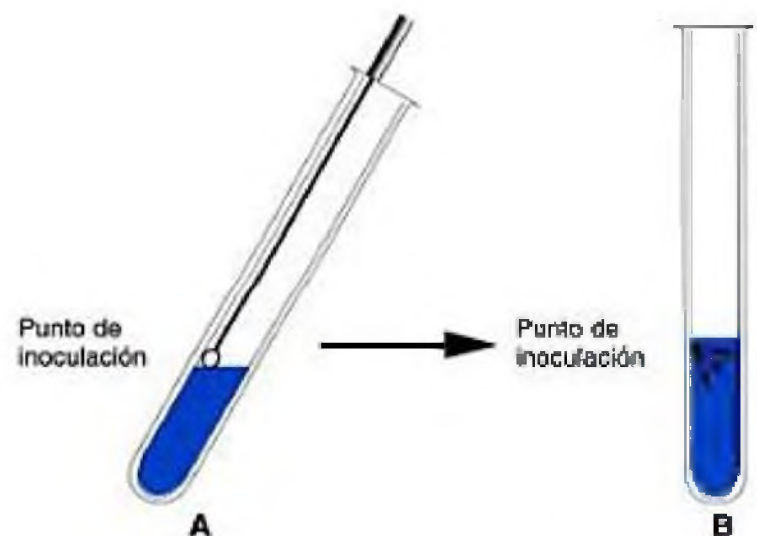


Figura 1-11 Técnica para la inoculación de un caldo de cultivo en un tubo. (A) Inclinarse el tubo e inocularlo tocando la superficie interna húmeda del vidrio en el ángulo agudo del menisco. (B) Retornar el tubo a la posición vertical, lo cual tiene el efecto de sumergir el punto de inoculación bajo la superficie.

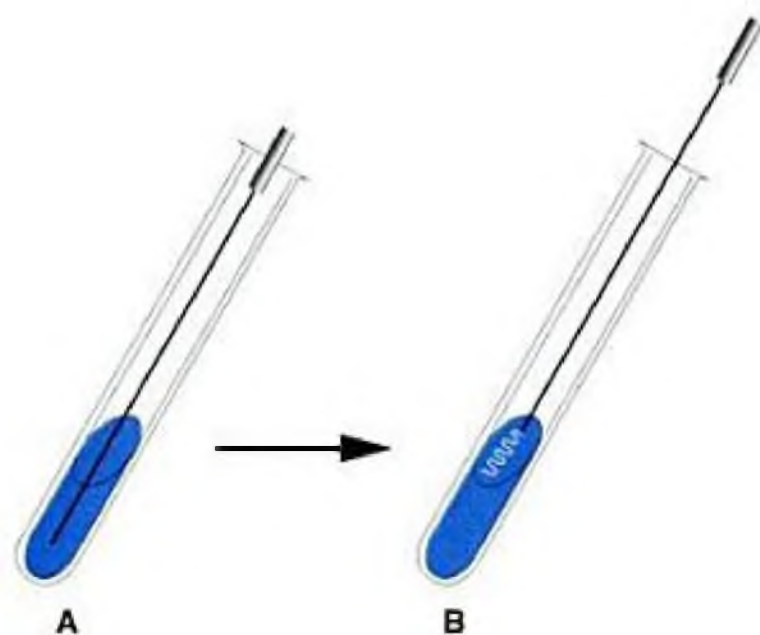


Figura 1-12 Técnica de inoculación en agar inclinado con un ansa recta. (A) Pinchar en profundidad el agar en pico de flecha hasta una distancia de 2-3 mm del fondo del tubo. Si se toca el fondo del tubo puede ingresar aire e invalidar las condiciones anaerobias. (B) Retirar lentamente el ansa recta y estriar la superficie del agar con un movimiento de un lado a otro en forma de "S".

cual las alícuotas de sedimento se centrifugan para concentrar cualquier bacteria que pudiera estar presente. Se deben proporcionar frascos de hemocultivo para inocular en forma directa ciertas muestras, como ya se analizó. Esta práctica es adecuada en las pocas situaciones en las que se esperan pequeñas cantidades de un único patógeno. En otras situaciones debe desalentarse esta práctica por numerosas razones:

1. Si se encuentran presentes especies bacterianas mixtas, las bacterias que crezcan más rápido sobrepasarán en número a sus parientes que crecen más lentamente.

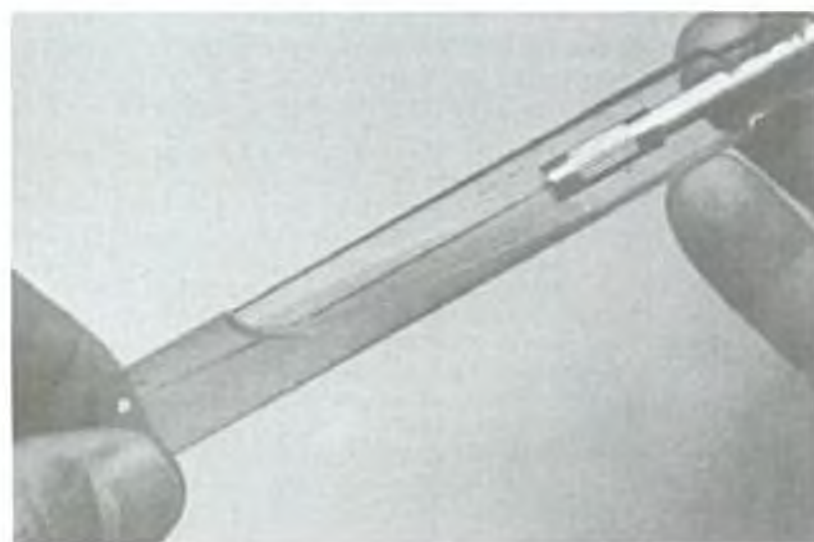


Figura 1-13 Técnica para la inoculación de la profundidad de un agar con un ansa recta como se mostró en la figura 1-12A. La parte profunda del medio se pincha con el ansa recta hasta una distancia de 2-3 mm del fondo del tubo; después de sacar lentamente la aguja, se estria la superficie del agar con un movimiento de un lado a otro en forma de "S", como se muestra en la figura 1-12B.

2. Las relaciones semicuantitativas de los tipos bacterianos aislados se pueden ver en una placa de agar pero se pierden en un caldo de cultivo.
3. El frotis directo, tan importante para determinar la naturaleza inflamatoria de una muestra, y los tipos de bacterias presentes, se pierden si se inocula la muestra completa en un caldo.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo, en particular para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans*, deben centrifugarse y parte del sedimento transferirse al medio de cultivo apropiado; o preferiblemente, se debe pasar el líquido por un filtro microbiológico de 0,45 μm para atrapar a las levaduras más grandes que pudieran estar presentes.

Los microorganismos difieren en su temperatura óptima de incubación. En los laboratorios pequeños que cuentan con recursos limitados, a veces no es posible disponer de las temperaturas óptimas de incubación para el crecimiento de todos los aislamientos clínicos. La mayoría de los microorganismos crecen a 35 °C; por lo tanto, si se dispone de un solo incubador, éste debe fijarse a 35 °C. Incluso los microorganismos como *Campylobacter jejuni*, que crece en forma óptima a 42 °C, crecerán a 35 °C si se los incuban por 24 a 48 horas más. Sin embargo, en este caso se pierde el efecto diferencial de la incubación a temperaturas mayores en las que otras bacterias no crecen. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos se ve favorecido en una atmósfera de 5% a 10% de CO_2 . Si se dispone sólo de aire ambiental, es decir de un incubador sin CO_2 , los tubos y las placas de cultivo pueden ubicarse en una jarra de anaerobiosis por extinción con una vela y colocar entonces todo este dispositivo en incubación. Por el contrario, se puede mantener una atmósfera de aire ambiental en un incubador con CO_2 colocando los cultivos dentro de una jarra con la tapa muy ajustada (es adecuada una jarra o cámara de anaerobiosis). Sin embargo, hay que tener en cuenta que un microorganismo como *C. jejuni*, que requiere una tensión reducida de oxígeno del 5% o menor, tendrá dificultades para crecer en una jarra de anaerobiosis por extinción de una vela, en la cual la concentración de oxígeno se encuentra en el rango de 10%.

Muchos microorganismos crecen en forma óptima dentro de un estrecho rango de temperatura; otros tienen un espectro relativamente amplio dentro del cual pueden aislarse. Ya se mencionó la temperatura óptima de crecimiento de *C. jejuni* s de 42 °C. La mayoría de los hongos crecen a 30 °C; sin embargo, pueden ser aislados a temperatura ambiente o a 35 °C en el medio adecuado. *Yersinia enterocolitica* crece de manera óptima apenas por encima de la temperatura ambiente. No obstante, la mayoría de las cepas también crecerán a 35 °C, aunque las colonias pueden ser pequeñas o requerir un período de incubación adicional de 24 horas. Por consiguiente, no es habitual que la disponibilidad de una única estufa de incubación comprometa la capacidad del microbiólogo de aislar la mayoría de las bacterias de importancia clínica. En los grandes laboratorios donde existe posibilidad de contar con varias temperaturas de incubación, el aislamiento de los microorganismos es, a menudo, más rápido y la apariencia de las colonias se asemeja más a la morfología verdadera. En ocasiones, la incubación a temperatura ambiente por un período prolongado puede ser necesaria para demostrar ciertas características bioquímicas o físicas, como la producción de un pigmento y la movilidad. Estos ajustes se aprenden con la experiencia y por ensayo y error.

Aun más importante que una temperatura específica de incubación es, probablemente, evitar las fluctuaciones en la temperatura de la estufa. Se debe controlar esa temperatura de modo

muy estricto con fluctuaciones no mayores de $\pm 1-2^\circ$ de un día para otro. Las estufas de incubación deben ubicarse y protegerse de manera que las perillas de control no puedan ser fácilmente alteradas por el personal de limpieza durante las horas en que el laboratorio está cerrado.

También es importante el control de la humedad interna de la estufa. La mayoría de los microorganismos crecen al máximo cuando la humedad es de 70% o mayor y los medios de cultivos tienden a deteriorarse más rápidamente cuando se secan de manera inapropiada. El aislamiento en particular de *H. pylori*, y en menor medida, de *N. gonorrhoeae* requiere una atmósfera de alta humedad. La mayoría de las estufas compradas durante los últimos años contienen reservorios de agua mediante los cuales se puede controlar la humedad en la cámara de incubación. De lo contrario, se pueden ubicar sobre los estantes recipientes abiertos de boca ancha con agua para que proporcionen por evaporación la humedad necesaria. También se debe controlar periódicamente las estufas para verificar que no se produzcan derrames que pasan inadvertidos y que pueden producir contaminaciones o una acumulación de sustancias químicas de los reactivos que inhiban el crecimiento bacteriano.

INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

La interpretación de los cultivos primarios después de 24 a 48 horas de incubación requiere una habilidad considerable. A partir de la observación inicial el microbiólogo debe determinar la naturaleza de las colonias aisladas y decidir si se requieren otros procedimientos. Los parámetros relevantes son las características y el número relativo de cada tipo de colonia que se aisló en el cultivo en agar; la pureza, la reacción de Gram y la morfología de las bacterias en cada tipo de colonia; y los cambios en el medio, los cuales reflejan la actividad metabólica de las bacterias en las colonias adyacentes.

Durante el proceso de obtención de las muestras de los pacientes o de su manipulación en el laboratorio se pueden introducir microorganismos extraños del ambiente o de la flora propia del individuo que manipula el cultivo. Por ejemplo, en los hemocultivos es frecuente el hallazgo de flora de la piel que debe interpretarse con cuidado. Además, se pueden introducir "contaminantes" en el proceso de fabricación y manipulación de los productos microbiológicos, como las placas de agar. Puede ser extraño que una colonia aparezca en la segunda o la tercera área de siembra en estría de la placa, sin que haya crecido en la zona de inoculación inicial. Estas colonias pueden ignorarse aunque se les debe prestar especial atención a los patógenos importantes que son "contaminantes" poco comunes. Un problema mayor se presenta cuando desarrolla una única colonia de un microorganismo de la piel, como *Staphylococcus coagulasa negativo*, en la zona primaria de inoculación. Existe, por supuesto un tercio o un cuarto de probabilidad de que un contaminante de la placa se encuentre en la primera zona. Si la muestra es crítica, como líquido cefalorraquídeo, y se conservó en el laboratorio, puede inocularse nuevamente sobre la superficie del agar. Aunque no es apropiado ignorar la cepa aislada en estas circunstancias, corresponde adjuntar un comentario donde conste que se aisló una única colonia y que no fue nuevamente aislada en la muestra. Luego, el médico puede reunir la evidencia del laboratorio y clínica antes de hacer la interpretación final del significado.

A veces se presentan situaciones atípicas. Por ejemplo, se pueden aislar microorganismos mixtos que se asemejan a la flora propia de las vías aéreas altas de un sitio normalmente

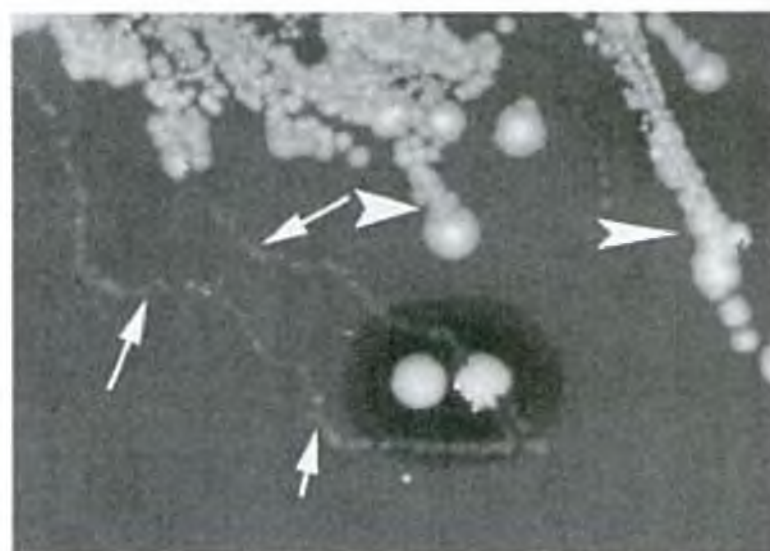


Figura 1-14 Placa de agar, la cual ha sido inoculada con una muestra de piel, que contiene flora bacteriana mixta. Se puede ver el rastro zigzagante de bacterias en medio de las colonias aisladas (flecha). Además, los patrones lineales inusuales de las colonias maduras pueden representar el mismo proceso (puntas de flecha). La explicación más probable es que un insecto que estaba presente en la muestra transportó las bacterias alrededor de la placa. Se describió que este fenómeno es producido también por las amebas de vida libre.

estéril. Es difícil evitar la sospecha de que alguien "estornudó" sobre la placa, pero la evaluación posterior dependerá del análisis de todos los factores, quizás incluso consultando con el médico. En la figura 1-14 se muestra un fenómeno de laboratorio muy inusual.

Características macroscópicas de las colonias. La determinación de las características generales de las colonias suele realizarse a través de la inspección de la superficie de la placa de agar. Este análisis se realiza sosteniendo la placa en una mano y observando la superficie del agar para verificar la presencia de crecimiento bacteriano (fig. 1-15). Las placas de cultivo estándares tienen un diámetro de 100 mm y son adecuadas para sostenerlas con una mano. Debe estudiarse cada placa con cuidado, porque la bacteria que se aísla inicialmente de las muestras se encuentran a menudo en un cultivo mixto y puede haber presentes diversos tipos de colonias. Las colonias puntiformes de bacterias de crecimiento lento pueden pasarse por alto entre colonias más grandes, sobre todo si hay una tendencia de crecimiento a esparcirse sobre la superficie de la placa.

Durante el examen, las placas deben ser inclinadas en varias direcciones, bajo iluminación directa brillante, de manera que la luz se refleje desde varios ángulos. Se recomienda la utilización de una lupa o de un microscopio de disección para ayudar en la detección de las colonias pequeñas o inmaduras y mejorar la observación de sus características (fig. 1-16). Las placas de agar sangre deberían examinarse con un transiluminador de luz brillante por detrás para detectar las reacciones de hemólisis en el agar (fig. 1-17).

La figura 1-18 contiene términos e ilustraciones útiles para la descripción de las colonias bacterianas. En los recuadros 1-8 a 1-10 se esquematizan guías adicionales.

Aunque son difíciles de describir en forma específica, los olores producidos por la acción de ciertas bacterias en los medios de cultivo sólidos y líquidos pueden ser muy útiles en la identificación tentativa de los microorganismos involucrados (cuadro 1-12). El olfateo siempre debe realizarse con precaución, levantando la tapa de la placa de Petri levemente para



Figura 1-15 Técnica para el análisis de la superficie de la placa de agar por medio del reflejo directo y oblicuo de la luz.



Figura 1-16 Técnica para el análisis del crecimiento de las colonias en la superficie de una placa de agar que utiliza una lente de mano.

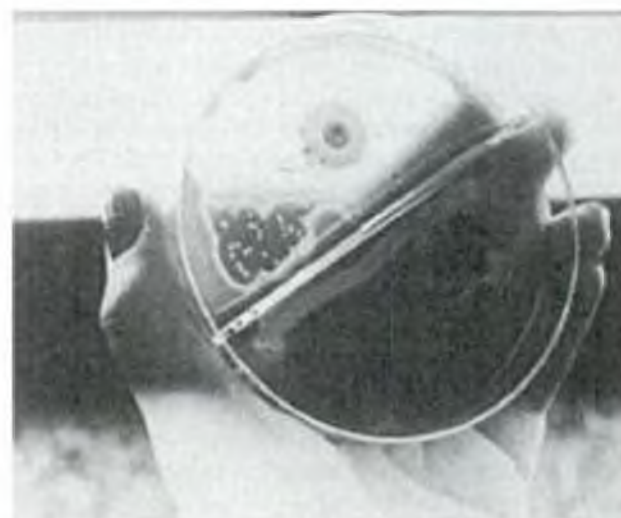


Figura 1-17 Técnica para el análisis del crecimiento de las colonias en la superficie de una placa de agar utilizando la luz transmitida. Esta técnica es útil para la evaluación de las propiedades hemolíticas de las colonias que crecen en agar sangre.

Forma	puntiforme		irregular	
	circular		rizoide	
	filamentosa		ahusada	
Elevación	plana		pulviniforme	
	elevada		en forma de botón	
	convexa		umbilicada	
Borde	liso o continuo		corroído	
	ondulado o festoneado		filamentoso	
	lobulado		encrespado	

Figura 1-18 Ilustraciones de diversas formas morfológicas de las colonias, con el nombre de los términos de cada una.

Recuadro 1-8 Características utilizadas para la identificación de las colonias bacterianas

Tamaño: diámetro en milímetros
Forma: puntiforme, circular, filamentososa, irregular, rizante, abusada
Elevación: plana, elevada, convexa, pulviniforme (en forma de almohada), en forma de botón, umbilicada
Margen (borde de la colonia): liso o continuo, ondulado, lobulado, crenado, filamentososo, encrepado
Color: blanca, amarilla, negra, beige, naranja, otros
Superficie: brillante, mate, otras
Densidad: opaca, translúcida, transparente, otras
Consistencia: untuosa o mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza, otras

Véanse también fig. 1-18 y lámina en color 1-5.

Recuadro 1-9 Reacciones en medio agar utilizadas en la identificación de las bacterias

Hemólisis en agar sangre
Alfa: clarificación parcial de la sangre alrededor de las colonias con un cambio de color al verde del medio; contorno de los eritrocitos intactos
Beta: zona de clarificación completa de la sangre alrededor de las colonias debido a la lisis de los eritrocitos
Gamma: sin cambios en el medio alrededor de la colonia; sin lisis o cambio de color de los eritrocitos
Alfa prima: halo de lisis incompleta inmediatamente alrededor de las colonias, con una segunda zona de hemólisis completa en la periferia

Producción de pigmentos en medio agar
Pigmentos solubles en agua que producen un cambio de color en el medio
 Píocianina
 Pigmentos fluorescentes
 Pigmentos que no se difunden confinados a las colonias

Reacción en agar yema de huevo
Lecitinasa: zona de precipitado en el medio que rodea las colonias
Lipasa: "capa perlada", una película iridiscente dentro e inmediatamente alrededor de las colonias, visible por reflejo de la luz
Proteólisis: zona clara que rodea las colonias

Recuadro 1-10 Cambios en los medios diferenciales

Varios colorantes, indicadores de pH y otros ingredientes se incluyen en los medios diferenciales de siembra en placa, sirven como indicadores de actividades enzimáticas y ayudan a la identificación de los aislamientos bacterianos

Cuadro 1-12 Olores característicos de los microbios seleccionados*

MICROBIO	OLOR
<i>Alkaligenes faecalis</i> (odorans)	A manzanas recién cortadas
Grupo EF-4 de los CDC	Similar a las pulomitas de maíz
Especies de <i>Candida</i>	A levadura
Especies de <i>Citrobacter</i>	A calzado sucio
<i>Clostridium difficile</i>	A podrido, heces
Especies de <i>Corynebacterium</i> , DF-3	Frutal
<i>Ekkenella corrodens</i>	A lejía
Especies de <i>Haemophilus</i>	A pelaje húmedo
Especies de <i>Nocardia</i>	A sótano con moho
<i>Pasteurella multocida</i>	Pungente (indol)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Fecul
Grupo de <i>Bacterioides</i> pigmentados	Acro
Especies de <i>Proteus</i>	A chocolate quemado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A jugo de uvas
Especies de <i>Staphylococcus</i>	A calzado sucio
Especies de <i>Streptococcus</i>	A manteca
Especies de <i>Streptomyces</i>	A sótano con moho

* *Ciertas microorganismos (que aquí no se enumeran) son peligrosos si se huelen. Véase el texto para el estudio.*

detectar el olor. Se debe advertir al personal del laboratorio que algunas especies pueden infectar a las personas y no deben olfatearse nunca. Si se sospecha la presencia de *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia pseudomallei*, especies de *Brucella* o *Neisseria meningitidis*, el cultivo debe ser trasladado a una cabina de seguridad biológica, donde puede realizarse todo el trabajo siguiente sin riesgo de transmisión al operador. Por supuesto que las placas y los tubos nunca deben abrirse en un laboratorio de micobacteriología o cuando en un laboratorio de micología hay hongos filamentosos. Algunos olores, como los de *Nocardia* y *Streptomyces*, son tan fuertes que pueden percibirse aun sin levantar la tapa de la placa de Petri.

El microbiólogo puede hacer una identificación preliminar de la bacteria aislada en el cultivo primario a través de la determinación de las características de las colonias descritas y de la acción sobre el medio. Estas características son útiles para seleccionar otros medios diferenciales y ensayos apropiados para completar la identificación de los aislamientos. En el cuadro 1-13 se enumeran algunos de los tipos de colonias que se encuentran en forma más frecuente, junto con los grupos de bacterias que se asocian con cada una, los ensayos adicionales que se requieren para la identificación definitiva y la referencia de la imagen correspondiente a la lámina en color 1-5.

La inspección inicial de las colonias para la identificación preliminar de las bacterias es uno de los puntos principales del diagnóstico microbiológico y se analiza en detalle en los capítulos siguientes dedicados a los grupos específicos de bacterias y de otros microorganismos patógenos.

Diferenciación de distintos tipos morfología bacteriana en los cultivos mixtos. Cuando las placas de agar son sembradas para el aislamiento de bacterias, es fácil seleccionar las colonias aisla-

Cuadro 1-13 Identificación preliminar de las bacterias por los tipos de colonias			
TIPO DE COLONIA	GRUPO BACTERIANO	PRUEBAS ADICIONALES	MARCO DE PLACAS ILUSTRANDO EL TIPO
Convexa, bordes lisos, 2–3 mm, cremosa, amarillenta, zona de β -hemólisis	<i>Staphylococcus</i>	Catalasa Coagulasa DNasa Utilización de manitol Reducción de telurito Resistencia a la novobiocina Resistencia a la furazolidona	1-5A
Convexa o pulviniforme, translúcida, de tamaño puntiforme, manecosa, zona ancha de β -hemólisis	<i>Streptococcus</i>	Catalasa Disco A Tolerancia al NaCl 6,5% Bilis-esculina Prueba de CAMP Hidrólisis de hipurato L-pirrolidonil- β -naftilumida (PyR)	1-5B, C
Umbilicada o plana, translúcida, manecosa o mucosa, zona amplia de α -hemólisis	<i>Pneumococcus</i>	Disco P Solubilidad en hisis	1-5G
En forma de almohada, semiopaca, gris, desde húmeda hasta algo seca, puede o no estar presente la β -hemólisis	<i>Escherichia coli</i> y otras Enterobacteriaceae	Pruebas múltiples Indol Rojo de metilo Reacción de Voges-Proskauer Citrato Desaminasas Ureasa	1-5D
Plana, gris, dispersa como una película delgada sobre la superficie del agar; olor a chocolate quemado	<i>Proteus</i>	Fenilalanina Fermentaciones de hidratos de carbono Fenilalanina desaminasa Ureasa Lisina desaminasa	
Plana, opaca, gris a verdosa, márgenes cortados o dispersos, pigmento verde-azul, olor similar a uvas	<i>Pseudomonas</i>	Citocromo oxidasa Fluorescencia por asimilación de hidratos de carbono Desnitrificación DNasa Hidrólisis de acetamida Crecimiento a 42 °C	

das para su subcultivo. Sin embargo, en ocasiones el crecimiento muestra tal amontonamiento que es difícil elegir colonias individuales aisladas. Ante esta eventualidad, los microbiólogos cuentan con varios recursos (cuadro 1-14).

Examen de las tinciones de Gram de los cultivos. Las impresiones preliminares, basadas en la observación de las características de las colonias, pueden confirmarse mediante el estudio de los frotis teñidos con Gram, una técnica de realización bastante simple. La parte superior y el centro de la colonia que se va a estudiar se tocan primero con el extremo de un ansa de inoculación recta, cuidando de no tocar el agar adyacente (fig. 1-19). La parte de la colonia que conforma la muestra se emulsiona en una pequeña gota de agua o solución fisiológica sobre un portaobjetos para dispersar las bacterias individuales (fig. 1-20). Luego de que el portaobjetos se secó al aire, se fija la película

bacteriana a la superficie del vidrio con calor, pasando rápidamente el portaobjetos cuatro o cinco veces a través de la llama de un mechero Bunsen o cubriendo el frotis con metanol o etanol durante algunos minutos. El frotis fijado se ubica sobre un soporte para tinción y se realiza la tinción de Gram como se describe en el recuadro 1-6.

El frotis teñido debe examinarse con el microscopio utilizando un objetivo de inmersión (las bacterias grampositivas aparecen azules; las gramnegativas aparecen rojas o rosas). Otras tres características son útiles para realizar la identificación preliminar de las cepas aisladas: 1) el tamaño y la forma de las bacterias, 2) el ordenamiento de las bacterias y 3) la presencia o la pérdida de estructuras específicas u orgánulos (esporas, gránulos metacromáticos, cuerpos de inclusión u otras características).

Cuadro 1-14 Técnicas de preparación de aislamientos puros a partir de cultivos mixtos

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN
Subcultivo directo	Tocar con cuidado la superficie de la colonia deseada con la punta de una aguja de inoculación (no un ansa); estriar una nueva placa para el aislamiento
Uso de medios selectivos	Subcultivar la colonia de interés sobre un agar que inhibirá el crecimiento de las colonias no deseadas; por ejemplo, subcultivar un bacilo gramnegativo sobre un agar de MacConkey para separarlo de cocos grampositivos
Uso de sustancias químicas inhibidoras incorporadas dentro del agar (análogo a un medio selectivo)	Subcultivar la colonia de interés sobre un agar que contenga antibióticos o sustancias químicas que inhibirán el crecimiento de las colonias no deseadas
Uso de discos de antibióticos (análogo a una placa de agar que contiene antibióticos, pero más flexible)	Subcultivar la colonia de interés sobre la superficie de una placa con agar y ubicar un disco impregnado en antibiótico diseñado para inhibir la bacteria no deseada

Para realizar la identificación preliminar de un aislamiento bacteriano, el microbiólogo debe evaluar cada una de estas características. En la lámina color 1-3 se muestra una serie de microfotografías de varias tinciones que ilustran numerosos tipos de morfología y ordenamientos espaciales de las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos.

Con la información que se obtiene del análisis de las colonias bacterianas y la tinción de Gram de los frotis bacterianos, el microbiólogo puede orientarse hacia los ensayos particulares que le permitan realizar la identificación correcta. Por ejemplo, una colonia hemolítica amarilla cremosa y elevada presente en un agar sangre que consiste en cocos grampositivos agrupados es muy probablemente *Staphylococcus* (véase lámina color 1-3C). Una colonia β -hemolítica translúcida puntiforme sobre agar sangre formada por cocos grampositivos organizados en cadena es muy probable que sea un estreptococo (véase lámina en color 1-3D).

Sin embargo, los microbiólogos aprenden enseguida a no basarse sólo en el examen de la tinción de Gram de los frotis porque las reacciones de tinción pueden ser variables, sobre todo en el caso de las colonias muy jóvenes o muy viejas. La morfología de las bacterias en una tinción de Gram es más característica cuando los frotis se preparan de un caldo de subcultivo fresco (4-6 horas), momento en el cual las bacterias se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. A menudo, cuando los frotis se preparan de colonias que crecen en la superficie del agar, la morfología en la tinción de Gram es menos característica.

Los microbiólogos deben proporcionar a los médicos tanta información preliminar como sea posible. En ciertos casos especiales, como cuando se observan bacterias en un hemocultivo o directamente en LCR, esta información preliminar puede ser lo suficientemente útil para indicar el tratamiento con anti-



Figura 1-19 Técnica para tomar una colonia bacteriana aislada con un ansa recta con el objeto de realizar un subcultivo en otro medio.

bióticos específicos antes de que se cuente con la identificación final o el antibiograma.

PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LAS BACTERIAS AISLADAS

La mayoría de los ensayos utilizados para determinar la actividad bioquímica o metabólica de las bacterias con el propósito de identificar una cepa aislada se realizan mediante la inoculación de la cepa aislada primaria en medios de pruebas

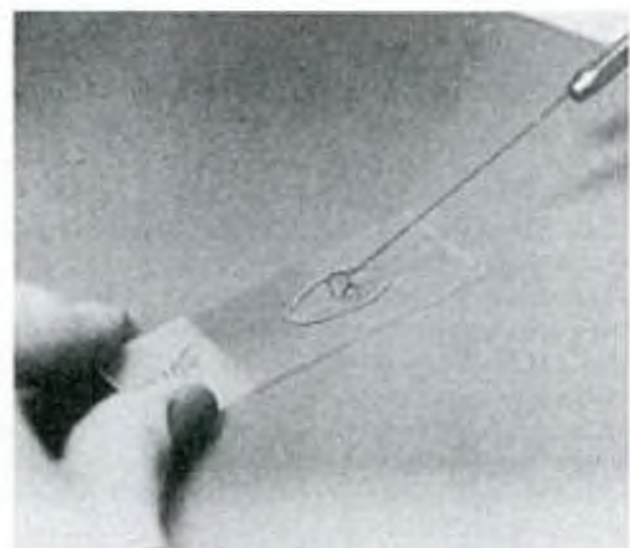


Figura 1-20 Técnica para la preparación de un frotis para la tinción de Gram. La parte superior de una colonia bacteriana aislada, como se ilustra en la figura 1-19, se toca con un ansa recta o unsa de inoculación, luego la punta del ansa se sumerge en una gota de agua o solución fisiológica en un portaobjetos de vidrio. El inóculo se emulsiona y la preparación se seca al aire antes de fijarla con calor y teñirla.

diferenciales o en soluciones. La observación inicial y la interpretación de un medio de cultivo deben utilizarse para determinar si el o los microorganismos aislados merecen identificación posterior y si se debe realizar el antibiograma.

Procedimientos bioquímicos directos para la identificación bacteriana preliminar. Se pueden realizar ciertas observaciones preliminares o un ensayo rápido directo sobre las colonias seleccionadas. Con frecuencia, una bacteria puede identificarse hasta un nivel de utilidad clínica basándose sólo en estas determinaciones. Por ejemplo, las propiedades de utilización de la lactosa de los bacilos gramnegativos pueden evaluarse directamente sobre el agar de MacConkey observando la pigmentación roja de las colonias; la producción de H₂S puede detectarse en los agares de Hektoen y XLD observando un centro negro en las colonias. También se puede sospechar la descarboxilación de la lisina cuando se advierte crecimiento de colonias en el agar XLD. Un halo rojo alrededor de la colonia, que indica una variación a pH alcalino, revela la descarboxilación de la lisina.

A continuación se describen los ensayos directos que pueden realizarse sobre colonias aisladas que se recuperaron a partir de placas de cultivo primario:

Prueba de la catalasa. Se colocan unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre la colonia. La rápida efervescencia indica la producción de oxígeno molecular y un resultado positivo (véase protocolo 1-1). Puede ser difícil obtener resultados exactos si el ensayo se realiza en colonias que crecen sobre placas de agar sangre debido a la presencia de peroxidasa en los eritrocitos. Sin embargo, la reacción de peroxidasa que producen los eritrocitos es tardía y débil y puede diferenciarse con facilidad de la reacción inmediata y fuertemente activa que causan las bacterias catalasa positivas. La prueba de la catalasa se usa muy a menudo para diferenciar los estafilococos (positiva) de los estreptococos (negativa) o las especies de *Bacillus* (positiva) de las de *Clostridium tertium* (negativa).

Prueba de solubilidad de la bilis. Se utilizan dos métodos para determinar la solubilidad de la bilis. A modo de análisis inicial, se colocan unas gotas de una solución de desoxicolato de sodio al 10% sobre las presuntas colonias de *Streptococcus pneumoniae*. Las colonias de neumococos se lisan por completo y desaparecen luego de unos 30 minutos (véase protocolo 1-2). Esta prueba es a veces difícil de interpretar; el ensayo en tubo es más directo. Se puede resuspender un inóculo de la colonia bacteriana desconocida en una solución de desoxicolato al 10% (sales biliares) hasta que se alcanza turbidez. La clarificación de la turbidez luego de una incubación de 30 a 60 minutos a 35 °C indica la solubilidad de la bilis (véase protocolo 1-2). En forma simultánea se debe efectuar un ensayo de control con *Streptococcus viridans*, que no se disuelve en la bilis. Como alternativa, se puede realizar un ensayo rápido de aglutinación de partículas de látex para neumococos.

Prueba de la coagulasa en portaobjetos. Se emulsiona una colonia que se presume de *Staphylococcus* en una gota de plasma de conejo sobre un portaobjetos de vidrio. La agregación de las bacterias dentro de los 2 minutos indica la presencia de coagulasa unida y constituye un resultado positivo de la prueba (véase protocolo 1-3). Luego de una prueba de la coagulasa en portaobjetos con resultado negativo debe realizarse una prueba de la coagulasa en tubo convencional. También se pueden utilizar las pruebas de aglutinación para la detección de la proteína A de estafilococos como un marcador de *Staphylococcus aureus*. Muchos laboratorios basan la identificación de los estafilococos en la presencia o la ausencia de coagulasa. En ese caso, el informe debe indicar la presencia de estafilococos coa-

gulasa positivos o negativos, en lugar de un nombre específico de especie (p. ej., *S. aureus*).

Prueba de la mancha directa de indol. Se transfiere una pequeña porción de la colonia que se va a ensayar desde un medio no selectivo, como agar sangre o chocolate, a una tira de papel de filtro previamente saturada con el reactivo de Kovac o una solución de *p*-dimetilaminocinamaldehído (PACA). La aparición inmediata de color rojo con el reactivo de Kovac indica la presencia de indol y la prueba es positiva (véase protocolo 1-4). El PACA es más sensible que el reactivo de Kovac y la rápida aparición de color azul indica una reacción positiva. En muchos laboratorios, aparecen luego de 24 horas de incubación en el agar de MacConkey colonias de aspecto seco, lactosa positivas y mancha de indol positiva, sobre todo en aislamientos de las vías urinarias, que se identifican presuntamente como *E. coli* y casi nunca se realizan otras pruebas posteriores. En estos casos, la prueba de la mancha de indol debe efectuarse sobre colonias que están creciendo en placas de agar sangre en paralelo, debido a que la pigmentación de las colonias lactosa positivas en el agar de MacConkey dificulta la interpretación de la reacción de color.

Prueba de la citocromooxidasa. Se extiende una parte de la colonia que se va a ensayar sobre un área de una tira para la prueba de oxidasa impregnada con el reactivo. La aparición inmediata de color azul indica actividad de citocromo oxidasa y un resultado positivo de la prueba (véase protocolo 1-5). La prueba de citocromo oxidasa es de utilidad para la categorización inicial de muchas especies bacterianas que tienen diferente morfología de colonia. Se puede descartar que las colonias oxidasa positivas pertenezcan a las Enterobacteriaceae, las cuales son uniformemente negativas. Las especies bacterianas que producen citocromo oxidasa incluyen las especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Pasteurella*.

Prueba de MUG. Se pueden utilizar otras pruebas directas para el análisis inicial de ciertos microorganismos a partir de cultivos primarios, lo cual ofrece un posible ahorro en procedimientos de diferenciación que insumen más tiempo y son costosos. La prueba de MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronidasa), una de ellas, se basa en la capacidad de un microorganismo desconocido para producir β -glucuronidasa. Esta prueba puede utilizarse como análisis preliminar de *E. coli* en lugar de la prueba del indol. Se inocula una suspensión concentrada del microorganismo desconocido dentro del reactivo MUG, que ha sido resuspendido en tubos o impregnado en discos deshidratados. Si la β -glucuronidasa está presente, el reactivo fluoresce debido a la liberación de 4-metilumbeliferona. También puede detectarse indol mediante el agregado del reactivo de Kovac al tubo de MUG, lo cual convierte esta prueba combinada en un método de valor para el análisis de los bacilos entéricos fermentadores de lactosa.

Prueba de PYR. El sustrato L-pirrolidoni- β -naftilamida (PyR) es un método simple para la identificación rápida de enterococos. Luego de 4 horas de incubación, a partir de la inoculación del sustrato con una suspensión líquida concentrada del microorganismo desconocido preparada a partir de una placa de aislamiento primario, la producción de color rojo luego del agregado del reactivo N,N-metilaminocinamaldehído indica la presencia de enterococos (los estreptococos del grupo A son también PyR positivos, pero pueden diferenciarse mediante criterios morfológicos; véase protocolo 1-6).

Identificación de las bacterias según las especies y selección de las características diferenciales. La caracterización final de una cepa bacteriana aislada desconocida suele lograrse mediante el ensayo de sistemas enzimáticos característicos para cada espe-

cie. Estos sistemas de enzimas se detectan por la inoculación de pequeñas porciones de una colonia bacteriana bien aislada dentro de diversos medios de cultivo que contienen sustratos específicos e indicadores químicos. A través de ellos, el microbiólogo puede detectar cambios en el pH del medio provocados por la utilización de los sustratos químicos o cambios de color causados por productos derivados específicos. El microbiólogo clínico debe seleccionar grupos apropiados de características diferenciales que le permitan la identificación de cada grupo de bacterias. Uno de los mayores avances en el diagnóstico microbiológico ha sido la miniaturización de los sistemas bioquímicos, de modo que se pueden examinar múltiples características de manera expeditiva y a un costo relativamente bajo. Antes de estos progresos, se realizaba un número pequeño de pruebas en tubos o placas, seguidas de análisis basados en los resultados iniciales. Este proceso era lento, costoso y más proclive al error que los enfoques modernos.⁸⁷

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DIFERENTES DE LAS BACTERIAS

Hongos. Las levaduras comparten muchas características con las bacterias y, en consecuencia, se aplican enfoques similares. Se puede utilizar la prueba de la ureasa (incluida la versión rápida) para examinar microorganismos aislados de muestras respiratorias, debido a que el patógeno más frecuente (*Cryptococcus neoformans*) produce ureasa, mientras que la levadura comensal aislada más a menudo (especies de *Candida*) no contiene esta enzima, salvo raras excepciones. Las levaduras se identifican por sus características morfológicas, además de por la asimilación o fermentación de los hidratos de carbono. Para la identificación de las levaduras suelen emplearse variaciones de los enfoques que se aplican para las bacterias.

Sin embargo, la base de la identificación de las cepas de hongos filamentosos es el estudio morfológico de los caracteres reproductivos asexuales. Las pruebas bioquímicas tienen un papel secundario.

Micobacterias. Dado que se trata de bacterias especializadas, el enfoque para su identificación es similar al de las bacterias. No obstante, las pruebas bioquímicas son mucho más difíciles en el caso de las micobacterias que de las bacterias convencionales. La mayoría de los directores de los laboratorios eligen enviar las muestras a laboratorios especializados o utilizar técnicas de biología molecular con sondas moleculares específicas para la identificación de las especies aisladas con mayor frecuencia.

Parásitos. Salvo raras excepciones, la caracterización de los parásitos se efectúa por medio de estudios morfológicos. Es muy raro que se realice el cultivo de los parásitos.

Virus. Dado que se trata de patógenos intracelulares estrictos, los virus requieren un enfoque diagnóstico muy diferente. Las técnicas predominantes utilizadas para el diagnóstico virológico son la caracterización de antígenos y la de ácidos nucleicos.

ANTIBIOGRAMA

En muchos aspectos, la determinación de la sensibilidad de un patógeno a un antibiótico determinado es la tarea más importante que se realiza en los laboratorios de diagnóstico microbiológico. En el recuadro 1-11 se resumen algunos de los factores que deben evaluarse cuando se consideran los antibiogramas.

Los antibiogramas se usan muy a menudo como guía para el tratamiento de las infecciones bacterianas y micobacterianas

Recuadro 1-11 Factores que influyen en el antibiograma

Factor	Criterio
Aislamiento	Patógeno potencial de una muestra válida (probablemente no representa flora colonizante)
Sensibilidad	No predecible para agentes infecciosos y antibióticos
Situación clínica	Indicación del tratamiento con antibióticos
Estándares de interpretación	Disponibilidad de criterios validados para la determinación del significado clínico del resultado

(véanse caps. 17 y 19). La tarea del microbiólogo clínico es asegurar, en el mayor grado posible, que el ensayo se realice sobre el aislamiento apropiado y con los métodos válidos. El camino más fácil es ceder ante la insistencia de un médico que requiere un ensayo sobre una cepa para la cual no existen estándares de interpretación, pero el microbiólogo debe resistir la tentación de hacerlo.

En ciertas situaciones se puede requerir un análisis de sensibilidad para bacterias anaerobias, hongos y virus, pero no es necesario realizarlo en forma sistemática. Si se analizan estos agentes, es importante que un médico experimentado, capaz de interpretar los resultados de manera apropiada, participe en la atención del paciente.

Utilización de los resultados del antibiograma para el control de calidad de los datos de identificación bacteriana. Algunas bacterias presentan una sensibilidad predecible a ciertos antibióticos y no necesitan ensayarse. Muchas más tienen patrones de sensibilidad característicos que no son lo suficientemente absolutos como para obviar el ensayo. Sin embargo, estos patrones pueden utilizarse como control de la caracterización taxonómica. Por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae* es casi siempre resistente a la ampicilina, pero sensible a las cefalosporinas de primera generación. Por el contrario, las especies de *Enterobacter* suelen ser resistentes a ambos grupos de antibióticos. Si una bacteria se identificó como *Enterobacter*, pero es sensible a estos agentes, se deben poner en duda estos resultados. Se deben repetir los ensayos para caracterización y sensibilidad, dado que uno, ambos o ningún resultado podrían estar equivocados. De manera óptima se debería utilizar un método diferente del que se empleó al principio para repetir la prueba.

RELACIÓN COSTO-EFICACIA EN LA FASE ANALÍTICA

En la fase analítica, los recursos pueden utilizarse de manera eficaz si se presta particular atención a algunas de las áreas de esta fase. Es posible utilizar protocolos abreviados para la identificación de ciertos microorganismos (cuadro 1-15). El NCCLS ha proporcionado recomendaciones de consenso para ciertos enfoques.⁸⁸ En el cuadro 1-16 se resumen otras formas para optimizar los recursos. El fundamento de estos enfoques se centra en los resultados que pueden interpretarse en forma correcta y que conducirán al mejor tratamiento para el paciente. Un principio conceptual es pensar que las muestras pueden agruparse en dos categorías amplias: 1) aquellas a partir de las cuales se aíslan agentes que son muy probablemente patógenos y 2) aquellas a partir de las cuales se aíslan agentes que no pueden interpretarse con confianza. Si un microbiólogo le presta

Cuadro 1-15 Identificación abreviada de las bacterias y los hongos		
SITUACIÓN	PROTOCOLO DE PRUEBAS ABREVIADO	IDENTIFICACIÓN
Gramnegativo, no abundante, oxidasa negativo, β -hemolítico en agar sangre de camero*	Sin pruebas adicionales	<i>Escherichia coli</i>
Gramnegativo, no abundante, oxidasa negativo, no hemolítico en agar sangre de camero, fermentador de lactosa*	PYR negativa	<i>Escherichia coli</i>
Gramnegativo, no abundante, oxidasa negativo, no hemolítico en agar sangre de camero, no fermentador de lactosa*	MUG positiva	<i>Escherichia coli</i>
Bacilos pequeños o coccobacilos gramnegativos aislados de muestras respiratorias o de líquido cefalorraquídeo; crecimiento en agar chocolate con 5% de CO_2 pero no en agar sangre de camero*	Prueba rápida para síntesis de porfirinas negativa	<i>Haemophilus influenzae</i> (no puede diferenciarse de <i>Haemophilus hemolyticus</i> , un patógeno humano poco común)
Diplococos gramnegativos, oxidasa positivos, crecimiento en agar chocolate y agar sangre de camero*	Prueba rápida de esterasa de butirato o DNasa positiva	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa, crecimiento abundante en agar chocolate o agar sangre de camero*	Indol positiva	<i>Proteus vulgaris</i>
Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa, crecimiento abundante en agar chocolate o agar sangre de camero*	Indol negativa; sensible a ampicilina	<i>Proteus mirabilis</i>
Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa, crecimiento abundante en agar chocolate o agar sangre de camero*	Indol negativa; resistente a ampicilina; maltosa negativa; ornitina positiva	<i>Proteus mirabilis</i>
Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa, crecimiento abundante en agar chocolate o agar sangre de camero*	Indol negativa; resistente a ampicilina; maltosa positiva; ornitina negativa	<i>Proteus penneri</i>
Bacilos gramnegativos, oxidasa positivo, aroma típico de uvas Concord, morfología típica de las colonias (brillo metálico, verde/rojo/negro, mucoso)*	Sin pruebas adicionales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (los aislamientos poco comunes de <i>Aeromonas</i> pueden ser similares pero dan positiva la prueba de la mancha de indol)
Cocos grampositivos en agrupamientos; catalasa positivos; colonias cremosas opacas amarillentas en agar sangre de camero (coloración acentuada en agar chocolate)*	Coagulasa en portaobjetos y/o coagulasa de 4 horas en tubo positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus coagulans</i> positivas); rara vez otros estafilococos pueden ser positivos en una u otra prueba de la coagulasa
Cocos grampositivos en pares o cadenas cortas; catalasa negativos u ocasionalmente positivos débiles; no β -hemolíticos en agar sangre de camero*	PYR positiva	Especies de <i>Enterococcus</i> ; el fracaso del crecimiento adecuado en las pruebas de sensibilidad sugiere que el aislamiento puede ser de otro género
Cocos grampositivos en pares o cadenas cortas; catalasa negativos; usualmente una zona estrecha de β -hemólisis *	Prueba rápida de hidrólisis de hipurato positiva; prueba de la mancha CAMP positiva; o aglutinación de látex con anticuerpos específicos positiva	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B); los enterococos β -hemolíticos puede ser hipurato positivos, pero también son PYR positivos
Cocos grampositivos en pares o cadenas cortas; catalasa negativos; α -hemolíticos en agar sangre de camero; colonias típicamente mucosas o en forma de "damero"*	Mancha de bilis o solubilidad de bilis en tubo positiva; Pneumolide® positivo; reacción de hinchazón capsular positiva; o aglutinación de látex con anticuerpos específicos positiva	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Cocos grampositivos en pares o cadenas; catalasa negativos; β -hemolíticos en agar sangre de camero con una zona ancha de hemólisis; colonias usualmente secas y pequeñas en relación con la hemólisis*	PYR positiva o aglutinación de látex con anticuerpos específicos positiva	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A); cepas acasinales de enterococos β -hemolíticos tienen diferente morfología de colonias y presentan aglutinación negativa
Bacilos gramnegativos pequeños; oxidasa positivos; agar poseada, colonias con apariencia de "sombrero mexicano" o "gota de rocío" en agar sangre de camero, olor a lejía	Sin pruebas adicionales	<i>Eikenella corrodens</i>

(Continúa)

Cuadro 1-16 Identificación abreviada de las bacterias y los hongos (cont.)

SITUACIÓN	PROTOCOLO DE PRUEBAS ABREVIADO	IDENTIFICACIÓN
Bacilos regulares o cocobacilos gramnegativos con grandes colonias (> 1 mm) en agar sangre anaerobio y un tamaño similar en agares LKV y BBE; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ *	No son esenciales las pruebas adicionales; puede usarse como evidencia adicional el patrón de discos (resistencia a penicilina, resistencia a kanamicina; sensibilidad a rifampicina)	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>
Bacilos gramnegativos fusiformes, delgados, puntiformes; colonias de miga de pan u opalescentes en agar sangre anaerobio; sin crecimiento en agar BEE; sin crecimiento en agar chocolate 5% CO ₂ *	Mancha de indol positiva	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Bacilos gramnegativos; colonias pequeñas (< 1 mm) en agar sangre anaerobio y agar BEE luego de al menos 48 horas de incubación; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ ; punto negro en el centro de la colonia por producción de H ₂ S*	Catalasa fuertemente positiva	<i>Bifidobacterium wadsworthii</i>
Bacilos gramnegativos cocobacilares pequeños; colonias negras (o con fluorescencia roja ladrillo bajo luz UV de longitud de onda larga) en agar LKV; colonias pequeñas translúcidas u opacas en agar BAP anaerobio; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ *	Sin necesidad de pruebas adicionales	Especies de <i>Prevotella</i> ; <i>Prevotella intermedia</i> si la mancha de indol es positiva
Bacilos gramnegativos cocobacilares pequeños; colonias pequeñas translúcidas u opacas en agar BAP anaerobio con fluorescencia roja ladrillo bajo luz UV de longitud de onda larga; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ *	Mancha de indol positiva	Especies de <i>Porphyromonas</i>
Bacilos gramnegativos delgados; colonias planas, transparentes que producen hoyos en el agar BAP anaerobio; sin crecimiento en agar LKV; sin crecimiento en agar chocolate incubado en 5% CO ₂ ; catalasa negativos; ureasa positivos*	Sin necesidad de pruebas adicionales	<i>Bacteroides ureolyticus</i>
Diplococos gramnegativos diminutos; colonias pequeñas (< 1 mm) de transparentes a opacas en agar BAP anaerobio con fluorescencia roja bajo luz UV de longitud de onda larga; sin crecimiento en agar BBE; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ *	Sin necesidad de pruebas adicionales	Especies de <i>Weillanella</i>
Bacterias grampositivas o gramvariables, grandes, en forma de vagón, de extremos romos; colonias grandes (> 2 mm) irregulares con una zona doble de β-hemólisis en BAP anaerobio; sin crecimiento en agares LKV o BBE; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ ; catalasa negativos*	Sin necesidad de pruebas adicionales	<i>Clostridium perfringens</i>
Bacilos grampositivos delgados con hinchazón, esporas subterminales; crecimiento vivo abundante en agar BAP anaerobio; sin crecimiento en agares LKV o BBE; sin crecimiento en agar chocolate en 5% CO ₂ ; catalasa negativos; mancha de indol negativa*	Sin necesidad de pruebas adicionales	<i>Clostridium septicum</i>
Bacilos gramnegativos delgados con esporas subterminales; crecimiento equivalente en agar BAP anaerobio y en agar chocolate en 5% CO ₂ ; catalasa negativos	Sin necesidad de pruebas adicionales	<i>Clostridium tertium</i>
Bacilos grampositivos pleomórficos corineformes; colonias pequeñas (1 u 2 mm) opacas blanco esmalte en agar BAP anaerobio; catalasa positivos; mancha de indol positiva*	Sin necesidad de pruebas adicionales	<i>Propionibacterium acnes</i>
Levaduras en brotación*	Prueba de germinación en tubo positiva en < 3 horas; o proyecciones miceliales desde las colonias en medio que contiene sangre en menos de 48 horas de incubación	<i>Candida albicans</i>
Levaduras en brotación esféricas; a menudo colonias mucosas*	Prueba rápida de fenol oxidasas positiva	<i>Cryptococcus neoformans</i> (los cryptococos puede excluirse de las colonias con prueba rápida de ureasa negativa)

* A partir de las recomendaciones contenidas de la referencia**.

Cuadro 1-16 Algunas estrategias sugeridas para optimizar las identificaciones en el laboratorio

CATEGORÍA	CRITERIO PROPUESTO*
Muestras repetidas de un sitio <i>no estéril</i> dentro de un período definido	Referir en las muestras siguientes la evaluación previa; si las muestras siguientes se inocularon en el medio y se observaron diferencias sustanciales con la muestra original, consultar con el médico acerca de las acciones futuras
Flora mixta de un sitio <i>no estéril</i> , especialmente si es remitido en un hisopo; mínima inflamación o sin disponibilidad de frotis teñidos con Gram	Informar como flora mixta grampositiva/gramnegativa
Flora mixta de un sitio <i>no estéril</i> , especialmente si es remitido en un hisopo; presencia de inflamación moderada a severa	Informar como flora mixta grampositiva/gramnegativa, adjuntar un comentario para consultar dentro de los 10 días por el procesamiento ulterior
Flora mixta de un sitio <i>no estéril</i> , especialmente si es remitido en un hisopo; presencia de inflamación moderada a severa; presencia de un único patógeno potencial predominante	Informar la identificación de un patógeno predominante y la presencia de flora mixta; realizar el antibiograma sobre el patógeno predominante o adjuntar un comentario sobre consultar con el laboratorio acerca de las pruebas de sensibilidad
Aislamiento de levaduras de cultivos mixtos con bacterias a partir de un sitio <i>no estéril</i> o potencialmente contaminado, como una herida o líquido peritoneal	Informar la presencia de levaduras; considerar adjuntar un comentario acerca de consultar con el laboratorio por procesamiento ulterior
Flora mixta a partir de muestras de orina del chorro medio de la micción obtenida en condiciones adecuadas de higiene o de un catéter permanente	Informe como flora mixta grampositiva/gramnegativa, adjuntar un comentario sugiriendo 1) repita la recolección con un catéter que sea extraíble, si se encuentra clínicamente indicado y el paciente no tiene un catéter permanente o 2) notifique al laboratorio si el paciente tiene un catéter permanente y necesita terapia antimicrobiana
Flora mixta con un único patógeno predominante a partir de muestras de orina del chorro medio de la micción obtenida en condiciones adecuadas de higiene o de un catéter permanente	Evalúe el patógeno predominante, adjunte un comentario que indique la presencia de flora mixta
Presencia de flora vaginal mixta	Informe sólo la presencia o ausencia de los patógenos vaginales documentados que se encuentran mejor documentados por el cultivo; p. ej., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> (en mujeres en edad fértil), <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (si se sospecha un síndrome de shock tóxico) y levaduras. Rara vez se indican las pruebas de sensibilidad
Flora mixta a partir de un catéter intravascular	Informe como flora mixta grampositiva/gramnegativa, adjuntar un comentario acerca de consultar con el laboratorio por el procesamiento ulterior
Aislamiento de bacterias que se asemejan a <i>Haemophilus influenzae</i> o <i>Moraxella catarrhalis</i> a partir de esputos expectorados	Preceder con la identificación e informar el resultado sólo si se encuentra un organismo en una tinción de Gram concomitante asociada con neutrófilos polimorfonucleares

* Es un buen criterio preservar las muestras cuya evaluación no se ha completado durante al menos 24 horas. Preservar las placas de agar cuya evaluación no se ha completado durante un período. Siere días es un tiempo conveniente para preservar las placas, dado que todas las placas de un día pueden almacenarse frías y decimarlas una semana después.

igual atención a las dos categorías, es muy probable que se hayan malgastado muchos recursos en muestras de significado dudoso y que las muestras más importantes sean subestimadas.

La función de cada microbiólogo es tomar las decisiones del laboratorio, de acuerdo con el entorno local. Una primera consideración es evitar informar resultados que puedan interpretarse de manera errónea. Un informe de "flora mixta; interpretación dificultosa" es probable que estimule la recolección de otra muestra (con la esperanza de que sea mejor) o el tratamiento del paciente sobre la base de los patógenos que probablemente sean la causa de la infección particular. Ponerle el nombre a un microorganismo aislado que de hecho es flora colonizante o contaminante le da al microorganismo mayor relevancia de la que merece. El agregado de los resultados del antibiograma complica aún más la situación. Se puede utilizar una analogía con el béisbol para ilustrar los errores más comunes:

1. Muestra enviada en hisopos: primer golpe (*strike one*).
2. Ausencia de neutrófilos polimorfonucleares o no se solicitó un frotis para tinción de Gram: segundo golpe (*strike two*).
3. Presencia de flora mixta: tercer golpe (*strike three*).
4. Usted está fuera de juego (*out*).

La pregunta que surge es: "¿Qué es flora bacteriana mixta?". Para tomar la decisión, que debe hacerse en forma individual para cada muestra, son esenciales el sentido común y una sólida base en los principios del diagnóstico microbiológico. Por ejemplo, *Streptococcus pyogenes* es un patógeno importante, más allá de cuántas otras especies estén presentes; en cualquier colonia β -hemolítica debe evaluarse la presencia de antígeno de estreptococos del grupo A. Como una guía, Schreckenberger y Miller propusieron la "Regla de tres".^{61,100} Sugirieron que se deben evaluar uno o dos patógenos potenciales, incluso en pre-

sencia de flora comensal, pero no se deben evaluar tres o más patógenos potenciales.

La guía de la "Regla de tres" es una ayuda, pero se debe utilizar un criterio lógico. Por ejemplo, la regla no debe aplicarse en forma automática a una muestra de tejido de biopsia, líquidos de aspirado o pus. En el aparato urinario, una mezcla de tres o más microorganismos de cualquier variedad sugiere contaminación con flora vaginal o perineal; aun cuando un patógeno potencial sea parte de la mezcla y no predomine, es difícil confiar en que el análisis proporcionará información válida. A veces, la relación cuantitativa de los microorganismos en la mezcla puede proporcionar un indicio. Si uno o probablemente dos microorganismos predominan claramente, es razonable evaluarlos e informar además la presencia de flora mixta.

Cabe destacar que cuando un microbiólogo examina una placa de agar y determina que hay una mezcla de tipos de bacterias, en realidad está observando una mezcla de tipos de colonias bacterianas (diferentes morfologías de colonias). Estas colonias visualmente diferentes suelen representar distintas especies (o incluso géneros), pero también pueden representar variantes fenotípicas de microorganismos con un solo genotipo. La única manera de estar seguro de que se aislaron múltiples especies de bacterias es identificarlas a todas, y por supuesto, para ese momento ya se habrá completado el trabajo. En la práctica, debemos aplicar nuestro criterio para decidir si las colonias son lo suficientemente diferentes como para que se justifique la caracterización del crecimiento como una mezcla o reconocer que a veces es posible equivocarse.

Un enfoque sensato en estas situaciones es ofrecerle al médico la oportunidad de solicitar que se evalúen los aislamientos o iniciar un diálogo preventivo a través de un informe verbal telefónico o de una comunicación escrita en el cuaderno de registro del laboratorio. Un modo sencillo es conservar las placas

sobre las cuales se solicitó una consulta o las que contienen flora mixta. Si cada día las placas se separan, se encantan (con una cinta adhesiva) y se guardan durante siete días, las muestras vencidas pueden descartarse con facilidad. Si surge una discusión y se continúa con la evaluación de esa muestra, el microbiólogo tendrá una posición más segura si conservó la muestra que si la descartó.

Las técnicas y la interpretación de los procedimientos anteriores se tratarán con más detalles en los capítulos siguientes. En la era de los costos restringidos, es imperativo que los microbiólogos apliquen sus habilidades de observación y la utilización de algunas características seleccionadas para identificar las especies bacterianas en forma presuntiva cuando sea posible. El desarrollo de este "sexto sentido" microbiológico puede ser también útil para verificar los resultados obtenidos a partir de equipos de diagnóstico comerciales o de dispositivos automáticos. En ocasiones, los números de biotipo que informan estos sistemas están en desacuerdo con las características de las colonias, la morfología en la tinción de Gram o las pruebas bioquímicas de manchas. Se debe realizar un estudio continuo para evitar los informes erróneos.

Fase posanalítica

INFORME DE LOS RESULTADOS

Los informes con los resultados de los cultivos microbiológicos se deben emitir en cuanto la información útil esté disponible. Cada director de laboratorio debe establecer los resultados que deben considerarse "urgentes" o "valores de alerta". Asimismo, algunos resultados pueden considerarse "importantes", pero no necesariamente "urgentes". En el cuadro 1-17 se enumeran algunos resultados "urgentes" e "importantes" típicos. La confección de este tipo de listas varía mucho, de acuer-

Cuadro 1-17 Lista sugerida de informes "urgentes" o "importantes"	
INFORMES "URGENTES"	INFORMES "IMPORTANTES"
Hemocultivos positivos	Tejidos y líquidos positivos que no sean sangre ni líquido cefalorraquídeo
Cultivos de líquido cefalorraquídeo positivos	Patógenos fecales
Frotis positivos para bacilos ácido-alcohol resistentes	Otros parásitos positivos que no sean las especies de <i>Plasmodium</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Patógenos de transmisión sexual
Especies de <i>Plasmodium</i> , especialmente <i>P. falciparum</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> si se aísla a través del protocolo de cultivo de parto
<i>Streptococcus pyogenes</i> a partir de sitio normalmente estéril o de origen genital	<i>Streptococcus pyogenes</i> a partir de un cultivo faríngeo
<i>Streptococcus agalactiae</i> a partir de un sitio genital de una mujer embarazada de término	Patógenos virales positivos
Virus del herpes simple a partir de un sitio genital de una mujer embarazada de término	Hongos dimorfos positivos
	Antígenos positivos o pruebas de ácidos nucleicos realizadas directamente sobre muestras clínicas
* Esta lista es un modelo de referencia y debe ser modificada de acuerdo con las condiciones locales.	

do con factores como la capacidad de los sistemas de información de la institución y la relación que se establece entre los médicos y el laboratorio. Además de las categorías definidas, el médico puede tener la oportunidad de solicitar un resultado sobre algún cultivo en forma telefónica en el momento en que se solicitó el examen.

Los resultados "urgentes" siempre se deben informar por teléfono a la persona que asiste al paciente. Los resultados "importantes" pueden informarse por teléfono, fax, ordenador o papel. La principal consideración es que todas las partes comprendan las reglas. Si todos los resultados del laboratorio están disponibles de manera inmediata y conveniente para los usuarios de los servicios del laboratorio, los médicos van a encontrar mucho más ventajoso obtener todos los resultados, excepto los urgentes, en forma electrónica. Siempre que un informe pueda ser visto por personal no autorizado, debe asegurarse la confidencialidad de los datos del paciente; por ejemplo, enviar los faxes sólo a los aparatos de recepción seguros. Es de buena práctica tener un protocolo para los informes telefónicos donde se especifique quién puede recibirlos en caso de que la persona que asiste al enfermo no se encuentre disponible; este protocolo debe ser aceptable para el médico y para el personal del laboratorio.

Como política del laboratorio se deben realizar informes puntuales preliminares y provisionales. Por ejemplo, los informes preliminares sobre los cultivos negativos deben emitirse dentro de las 48 horas. El momento de emisión del informe inicial para otros tipos de agentes variará de acuerdo con la velocidad de crecimiento; por ejemplo, en forma semanal para las micobacterias, dos veces la primera semana y luego semanalmente para los hongos. Un informe provisional de un "cultivo negativo" puede ser de ayuda, ya que el médico puede desear evaluar nuevamente el caso mientras está pendiente el informe final. Los informes finales deben emitirse lo antes posible; para la mayoría de los cultivos bacterianos, 48 horas es un plazo razonable.

INTERACCIÓN CON LOS EPIDEMIOLOGOS

Los microbiólogos desempeñan un papel importante en el resguardo de la salud de los pacientes y, en general, de la salud pública.^{18,19} Ciertos agentes infecciosos deben informarse por ley a las autoridades de salud pública; la lista varía según el estado y debe estar disponible en el laboratorio. El informe debe ser escrito o, cada vez más, enviarse por vía electrónica. Dentro de una institución se debe estimular una relación similar con los epidemiólogos del hospital (o del sistema de atención de salud). Los epidemiólogos deben revisar ciertos resultados de laboratorio en forma regular. Además, los microbiólogos deben permanecer alertas frente a los patrones poco comunes de aislamiento que merecen una mención al epidemiólogo para que los considere para una investigación posterior. A veces, la caracterización molecular de un aislamiento puede aumentar la calidad de las investigaciones epidemiológicas. Las pruebas adicionales deben hacerse localmente o en un laboratorio de referencia, según la capacidad profesional de cada lugar.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El director es responsable de la comunicación con los médicos acerca de ciertos parámetros importantes sobre el funcionamiento del laboratorio (recuadro 1-12). En condiciones óptimas, esta comunicación debería tenerse con los médicos en

Recuadro 1-12 Parámetros del desempeño del laboratorio y de los resultados clínicos

Actividad	Parámetros
Hemocultivos	Frecuencia y tasa de aislamiento de "organismo de la piel"/"contaminantes" Frecuencia y tasa de envíos de cultivos únicos Frecuencia y tasa de aislamiento de patógenos potenciales
Examen directo de muestras clínicas	Análisis del tiempo de respuesta global de un laboratorio
Antibiograma	Resumen del porcentaje de sensibilidad de patógenos bacterianos de importancia

forma individual o con grupos de médicos (p. ej., grupos por especialidad), si los sistemas locales de información lo permiten. La herramienta final de control de calidad para los médicos es recibir una ficha de registro que detalla la solicitud de estudios y los resultados de sus pacientes (p. ej., la frecuencia y la tasa de análisis positivos) en comparación con la de otros médicos. Se desalienta el diseño de este tipo de informes porque es difícil asegurar que los profesionales que se comparan atiendan a grupos de pacientes que son verdaderamente equivalentes. Los estudios sobre el tiempo de respuesta global de un laboratorio (*turnaround time*, TAT) son más problemáticos en microbiología que en otras áreas del laboratorio a causa de las demoras inherentes a la generación de los resultados microbiológicos. Ciertos análisis, como el examen directo de muestras clínicas, se prestan para evaluar el tiempo de respuesta global. Se deben suministrar en forma anual los resúmenes de los resultados del antibiograma.

CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LOS REGISTROS

Se deben seguir las guías locales y nacionales para el almacenamiento de las solicitudes y de los informes. Estas difieren según el tipo de muestra y la situación clínica.

Los líquidos corporales estériles o los tejidos deben mantenerse a temperatura ambiente o en heladera hasta que el cultivo se haya evaluado por completo; el líquido cefalorraquídeo debe conservarse a temperatura ambiente debido a la labilidad que presenta *Neisseria meningitidis* a 4 °C. De manera ideal, el tejido debe ser congelado a -70 °C para su futura utilización, aunque esto puede ser dificultoso para muchos laboratorios. A menudo, no es necesario volver al congelador. Sin embargo, en ocasiones, los análisis siguientes (p. ej., luego de la revisión histológica del tejido) pueden sugerir la necesidad de detectar micobacterias, virus u hongos luego de una solicitud inicial sólo de cultivo bacteriano. En esas situaciones, el tejido congelado representa un recurso invaluable con el cual se puede obtener un diagnóstico etiológico específico y se pueden realizar los ensayos de sensibilidad apropiados.

Los aislamientos de los hemocultivos deben mantenerse durante al menos 30 días. De manera ideal, todos los cultivos positivos deben retenerse durante un período (p. ej., 7 días) para permitir su evaluación posterior; por ejemplo, su tipificación molecular, o la realización de otras pruebas de sensibilidad, si la clínica del paciente lo indica. Una vez más el mantenimiento a -70 °C de aislamientos importantes o poco co-

munes es un lujo, pero es muy útil. Si los aislamientos se conservan, se deberá realizar una cuidadosa y rigurosa limpieza de los cultivos para mantener espacio para el almacenamiento de los futuros aislamientos. Se describieron diversos métodos para el almacenamiento de los aislamientos microbianos.⁹² Nosotros encontramos que un método simple y eficaz de preservar aun los aislamientos de bacterias con requerimientos nutricionales especiales y de levaduras, es el simple hecho de colocar en un frasco ampolla estéril un bloque de agar cortado a partir de una placa, que contiene colonias intactas en su superficie. Los hongos pueden mantenerse como "cultivos acuosos" a temperatura ambiente. Los virus deben congelarse a -70°C .

Aspectos administrativos del laboratorio de microbiología

El objetivo de este libro se centra en la ciencia de la microbiología aplicada al diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, en la práctica es imposible separar los asuntos de la microbiología de la ciencia. Una de las virtudes de los laboratorios microbiológicos es la sofisticación de los sistemas de soporte para la implementación de los procesos científicos. Los laboratorios de investigación tienen mucho que aprender sobre el mantenimiento planificado y los

rigurosos controles de calidad de los laboratorios de diagnóstico. Se guiará al lector por una extensa exploración sobre la teoría y la práctica de la gestión de laboratorio.⁹³

Regulación estatal

En los Estados Unidos, el gobierno participa en casi todos los aspectos de evaluación del laboratorio. A pesar de que algunas cuestiones se relacionan directamente con conjuntos de reglamentaciones específicas, todos los aspectos de la gestión de laboratorio derivan, de una u otra forma, de leyes estatales. En muchos casos, los líderes de la industria de los laboratorios privados y académicos establecieron el marco de trabajo y definieron los estándares, que luego fueron adoptados por el estado y aplicados a todos los laboratorios. En el recuadro 1-13 se enumeran las agencias federales y las agencias no gubernamentales involucradas en las reglamentaciones médicas y de los laboratorios.

La autoridad que regula el alcance del laboratorio clínico deriva de la *Clinical Laboratory Improvement Act of 1967* (CLIA '67, Ley de mejoramiento del laboratorio clínico del año 1967). Esta legislación autoriza la reglamentación de los laboratorios clínicos comerciales y de los hospitales. Durante veinte años los laboratorios de otras instituciones estuvieron exentos. Las reformas de la *Clinical Laboratory Improvement*

Recuadro 1-13 Entidades relacionadas con la práctica médica y de laboratorio

Entidad	Área de responsabilidad
Center for Medicare and Medicaid Services (CMS)	Establece las reglas para la acreditación, licencia e inspección de los laboratorios; fija las tasas de reembolso para los servicios Medicare
Centers for Disease Control and Prevention (CDC)	Participan en la categorización de la complejidad de las pruebas; proporcionan las recomendaciones sobre diversos temas, como las técnicas de laboratorio y la preparación para el bioterrorismo
National Institute of Occupational Health and Safety (NIOSH); una división de los CDC	Responsable de las reglamentaciones sobre protección de peligros químicos y biológicos
Occupational Health and Safety Administration (OSHA)	Responsable de las reglamentaciones sobre la seguridad en los lugares de trabajo
Food and Drug Administration (FDA)	Responsable de la aprobación de los medicamentos y de los dispositivos médicos; la FDA quita obstáculos para los dispositivos médicos pero no los "aprueba"
Veterans Affairs Department	Responsable de la salud y el bienestar de los veteranos, incluida la red nacional de hospitales y clínicas
International Air Transport Association (IATA)	Organización internacional de transportistas aéreos; involucrada en la promulgación de las reglas para el envío seguro de los agentes infecciosos por vía aérea
Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (antes, National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS])	Organización voluntaria académica, industrial y gubernamental; su objetivo es mejorar el desempeño de los laboratorios; aunque es una organización consejera, sus recomendaciones a menudo se vuelven estándares de la práctica del laboratorio
American Medical Association (AMA)	La mayor organización de médicos de los Estados Unidos; es responsable del desarrollo de los códigos de las pruebas de laboratorio y de los procedimientos médicos, que sirven de base para los reembolsos
Joint Commission for the Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO)	Inspecciona y acredita a los hospitales y laboratorios hospitalarios; las agencias de cuidado de salud domiciliario, los centros de salud para la atención de las enfermedades crónicas y otros

Cuadro 1-18 Categorías de la complejidad de las pruebas de laboratorio según CLIA '88

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN	REQUERIMIENTOS DEL PERSONAL	ENSAYOS DE APTITUD (PROFICIENCY)	CONTROL DE CALIDAD	COMENTARIOS
Complejidad alta	Pruebas que requieren la mayor habilidad analítica y criterio	Los más estrictos; requiere el equivalente a un título de especialista	Se requiere	Se requiere	Las pruebas de alta y moderada complejidad no se consideran en su conjunto pruebas de exención
Complejidad moderada	Pruebas que requieren habilidad analítica y criterio pero en un nivel menor	Menos estricto; requiere entrenamiento que se puede realizar a la vez que trabaja	Se requiere	Se requiere	Existe una fórmula compleja para categorizar las pruebas en niveles de complejidad
Microscopia realizada por operadores	El examen microscópico realizado por ciertos grupos de médicos	Se deben definir los grupos de operadores; no se puede delegar en otro miembro del personal	Se requiere si corresponde	Se requiere si corresponde	Esta es una subcategoría de las pruebas de moderada complejidad
Pruebas de exención	Pruebas simples que no es probable que tengan consecuencias adversas si se realizan de manera incorrecta	Ninguno	No se requiere	Se deben seguir las instrucciones del fabricante	A la mayoría de los trabajadores de los laboratorios les lleva mucho tiempo comprender para qué vale la pena realizar una prueba si una respuesta incorrecta no causa ningún daño

Para obtener información más detallada, diríjase al sitio de los Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS): <http://www.cms.hhs.gov/clia/appendc.asp>

Amendments of 1988 (CLIA '88, Ley de mejoramiento del laboratorio clínico de 1988) extendieron el mandato para incluir a los laboratorios estatales, de salud pública y los laboratorios de los consultorios médicos que realizan análisis para enfermedades humanas. Los análisis con fines de investigación (los resultados no se aplican a la atención del paciente) y de medicina veterinaria no se encuentran bajo el alcance estatal.

En la reglamentación de la CLIA '88 se establecieron varias categorías de análisis (cuadro 1-18); además, existen muchas otras reglamentaciones, según la categoría en la cual se ubique el análisis. Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) tienen a su cargo la tarea de asignar cada análisis a una categoría compleja. Un grupo de consejeros formado por individuos del estado, la industria, grupos médicos, laboratorios clínicos y de salud pública y consumidores aconseja al estado sobre estas decisiones (*Clinical Laboratory Improvement Advisory Committee* [CLIAAC, Comité consejero sobre el mejoramiento del laboratorio clínico]).

En las reglamentaciones se delinean las especificaciones detalladas sobre la calificación del personal, los ensayos de aptitud (*proficiency*) y el control de calidad para todos los laboratorios no exentos que realizan análisis.

Han surgido numerosas consecuencias de las reglamentaciones de la CLIA '88.

1. La mayoría de los médicos han dejado de realizar todos los análisis excepto los más básicos porque las reglamentaciones imponen requerimientos considerados demasiado agobiantes.
2. Existe una presión constante por parte de los grupos médicos (que no son patólogos) para que las reglamentaciones sean más flexibles y permitan la realización de análisis más complejos sin controles estrictos.

3. Los fabricantes se esfuerzan para que sus instrumentos y productos se ubiquen en la categoría de las pruebas de exención, de modo que puedan comercializarlos directamente con los médicos como simples pruebas sin los rigurosos requerimientos de control y documentación.

Acreditación e inspección del laboratorio. La reglamentación de la CLIA '88 otorga las licencias a los laboratorios luego de la inspección realizada por inspectores estatales o por otras organizaciones que hayan sido "acreditadas" por los CMS porque cuentan con los estándares equivalentes, o aún más estrictos. La *Joint Commission for the Accreditation of Healthcare Organizations* (JCAHO) y el *College of American Pathologists* (CAP) son dos organizaciones muy utilizadas por los laboratorios clínicos para la acreditación y la inspección. En todos los casos, el laboratorio debe evaluarse en forma bienal. Los laboratorios que utilizan la JCAHO, se encuentran casi siempre en hospitales y su inspección se realiza al mismo tiempo que la del hospital. En este caso, los inspectores son "profesionales", por lo general con una preparación médica o de enfermería en lugar de tener un entrenamiento específico en laboratorio clínico. El CAP fue la primera organización que evaluó a los laboratorios antes de la participación del estado en este proceso. Al principio, la acreditación era voluntaria y se veía como una forma de educación para la mejora del propio laboratorio. Su filosofía se basa en la evaluación por pares. Cada laboratorio que se inspecciona debe suministrar un equipo para inspeccionar a su vez a otro laboratorio similar. Por lo tanto, los inspectores son profesionales de laboratorio y "voluntarios".

Cada organización que inspecciona a los laboratorios tiene un conjunto de estándares para evaluar, los cuales deben ser enviados a los *Centers for Medicare & Medicaid Services* (CMS) para su aprobación. En algunos estados se debe realizar,

además, la acreditación ante una agencia estatal si el laboratorio tiene relaciones comerciales con ese estado.

Ensayos de aptitud (proficiency). Una parte fundamental de la acreditación continua es la participación en los ensayos de aptitud. Se envían muestras desconocidas a los laboratorios participantes en forma periódica. El laboratorio las evalúa y envía los resultados a la agencia de acreditación, luego de lo cual estos resultados son evaluados y se le otorga una calificación. Una vez más, el CAP inició este protocolo muchos años antes que la CLIA '67. Hoy, las reglas son establecidas por el estado, aunque existe cierta libertad para trabajar dentro de ellas. Los mejores programas proporcionan una experiencia de capacitación como parte de los ejercicios. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ofrece una guía para mejorar el funcionamiento del laboratorio a través de los ensayos de aptitud.⁷⁶ Si no se cuenta con una fuente externa de ensayos de aptitud para un analito, se debe crear en el laboratorio otro método que permita determinar su desempeño. Existen diversos métodos, entre ellos el intercambio de muestras entre laboratorios y la elaboración de un panel de muestras problemas dentro del mismo laboratorio.⁸¹

En la CLIA '88 se codificaron algunas reglas aparentemente obvias: el protocolo para los ensayos de aptitud debe ser lo más parecido posible al que se utiliza para las muestras clínicas (incluida la participación del mismo personal que realiza el ensayo) y el personal del laboratorio no puede comparar los resultados antes de enviar las respuestas; en otras palabras, se toman precauciones para evitar el falseamiento de datos.

Calificación del personal. En la reglamentación de la CLIA '88 para los laboratorios que realizan análisis reglamentados se proporcionan especificaciones detalladas para el personal de todos los niveles del laboratorio.

Manuales de procedimientos. A pesar de que no existen prescripciones rígidas para la preparación de las políticas y los procedimientos escritos, se deben seguir ciertos principios generales.⁸² Se deben establecer y seguir claramente las políticas. Los procedimientos deben incluir los principios del análisis y las referencias, así como las instrucciones para su realización. Los manuales deben estar disponibles para todos los trabajadores que necesiten consultarlos.

Requerimientos de espacio. Las reglamentaciones no especifican en forma detallada los requerimientos de espacio. En cambio, indican que debe ser adecuado para realizar el trabajo en forma satisfactoria. Sin embargo, se describieron guías informales para los laboratorios generales⁷⁵ y para los laboratorios de microbiología¹²⁶ que pueden ser útiles cuando se construye una nueva instalación o para evaluar la adecuación de un laboratorio ya instalado.

Laboratorios de referencia o de derivación. Es un laboratorio poco común que puede satisfacer todos los requerimientos de los médicos. Algunas muestras deben enviarse a un laboratorio especializado para su análisis posterior.⁸⁰ La selección de uno o más laboratorios de referencia no debe hacerse en forma casual. Los candidatos posibles deben evaluarse en conjunto con el personal médico adecuado. El precio no es el único determinante o incluso el factor más importante. La selección debe someterse a revaluaciones regulares.

Confidencialidad del paciente. La *Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996* (HIPAA, Ley de portación y responsabilidad del seguro de salud de 1996) proporciona un resguardo para la confidencialidad de la información y permite que los pacientes tengan acceso a sus registros médicos. Sin embargo, la reglamentación del CLIA '88 para los laboratorios reemplaza los requerimientos del HIPAA. Los resultados del

laboratorio pueden ser informados a individuos autorizados, la persona que requirió el análisis o quien es responsable de la utilización de los resultados. En algunas jurisdicciones pueden aceptar pedidos de análisis directamente de los pacientes.

Gestión de riesgos

La mayoría de los centros de salud están actualmente involucrados en la gestión de riesgos. De hecho, muchos hospitales y clínicas han establecido oficinas formales para esa gestión, completamente financiadas y con personal para ayudar a reducir al mínimo las probabilidades de accidentes y de prácticas de alto riesgo que les puedan causar daño a los empleados y a los pacientes. A pesar de que el mayor ímpetu para esta práctica puede estar dirigido hacia la reducción de los costosos pedidos de compensación de los trabajadores o a los procesos judiciales de mala praxis, en un sentido más amplio, los esfuerzos puestos para la gestión de riesgos están destinados a garantizar un entorno de trabajo seguro y un ambiente en el cual los pacientes puedan recibir la última tecnología médica sin temor a ser dañados.⁹⁷

La persona a cargo de la gestión de riesgos, trabajando en conjunto con el comité de aseguramiento de la calidad, es asignada para investigar los casos en los cuales el tratamiento de la calidad cae por debajo de los umbrales establecidos o las situaciones en las cuales los empleados o los pacientes puedan estar expuestos a un riesgo indebido. Después de revisar los detalles de la situación con los representantes adecuados del departamento involucrado y de recabar los datos necesarios, la persona a cargo de la gestión de riesgos envía un informe conciso al comité del aseguramiento de la calidad conjunto con las recomendaciones para las acciones correctivas. El diálogo entre la persona a cargo de la gestión de riesgos y el director del comité continúa hasta que se concreta un plan de acción apropiado. Luego se controla que el departamento involucrado cumpla con los planes de acción correctiva.

A pesar de que el mayor esfuerzo de la gestión de riesgos está dirigido hacia la atención del paciente, el laboratorio clínico participa en verificar que todas las operaciones del laboratorio cumplan con el total de las prácticas y políticas de la institución. Si los equipos o instrumentos se dañan debido a un incendio o a un accidente eléctrico, si el personal se lastima o si los trabajadores contraen infecciones serias en el laboratorio, el flujo de trabajo se puede desorganizar y, en consecuencia, los informes de laboratorio se retrasan. Por lo tanto, la gestión de riesgos del laboratorio está relacionada principalmente con la implementación y el control de las prácticas seguras de laboratorio, dirigida más hacia los empleados que a los pacientes. La responsabilidad de un daño recae claramente sobre el empleador, aun cuando la negligencia que condujo a ese daño sea responsabilidad del trabajador.⁸⁰ Por esta razón, las personas que se ocupan de la gestión de riesgos insisten en llevar a cabo cursos de educación orientados hacia la seguridad y en revisar que todas las reglas y reglamentaciones pertinentes a la seguridad del laboratorio sean implementadas y seguidas.

El aspecto financiero es otra área importante a la cual las personas que se ocupan de la gestión de riesgos le prestan cada vez más atención. Existen reglamentaciones estrictas para los conflictos de interés, las facturaciones fraudulentas y los incentivos ilegales para los negocios (como las comisiones clandestinas). La facturación de los programas estatales (el seguro estatal de enfermedad, Medicare y el programa de asistencia estatal para individuos sin recursos, Medicaid) deben utilizar un conjunto de códigos de pruebas, denominados Códigos de Terminología

de Procedimientos Actuales (*Current Procedural Terminology*, CPT). Muchas otras aseguradoras también utilizan estos códigos. La *American Medical Association* (AMA), que ha sido designada por el Estado para esta tarea, revisa y publica anualmente estos códigos. Cualquier persona u organización puede participar en el ingreso de datos para la construcción de los códigos, pero el comité operativo de la AMA se forma a partir de sus sociedades constitutivas. En el campo del laboratorio médico éstos son del CAP y de la *American Society for Clinical Pathology* (ASCP).

Seguridad del laboratorio

A pesar de que la responsabilidad legal de proporcionar un ambiente de trabajo seguro es de los directores de los hospitales y laboratorios, los empleadores deben también compartir la responsabilidad de adherirse a los estándares de seguridad delineados en el Manual de Seguridad del Laboratorio, de avisar al supervisor acerca de cualquier peligro que pueda surgir durante las actividades laborales y buscar atención médica inmediata ante cualquier accidente potencialmente relacionado con el trabajo.⁵⁰

Se debe designar a una persona en el laboratorio como responsable de la seguridad, cuyos deberes son verificar que los estándares de seguridad y las guías se encuentren escritas y publicadas, informar a los empleados acerca de esos estándares a través de cursos programados en forma regular sobre seguridad del laboratorio y de reuniones informativas del servicio, e implementar un sistema en el lugar para controlar el cumplimiento. El responsable de seguridad trabajará de manera estrecha con la persona a cargo de la gestión de riesgos para reconciliar y corregir cualquier brecha en las conductas o irregularidad que se descubra.

NORMAS Y REGLAMENTACIONES GENERALES DE SEGURIDAD

Se les advierte a los trabajadores del laboratorio que no se expongan a riesgos innecesarios. El descuido, la negligencia y las prácticas inseguras pueden dar como resultado serios accidentes, no sólo para el individuo sino también para otros compañeros de trabajo y para los pacientes. A continuación se detallan consideraciones generales que harán que el trabajo en el laboratorio de microbiología presente menor riesgo.⁷³ Cada director de laboratorio es responsable de asegurar que las políticas y los procedimientos del laboratorio estén de acuerdo con los requerimientos legales (federal, estatal y local) y los estándares de la buena práctica del laboratorio.

1. Cada empleado deberá ser instruido acerca de la ubicación y el manejo de todo el equipamiento y las instalaciones de seguridad, como mantas para incendio, extintores, duchas y lavabo para lavado ocular. Cada uno de éstos debe ser fácilmente accesible en el laboratorio.
2. El equipo de protección personal (guantes de cirugía, bata, etc.) debe usarse cuando corresponda. Las batas deben usarse (con los botones abrochados) en todo momento mientras se está en el laboratorio y deben quitarse cuando se lo abandona. Para algunas manipulaciones que pudieran generar aerosoles infecciosos con patógenos importantes, como *Mycobacterium tuberculosis*, deben utilizarse máscaras personales adaptables.
3. Los hábitos y el aseo personal deben estar pautados de antemano. El cabello largo debe estar recogido para que no obstaculice el trabajo con el equipamiento o los reactivos. La aplicación de cosméticos en el área de trabajo está prohibi-

da. Las sandalias y el calzado del tipo abierto no ofrecen la protección adecuada al pie y por lo tanto, no son aceptables. Está prohibido fumar en el laboratorio. Los dedos, los lápices y otros implementos no deben introducirse en la boca. No deben permitirse bromas ni payasadas.

4. Las lentes de contacto, en especial las de tipo blando, absorben ciertos solventes y pueden ser un peligro si ocurren salpicaduras o derrames. Se aconseja a los empleados que no las utilicen en el laboratorio o que usen anteojos de seguridad cuando trabajan con materiales cáusticos o infecciosos.
5. No se permite comer ni guardar alimentos o bebidas en el laboratorio o en frigoríficos que se utilizan para muestras o materiales de laboratorio. Se debe designar específicamente un frigorífico para guardar comida y bebidas.
6. Está absolutamente prohibido pipetear con la boca cualquier material. Se cuenta con numerosos sistemas de ayuda para hacerlo.
7. El personal del laboratorio que tenga infecciones en la piel, infección respiratoria aguda u otras enfermedades contagiosas debe evitar el contacto con los pacientes.
8. Es importante que los trabajadores del laboratorio conozcan las características de todos los materiales en uso y, por lo tanto, puedan tomar las precauciones adecuadas durante su utilización y su descarte. Se requiere que los fabricantes proporcionen estos detalles en las hojas de información sobre la seguridad del material. Estas hojas deben estar accesibles para todos los miembros del laboratorio.
9. Se deben colocar las etiquetas y los signos apropiados en todas las muestras o instrumentos y en todas las áreas del laboratorio donde sea necesario para mantener un ambiente de trabajo seguro.
10. En el cuadro 1-19 se resumen los tipos y los niveles de descontaminación. Es importante que coincida el tipo de desinfección o esterilización con el peligro biológico.^{10,19,119}

PRECAUCIONES HABITUALES DE SEGURIDAD

Centrifugación

1. Antes de centrifugar algo, verifique que los tubos, el frasco ampolla o las botellas no se rompan. Reemplace en forma periódica los cojinetes de goma que se encuentran en el fondo de las camisas portatubos y elimine los vidrios rotos que puedan haberse acumulado.
2. Asegúrese de que la centrífuga se encuentre correctamente balanceada antes de usarla. Verifique los anillos portacamisas y las camisas portatubos para estar seguro de que los pesos coinciden.
3. Espere que la centrífuga se detenga por completo antes de abrir la tapa para retirar las muestras. Utilice sólo el dispositivo de freno para lograr que la rotación se detenga en forma más rápida y completa.
4. Si se rompe un tubo en la centrífuga, primero apague el instrumento, espere al menos 20 minutos antes de abrir la tapa y luego de colocarse una máscara y guantes, limpie completamente y desinfecte el interior de la centrífuga.
5. Cada centrífuga debe limpiarse totalmente con el desinfectante adecuado al final del día, como parte del programa de mantenimiento de rutina. Se debe realizar el mantenimiento preventivo de todas las partes de la centrífuga bajo un cronograma regular apropiado.
6. Si se centrifuga material potencialmente infeccioso, la muestra debe colocarse en un contenedor cerrado (tubos de centrífuga con tapa).

Cuadro 1-19 Tipos de descontaminación, desinfección y esterilización*

NIVEL	CATEGORÍA EPA/FDA	CATEGORÍA CDC	EJEMPLO	TIPO DE ORGANISMOS	EJEMPLOS
1	Desinfectante hospitalario	Desinfectante de bajo nivel	Compuestos de amonio cuaternario	Bacterias vegetativas	Especies de <i>Staphylococcus</i>
				Virus envueltos o de tamaño mediano	Especies de <i>Pseudomonas</i> Virus de la inmunodeficiencia humana Virus del herpes simple Virus de las hepatitis B y C Coronavirus
2	Desinfectante hospitalario con actividad tuberculocida	Desinfectante de nivel intermedio	Compuestos de amonio cuaternario con alcohol; fenoles; iodóforos; productos que contienen cloro	Hongos	Especies de <i>Aspergillus</i> Especies de <i>Candida</i>
				Virus no envueltos o de tamaño pequeño	Enterovirus Rinovirus
				Micobacterias	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
3	Esterilizante/ desinfectante de alto nivel	Desinfectante de alto nivel	Glutaraldehído; peróxido de hidrógeno	Esporas bacterianas	Especies de <i>Bacillus</i>
4	Esterilización	Esterilización	Óxido de etileno; autoclave	Todos los agentes	

* Los agentes a cada nivel son eficaces también contra los organismos que matan a los agentes de un nivel inferior. Los primeros requieren una consideración aparte; consulte la referencia.¹⁰ Adaptado de las referencias ^{11,12}.

Agujas y material de vidrio

1. Deseche todo el material de vidrio astillado y roto en contenedores adecuados.
2. Levante los vidrios rotos con un cepillo y una pala; no utilice las manos.
3. Los artículos de vidrio no deben desecharse en el lavabo o sueltos en un cubo de basura donde se arrojan papeles. Los vidrios pueden producir cortes en los dedos y las manos de las personas que los retiran. Deben colocarse en un contenedor diseñado para objetos cortantes.
4. Las agujas y las lancetas (punzantes) utilizadas deben colocarse en los contenedores apropiados para agujas usadas para poder descartarlas en forma segura. Estos contenedores de objetos punzantes se deben controlar y cambiar periódicamente para evitar su llenado excesivo.
5. Evite, en lo posible, sacar las agujas de las jeringas o cambiar las agujas de las jeringas. La práctica de cambiar la aguja antes de inocular la sangre obtenida por venopunción dentro de los frascos de hemocultivo ha sido abandonada en la mayoría de los hospitales.

Seguridad eléctrica

1. Todo el personal debe conocer la ubicación de los interruptores maestros y de los tableros de interrupción de los circuitos. No intente reparar ningún instrumento mientras esté enchufado.
2. No se deben utilizar los enchufes o cables que estén rotos, deshilachados o gastados.

3. Los tomacorrientes no deben estar sobrecargados. Nunca utilice enchufes múltiples.
4. Todo cable o equipo eléctrico que se enchufe debe tener cable y enchufe con descarga a tierra. Todas las descargas eléctricas, aun las que causan hormigueos pequeños, deben investigarse de inmediato.
5. Los alargues deben utilizarse sólo si cumplen con todas las políticas y los procedimientos del hospital.

Precauciones en el corredor

1. Abra las puertas hacia el corredor con precaución. Debe tenerse cuidado con las puertas vaivén. Si hay una ventana en la puerta, mire hacia afuera para estar seguro de que el corredor está libre antes de abrir la puerta.
2. Mantenga la derecha al acercarse a la intersección del corredor y al utilizar las escaleras. Camine, nunca corra en los vestíbulos, habitaciones y los huecos de las escaleras. Los espejos ubicados de manera apropiada proporcionan imágenes del posible tráfico en los corredores que se cruzan.
3. Tenga cuidado con la eventual presencia de objetos peligrosos en el vestíbulo, como camas, carros o mesas, y con los objetos que se encuentran en el suelo, como sujetapapeles, cables eléctricos, baldosas flojas y líquidos derramados. Se debe utilizar sólo un lado del corredor para el almacenamiento temporal de un equipo móvil.

Levantamiento de objetos

1. Las lesiones de la espalda se encuentran entre las causas más frecuentes de enfermedad debilitante entre el personal. Evi-

- le levantar objetos pesados cuando sea posible. Siempre consiga ayuda.
- 2. Si debe levantar objetos sin la ayuda de otra persona, tome las siguientes precauciones:
 - a. Estar bien afirmado. Mantener una distancia entre los pies de alrededor de 25 cm.
 - b. Doblar las rodillas para tomar el objeto.
 - c. Mantener el objeto cerca del cuerpo y sostenerlo en forma firme.
 - d. Mantener los brazos y la espalda tan estirados como sea posible y levantar el objeto hacia arriba estirando las piernas.

Manipulación de muestras y derrames

1. Las muestras deben recolectarse en recipientes seguros con un tipo de cierre adecuado para evitar los derrames y las filtraciones. Se deben tratar todas las muestras como si fueran peligrosas.
2. Se deben cubrir las cortaduras en las manos con vendajes adhesivos adecuados. Utilice guantes desechables si la actividad involucra el contacto con sangre, suero, plasma u otros líquidos o tejidos.
3. Si un contenedor presenta evidencia de rotura, filtración o mancha, colóquese guantes y transfiera la mayor cantidad de muestra posible a un segundo recipiente estéril. También transcriba cualquier información pertinente del viejo recipiente al nuevo.
4. Las prescripciones que están contaminadas con sangre deben rechazarse. Manipúlelas sólo con guantes si su procesamiento es necesario en una emergencia. Notifique al solicitante que este tipo de materiales contaminados representan un peligro para la salud.
5. Lávese exhaustivamente las manos con agua y jabón varias veces por día, sobre todo después de manipular muestras antes de salir para tomar alguna colación.
6. Los derrames se deben manejar según la naturaleza del material involucrado.

Manipulación de desechos y materiales peligrosos

1. Deje aparte en el laboratorio ciertos lavabos para el descarte de muestras de sangre y orina. No se debe permitir el lavado de las manos en estos lavabos.
2. Las bolsas para materiales biológicos peligrosos (así rotuladas) deben utilizarse para descartar todas las muestras potencialmente contaminadas, tubos con sangre, recipientes de muestras, pipetas, puntas de pipetas, recipientes de reacción, tapones y otro material de este tipo. Se debe dejar suficiente espacio en la parte superior de modo tal que la bolsa pueda cerrarse fácilmente y asegurarla con una banda elástica. Es una buena práctica la utilización de doble bolsa para los desechos peligrosos.
3. Descarte el material de vidrio y punzante en los recipientes de pared rígida apropiados. Cuando estos recipientes se llenan, deben sellarse con cinta y colocarse en las cajas para desechos rotuladas para su descarte correcto.
4. Retire las bolsas para materiales biológicos peligrosos llenas a las áreas de desechos designadas, en forma tan frecuente como sea necesario durante el día para evitar su acumulación.
5. Sumerja el material de vidrio no desechable contaminado en soluciones desinfectantes. Enjuague con abundante agua y póngalo en el autoclave antes de utilizarlo nuevamente.

6. Al final del día o después de un derrame se deben desinfectar las superficies de trabajo con un producto eficaz contra los agentes que pueden contaminar el sitio. Todo equipamiento que se retire del laboratorio debe primero ser descontaminado. Además, las cabinas de flujo laminar de seguridad biológica deben descontaminarse (debe hacerlo preferentemente un técnico acreditado en el cuidado de este equipamiento) antes de realizar el mantenimiento o de cambiar los filtros.

AGENTES BIOLÓGICOS

Clasificación de los agentes biológicos. Los CDC y el *National Institute of Health* clasificaron los organismos infecciosos dentro de grupos de riesgo,⁹⁹ que se resumen en el cuadro 1-20. El documento se puede obtener en la oficina de impresiones del gobierno o en el sitio de Internet: (<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm>).

Contención física de los peligros biológicos. Las barreras físicas para las infecciones en el laboratorio pueden clasificarse en personales o institucionales. Las barreras personales son la higiene personal (p. ej., instalaciones separadas para los alimentos o para el lavado de manos) y el equipo de protección (p. ej., protectores contra salpicaduras, gafas, guantes, camisolines y máscaras). Las barreras institucionales son estructurales (p. ej., instalaciones separadas, puertas y cerraduras) y tecnológicas (p. ej., manipulación y filtración del aire). Las cabinas de seguridad biológica (CSB) son un componente crítico en la protección de los trabajadores. Es importante tener en cuenta que las CSB y las campanas para el manejo de los productos químicos son diferentes. Es posible construir una CSB que pueda utilizarse como campana para el manejo de los productos químicos, pero sólo ciertos tipos de CSB se aplican a este uso. Las campanas para manejo de productos químicos no deben utilizarse para la manipulación de agentes infecciosos.

En el cuadro 1-21 se resume la clasificación de las CSB y se las esquematiza en las figuras 1-21 a 1-25. La mayoría de los laboratorios clínicos utilizan CSB de tipo II para procesar las muestras y trabajar con los aislamientos, en especial los que presentan peligro de generación de aerosoles. Hoy es poco común que se utilicen las CSB de tipo I, y las de tipo III no suelen utilizarse en los laboratorios de diagnóstico. En las cabinas de clase II o III el aire se dirige, de un modo laminar, a través de la superficie de trabajo desde la parte superior de la cabina y reduce la contaminación de las muestras con agentes que forman aerosoles. Estos dispositivos se denominan cabinas de flujo laminar de seguridad biológica. El flujo laminar hacia abajo también protege el área de trabajo del aire no filtrado que es empujado a través de la apertura frontal en las cabinas de clase II; el aire que ingresa frontalmente es dirigido por el flujo laminar hacia el sumidero ubicado debajo del área de trabajo donde éste se filtra antes de confluir con el flujo laminar que se desplaza hacia abajo.

Un técnico acreditado debe validar la velocidad del flujo del aire en las CSB de clases I y II al menos una vez por año o cuando se realiza algún trabajo de reparación. Además, la cabina debe ser descontaminada por un técnico acreditado antes de efectuar cualquier manipulación que comprometa un área contaminada (p. ej., cambio de los filtros, reemplazo o reparación de los motores o traslado de la cabina).

Con respecto a los riesgos habituales de infecciones en los laboratorios de diagnóstico, y a pesar de que la mayoría de los agentes que se encuentran en un laboratorio clínico pueden causar enfermedades a los trabajadores del laboratorio, sólo un

Cuadro 1-20 Clasificación de los agentes biológicos según el riesgo*

NIVEL DE BIOSEGURIDAD (BSL)	CLASES DE AGENTES	EJEMPLOS DE LOS AGENTES	PRÁCTICAS	EQUIPO DE SEGURIDAD (BARRERAS PRIMARIAS)	INSTALACIONES (BARRERAS SECUNDARIAS)
1	No se sabe que cause enfermedad regularmente en adultos sanos		Prácticas microbiológicas estándares	No se requieren	Se requiere una mesada abierta con lavabo superior
2	Se asocia con enfermedades en seres humanos Peligro = lesión percutánea, ingestión o exposición de mucosas	<i>Enterobacteriaceae</i> Especies de <i>Candida</i> Complejo <i>Mycobacterium avium</i> Virus del herpes simple	BSL-1 más: • Acceso limitado • Signos de advertencia de peligro biológico • Precauciones con objetos punzocortantes • Manual de bioseguridad que defina la descontaminación de los residuos y las prácticas de vigilancia médica	CSB de clase I o II u otros dispositivos de contención física utilizados para todas las manipulaciones de los agentes que causan salpicaduras o aerosoles de materiales infecciosos EPP: guardapolvos, guantes, y protección de la cara cuando se lo requiera	BSL-1 más: • Disponibilidad de un autoclave
3	Agentes endógenos o exóticos con potencial transmisión en aerosol La enfermedad puede tener consecuencias serias o letales	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Francisella tularensis</i> Virus del Nilo occidental	Prácticas BSL-2 más: • Acceso controlado • Descontaminación de todos los residuos • Descontaminación de la indumentaria de laboratorio antes de ir a la lavandería • Muestra de suero inicial	CSB de clase I o II u otros dispositivos de contención física utilizados para todas las manipulaciones de los agentes que causan salpicaduras o aerosoles de materiales infecciosos EPP: guardapolvos, guantes, y protección de la cara cuando se lo requiera	BSL-2 más: • Separación física de los corredores de acceso • Puertas de acceso dobles que se cierran solas • El aire expelido no se recircula • Flujo de aire negativo dentro del laboratorio
4	Agentes peligrosos o exóticos que presentan alto riesgo de enfermedades que ponen en riesgo la vida, infecciones de laboratorio que se transmiten por aerosol O agentes relacionados con un riesgo de transmisión desconocida	Arenavirus que producen fiebre hemorrágica (p. ej. Lassa, Junín, Machupo) Filovirus que producen fiebre hemorrágica (p. ej. Marburg, Ébola)	Prácticas BSL-3 más: • Cambio de indumentaria al ingresar • Duchía al salir • Todos los materiales se descontaminan cuando salen del lugar	Todos los procedimientos se llevan a cabo en una CSB de clase III o en CSB de clase I o II combinado con un taje personal de presión positiva, con abastecimiento de aire que cubre el cuerpo por completo	BSL-3 más: • Edificio separado o zona aislada • Emplea sistemas de abastecimiento y expulsión de aire y de vacío y descontaminación • Otros requerimientos enumerados en la referencia ⁶⁶

BSL: nivel de bioseguridad; CSB: cabina de seguridad biológica; EPP: equipo de protección personal.

* Nivel de seguridad de muchos agentes cuando se realizan manipulaciones en las cuales sería razonable esperar que se generen aerosoles o cuando se emplean grandes volúmenes de materiales. Para algunos agentes de nivel 2 se indica un nivel superior cuando se manipulan cultivos que se sabe que contienen al agente. Se utiliza una clasificación separada para los agentes que infectan, en forma natural o experimental, a animales.

Adaptado de la referencia⁶⁶.

número relativamente pequeño de ellos las producen. Miller y cols.⁶⁶ describieron una experiencia de 25 años con infecciones humanas adquiridas en el laboratorio en el *National Animal Disease Center* (NADC) en Ames, Iowa, una institución donde se realizan investigaciones sobre enfermedades comunes del ganado y de las aves de corral. El nivel de riesgo para los trabajadores es probablemente algo mayor que el promedio de los laboratorios clínicos. Entre 1960 y 1985 se informaron al NADC 128 exposiciones en laboratorios a organismos zoonóticos; esto derivó en 34 infecciones asociadas con el laboratorio. La brucelosis representó el 47% de los casos; la leptospi-

rosis, el 27%, y las micobacteriosis, un 9%. Las especies de *Salmonella* y de *Chlamydia*s, el virus de la enfermedad de Newcastle (un patógeno no humano) y las especies de *Trichophyton* representaron las otras infecciones adquiridas informadas al NADC.

Las 10 infecciones adquiridas con mayor frecuencia en el laboratorio que surgen a partir de estudios acumulados son: 1) brucelosis, 2) fiebre-Q, 3) fiebre tifoidea, 4) tularemia, 5) tuberculosis, 6) tifus, 7) hepatitis infecciosa, 8) encefalitis equina venezolana, 9) coccidioidomicosis y 10) psitacosis.^{90,91,92,118} Algunas de estas infecciones son difíciles de evi-

Cuadro 1-21 Comparación de las cabinas de seguridad biológica					
TIPO	VELOCIDAD EN LA APERTURA FRONTAL	PATRÓN DEL FLUJO DE AIRE	RADIONÚCLIDOS/ QUÍMICOS TÓXICOS	NIVELES DE BIOSEGURIDAD	PROTECCIÓN DE PRODUCTOS (MUESTRAS)
Clase I Frente abierto	24 (75)	Entrada frontal; parte posterior y arriba a través de filtro de alta eficiencia (HEPA) (fig. 1-21)	No	2, 3	No
Clase II Tipo A	24 (75)	70% de recirculación a través de filtro HEPA; expelido a través de filtro HEPA (fig. 1-22)	No	2, 3	Sí
Clase II Tipo B1	330 (100)	30% de recirculación a través de filtro HEPA; expelido por medio de filtro HEPA y conductos rígidos (fig. 1-23)	Sí (bajos niveles/volatilidad)	2, 3	Sí
Clase II Tipo B2	330 (100)	Sin recirculación; expelido total por medio de filtro HEPA y conductos rígidos (fig. 1-24)	Sí	2, 3	Sí
Clase II Tipo B3	330 (100)	El mismo que IIA, pero el aire expelido se elimina a través de un espacio de presión negativa y se lleva por conductos al exterior	Sí	2, 3	Sí
Clase III	ND	Provisión de conexiones de entrada y expelido de aire a través de dos filtros HEPA (fig. 1-25)	Sí	3, 4	Sí
Tomado de la referencia ¹⁰ .					

tar, aunque el objetivo debe ser siempre cero infecciones. Sin embargo, en algunas circunstancias no es difícil visualizar los medios para evitar las infecciones, al menos en retrospectiva. Por ejemplo, un estudiante de auxiliar médico contrajo fiebre tifoidea con complicaciones luego de trabajar con *Salmonella typhi* como un microorganismo desconocido.⁴⁴ Aún peor, el 22% de los auxiliares de laboratorio presentaron gastroenteritis por *Shigella sonnei*. La tipificación de los aislamientos reveló que todas las cepas eran idénticas a una que se le había dado a un estudiante como desconocida.⁶⁴ Algunos agentes que no debieran encontrarse en un laboratorio clínico a veces pueden causar infecciones en los investigadores^{22,43,4} cuando se realizan manipulaciones que producen aerosoles sin la contención adecuada.

PRECAUCIONES UNIVERSALES

Irónicamente, los trabajadores del laboratorio tiene un riesgo mucho menor de infectarse que sus colegas médicos. Numerosas razones explican este fenómeno. Los pacientes estornudan y tosen; las placas de cultivo, no. A menos que en el laboratorio se realicen procedimientos que generen grandes cantidades de aerosoles, el riesgo para los trabajadores es bastante bajo. Los médicos y los enfermeros utilizan con mayor frecuencia objetos cortopunzantes, como instrumentos y agujas. En la medicina moderna los mayores riesgos infecciosos son los patógenos transmitidos por la sangre. Una vez más, es irónico que los microbiólogos tengan menor riesgo que sus colegas de otras áreas del laboratorio, como química y hematología, donde diariamente se procesan numerosas muestras de sangre. Las infecciones de laboratorio más importantes son

las producidas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C. En la mayoría de los hospitales, el virus de la hepatitis C es el más prevalente, debido a que se cuenta con una vacuna eficaz contra el virus de la hepatitis B y a que la incidencia de HIV en la población general es baja. Es importante que se cuente con una vacuna eficaz contra el virus de la hepatitis B, porque el riesgo de un trabajador no inmunizado de contraer esta infección es mucho mayor que la de adquirir una infección por el virus de la hepatitis C o el HIV.

Los CDC,¹⁴⁻¹⁷ el CLSI¹⁹ y los trabajadores de los laboratorios⁵ han establecido recomendaciones para reducir al mínimo las infecciones transmitidas por vía sanguínea.

En el cuadro 1-22 se resumen los riesgos de contraer los principales patógenos transmitidos por esa vía.¹⁷

Como casi nunca es posible predecir quiénes son los individuos que pueden ser fuente de riesgo, surgió el concepto de **precauciones universales**. Esto significa que cada muestra se considera de riesgo. La especificación de que algunas muestras son riesgosas incrementa la posibilidad de que se genere una falsa sensación de seguridad.

Los CDC y el OSHA han establecido las siguientes precauciones universales:¹²

- 1. La sangre y los líquidos corporales de todos los pacientes deben ser manipulados como materiales infecciosos. Todos los pacientes deben presumirse como infectados por HIV y por otros patógenos de transmisión sanguínea.
- 2. Todas las muestras de sangre y los líquidos corporales deben colocarse en un recipiente adecuado, con una tapa segura para evitar el derrame durante el transporte.

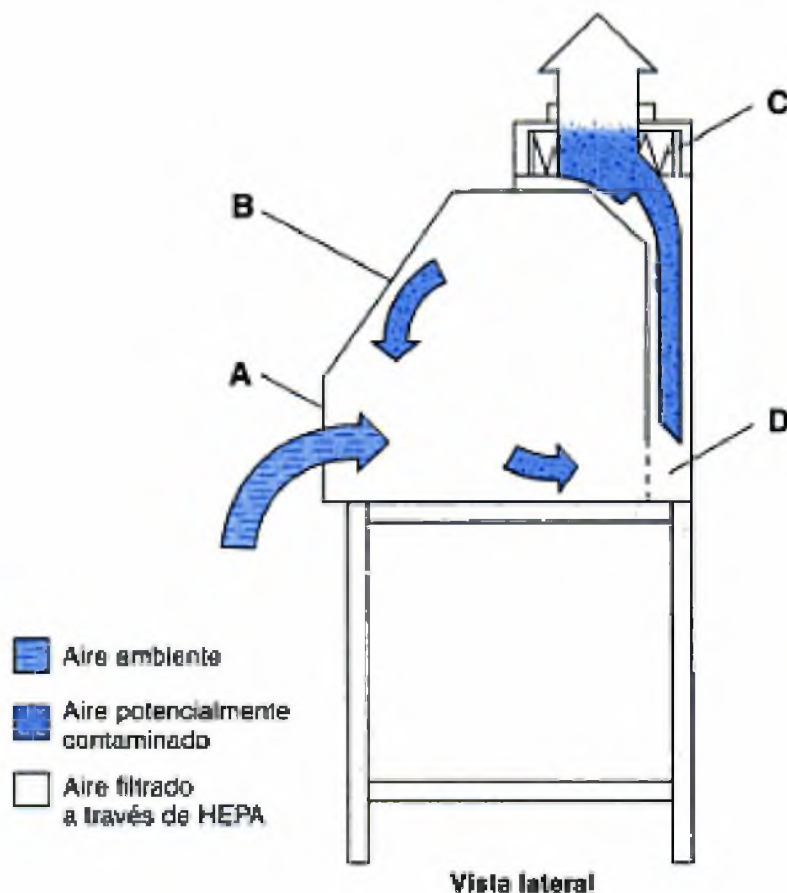


Figura 1-21 Diseño de una cabina de seguridad biológica de clase I. Estas cabinas de presión negativa toman aire del ambiente hacia la cabina a una velocidad de 24 m/min (75 pies lineales por minuto) y eliminan el aire a través de un filtro HEPA hacia el ambiente o hacia el exterior por medio de un conducto. No protege la muestra de la contaminación con el material presente en el aire ambiente. Puede utilizarse para sustancias químicas tóxicas o radiológicas sólo si ventilan hacia el exterior. Adaptada de la referencia⁷⁰.

3. Todas las personas que procesan muestras de sangre y líquidos corporales (p. ej., quienes quitan las tapas de los tubos con vacío) deben utilizar guantes y protección facial (máscara, antiparras o gafas), si se espera que la sangre o los líquidos corporales salpiquen.
4. Los trabajadores deben cambiarse los guantes y lavarse las manos cuando concluyen con el procesamiento de las muestras.
5. Los trabajadores nunca deben pipetear con la boca; deben utilizar dispositivos mecánicos.
6. La utilización de agujas y jeringas debe limitarse a las situaciones en las cuales no existe otra alternativa.
7. Las superficies de trabajo del laboratorio deben descontaminarse con las sustancias químicas germicidas apropiadas luego de un derrame de sangre u otros líquidos corporales y cuando se ha concluido con las tareas.
8. Los materiales de trabajo que se utilizan en las pruebas de laboratorio deben descontaminarse antes de ser reutilizados o colocarse en bolsas para ser desechados de acuerdo con las políticas institucionales.
9. Todas las personas deben lavarse las manos al finalizar las actividades del laboratorio y quitarse la vestimenta de protección antes de abandonar el lugar.

Las recomendaciones para el tratamiento de las exposiciones varían según el agente; los CDC las revisan regularmente y las

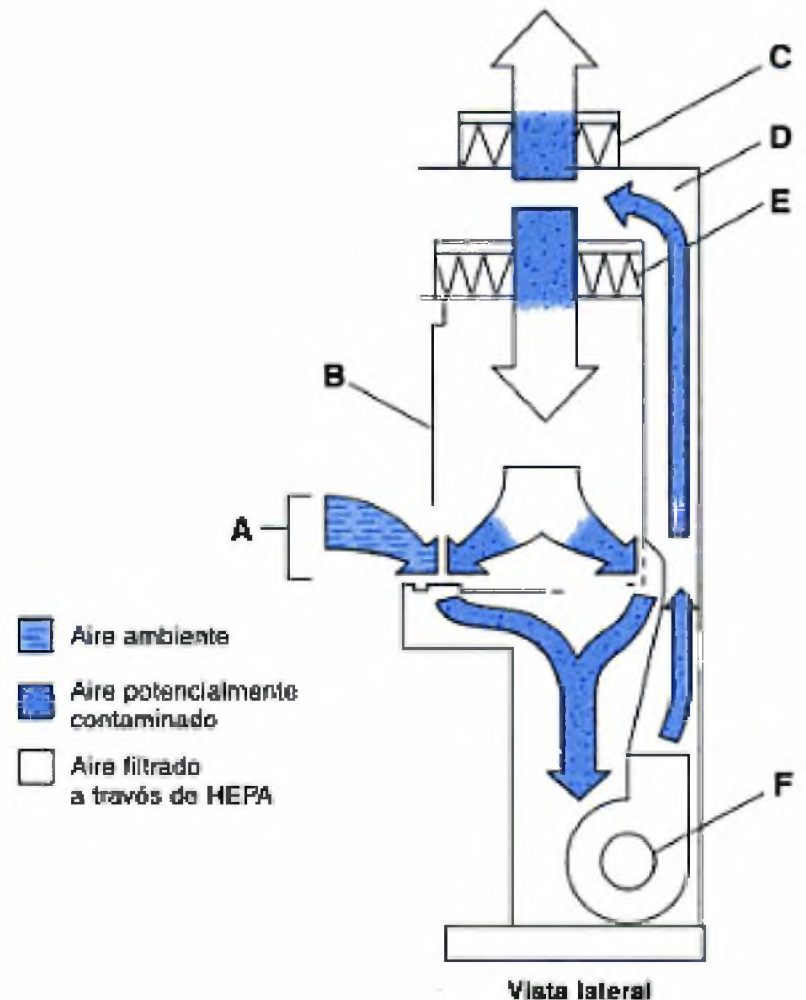


Figura 1-22 Diseño de una cabina de seguridad biológica de clase II A. Estas cabinas toman aire del ambiente hacia la cabina a través de su abertura frontal (A), usualmente a una velocidad de 24 m/min (75 pies lineales por minuto). Luego éste circula por un compartimento (D) y a través de un filtro HEPA, una parte del aire, por lo general el 70%, circula por el lugar de trabajo; el aire remanente se elimina a través de un filtro HEPA (C) hacia el ambiente. Si el aire remanente se elimina a través de un espacio de presión negativa hacia el exterior del edificio, la cabina se clasifica como de clase II B3. El trabajo puede verse a través de un visor de vidrio (B). Adaptada de la referencia⁷⁰.

modifican si es necesario. En general, el paciente del cual se obtuvo la muestra debe ser estudiado para determinar si existe algún riesgo, mientras que al trabajador accidentado se lo debe estudiar a lo largo del tiempo para establecer si se infectó. En ciertas situaciones es apropiada una inmunización posterior a la exposición o quimioterapia antiviral profiláctica. Cabe destacar que se debe prestar principal atención a la prevención, de modo que el problema de un accidente nunca se presente. La prevención puede realizarse por medio de la inmunización del personal en riesgo y de la reducción de la exposición a los elementos cortopunzantes (agujas, hojas de bisturí, vidrios rotos, etc.), que son las fuentes más comunes de accidentes.

Limpieza de los derrames de materiales infecciosos. El protocolo recomendado para la limpieza de los materiales infecciosos es:⁷⁰

1. Utilizar guantes (preferentemente guantes gruesos, resistentes a las pinchaduras), camisolines y máscaras.
2. Si existen fragmentos de vidrio u otros objetos, deben eliminarse sin tocarlos en forma directa.
3. Utilizar protectores de calzado impermeables al agua si el derrame es grande.

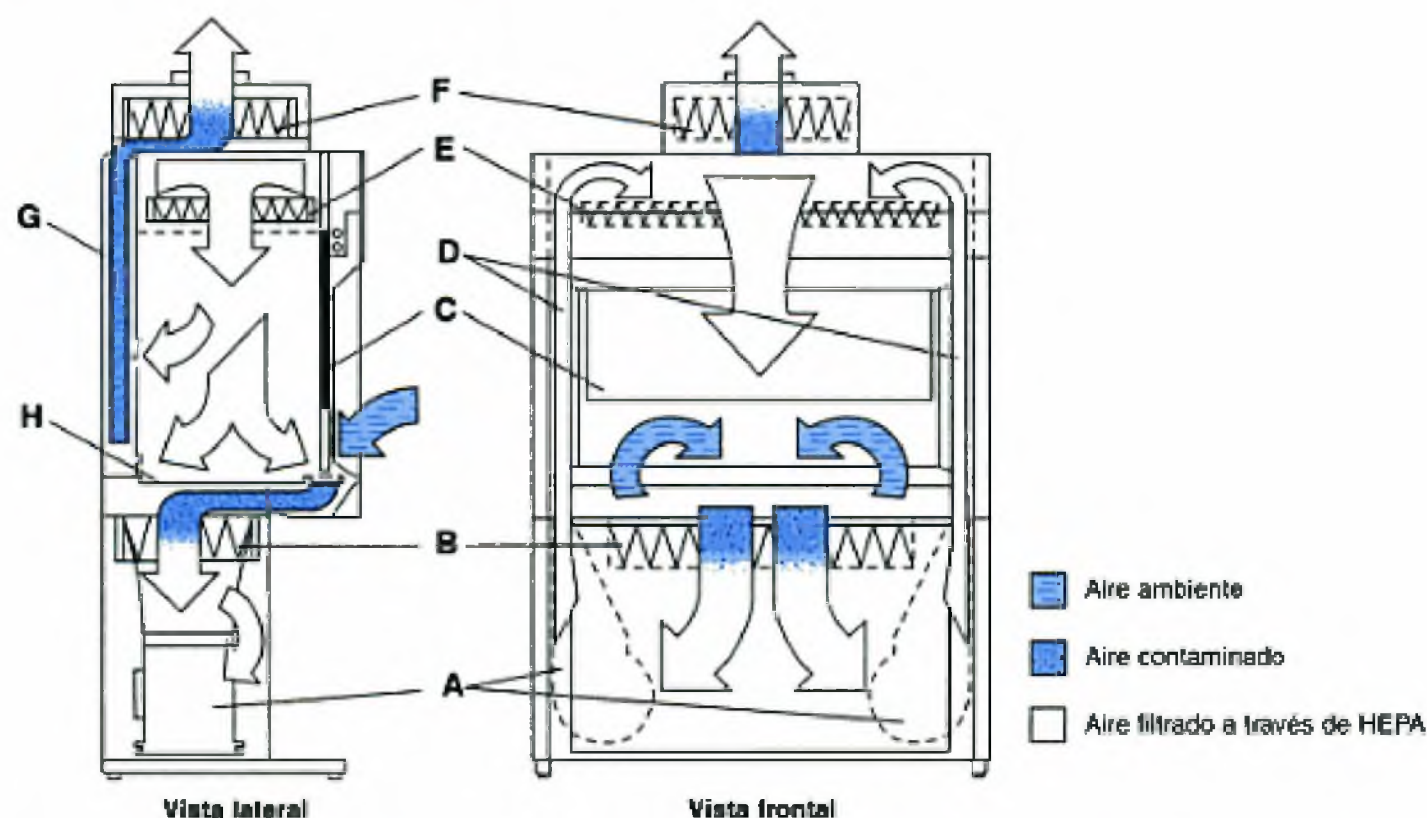


Figura 1-23 Diseño de una cabina de seguridad biológica de clase II B1. Estas cabinas toman aire del ambiente hacia la cabina a través de su abertura frontal a una velocidad de 330 m/min (1000 pies lineales por minuto). Luego circula (por lo general el 30%) a través de un sumidero (A) y por el compartimento (D), pasando a través de los filtros HEPA (B y E) antes de ser expelido (G), a través de un filtro HEPA (F), dentro de los conductos con presión negativa hacia el exterior. Debido a la mínima recirculación se pueden utilizar cantidades limitadas de sustancias químicas de bajo nivel y agentes biológicos. El trabajo puede verse a través de un visor de vidrio (C). Adaptada de la referencia¹⁰.

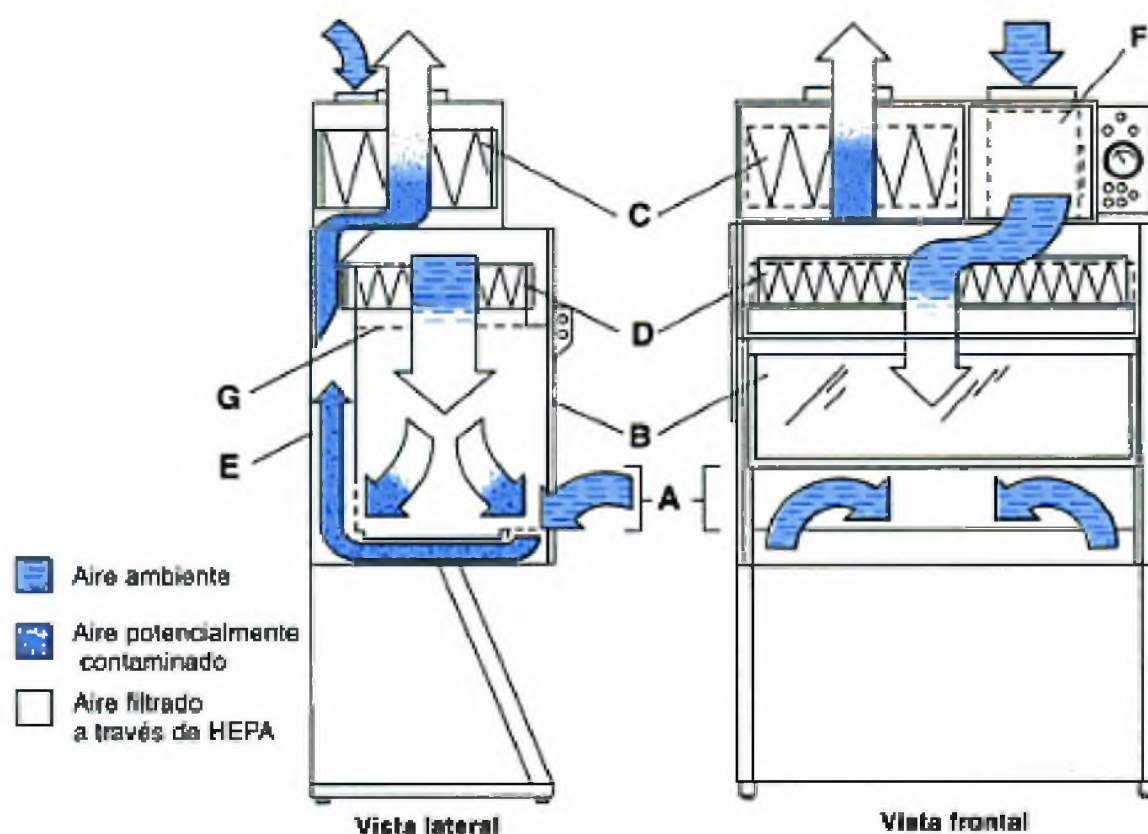


Figura 1-24 Diseño de una cabina de seguridad biológica de clase II B2. Estas cabinas toman aire del ambiente hacia la cabina a través de su abertura frontal (A) y el aire es llevado al compartimento (E) de la cabina antes de eliminarlo al exterior a través de un filtro HEPA (C) y un sistema de conductos con presión negativa. En forma simultánea el aire del ambiente ingresa en la cabina a través de una segunda entrada (F) y un filtro HEPA (D), luego de lo cual el aire pasa hacia abajo a través del área de trabajo y luego se junta con la corriente del flujo de salida en el compartimento (E) de la cabina. El trabajo puede verse a través de un visor de vidrio (B). Se pueden utilizar sustancias químicas tóxicas en esta cabina en la que no recircula el aire. Adaptada de la referencia¹⁰.

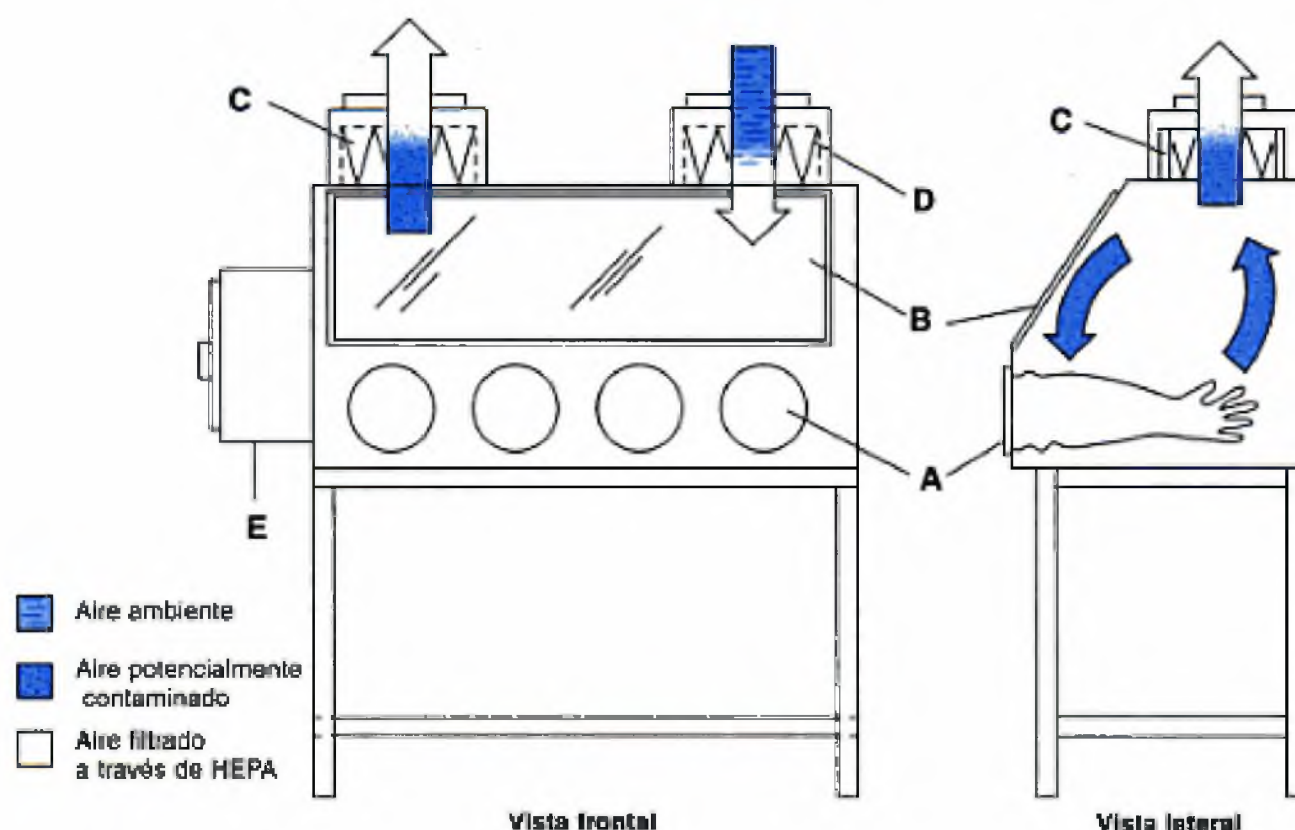


Figura 1-25 Diseño de una cabina de seguridad biológica de clase III. Esta cabina funciona como una caja con guantes totalmente cerrada con recirculación de aire. Los agentes peligrosos están contenidos dentro de la caja, de manera que el operador no está expuesto. El mismo efecto se puede lograr si se utiliza una cabina de clase II junto con un traje de seguridad biológica conectado a una fuente de aire para el operador, quien virtualmente queda dentro de la cabina. El aire ingresa a través de una entrada y un filtro HEPA (D) antes de ser expelido a través de un filtro HEPA dentro de un sistema de conductos de presión negativa y al ambiente exterior. El operador manipula las muestras dentro de la caja a través de un enclavamiento (E). La desventaja de este diseño es la dificultad de realizar manipulaciones finas con guantes gruesos de goma, pero los costosos sistemas de "traje especial" para la protección del operador no son esenciales. Adaptada de la referencia⁹.

- Cubrir el derrame con material absorbente y agregar un desinfectante concentrado. Luego de esperar 10 minutos, proceder a la limpieza.
 - Si se hubieran generado aerosoles, por ejemplo, de un tubo de centrifuga roto, apagar la centrifuga, pero dejarla cerrada al menos por 30 minutos para permitir que los aerosoles se asienten.
 - Absorber la mayor cantidad del derrame con materiales desechables antes de proceder a la desinfección.
 - Limpiar el sitio de derrame de todos los materiales visiblemente contaminantes con una solución acuosa de detergente o con una solución de blanqueador al 10%.
 - Descontaminar el sitio con un desinfectante apropiado (véase cuadro 1-19).
 - Absorber el material desinfectante y enjuagar el sitio con agua. Finalmente, secar para evitar resbalarse.
 - Desechar todos los materiales en un recipiente para objetos biológicos peligrosos.
- Si se derramó un agente que requiere medidas de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) fuera de la cabina de seguridad biológica, evacuar el área durante al menos 60 minutos y notificar a las autoridades correspondientes.

Cuadro 1-22 Riesgos de contraer ciertas infecciones virales transmitidas por vía sanguínea luego de la exposición a la sangre por punción con una aguja*

VIRUS	ESTADO DEL PACIENTE FUENTE DE LA MUESTRA SANGUÍNEA	CONSECUENCIA	RIESGO
Hepatitis B	Positivo para HBsAg y HBeAg	Hepatitis clínica	22-31%
	Positivo para HBsAg y negativo para HBeAg	Hepatitis clínica	1-6%
		Seroconversión	23-37%
Hepatitis C	Seropositivo	Seroconversión	0-7%
HIV	Seropositivo	Seroconversión	0.3%

* El riesgo luego del contacto de la sangre con las mucosas no está bien definido, pero es menor que luego de la punción con una aguja. Datos tomados de la referencia⁹.

ENVÍO DE MUESTRAS Y DE AGENTES ETIOLÓGICOS

Todas las muestras microbiológicas que deban transportarse a través del correo de los Estados Unidos deben embalarse bajo estrictas reglamentaciones especificadas por el Departamento de Transporte (DOT) y la *International Air Transport Association* (IATA). Los organismos aislados (agentes etiológicos) que no sean de nivel de bioseguridad I (véase cuadro 1-20) y las muestras para diagnóstico, las cuales se espera razonablemente que contengan agentes etiológicos, deben embalarse y rotularse en forma apropiada.

Las muestras se deben preparar para que soporten choques o cambios de presión que puedan tener lugar durante la manipulación y ocasionar el derrame del contenido. Un recipiente con una filtración no sólo predispone a la muestra a una posible contaminación, sino que puede también exponer a quienes lo manipulan y al personal de recepción a agentes patógenos. En la figura 1-26 se ilustra el embalaje y el rótulo adecuados de los agentes etiológicos. El recipiente primario (tubo para el análisis, frasco ampolla) debe estar tapado con una tapa hermética y rodeado por suficiente material de embalaje para absorber los líquidos en caso de que ocurra una filtración. A su vez, se lo debe colocar en un recipiente secundario hermético, preferentemente de metal y con tapa de rosca. Los recipientes primario y secundario se colocan luego en una caja externa de embalaje

de tableros de fibra, cartón corrugado o poliestireno. El hielo seco se considera material peligroso. Una caja de cartón para envío que contiene hielo seco como refrigerante de una muestra, debe rotularse **"MUESTRA MÉDICA CONGELADA CON HIELO SECO"**. El embalaje debe hacerse de tal manera que pueda escaparse el dióxido de carbono gaseoso para evitar la acumulación de presión que pueda ocasionar la rotura del recipiente. El hielo seco debe ubicarse afuera del recipiente secundario junto con un material que amortigüe los golpes para que el segundo recipiente no quede suelto dentro del recipiente externo a medida que el hielo seco se sublima.

Además de la etiqueta con la dirección, el recipiente externo debe tener pegada una etiqueta que indique los agentes etiológicos/materiales biomédicos (con su logotipo en rojo contra fondo blanco) y también una advertencia para el transportador, como se muestra en la figura 1-27.

PELIGROS NO BIOLÓGICOS**Sustancias químicas**

1. Debe realizarse un plan de higiene químico para el laboratorio.⁷³ Se encuentran disponibles las guías para el tratamiento de los desechos del laboratorio.⁶³

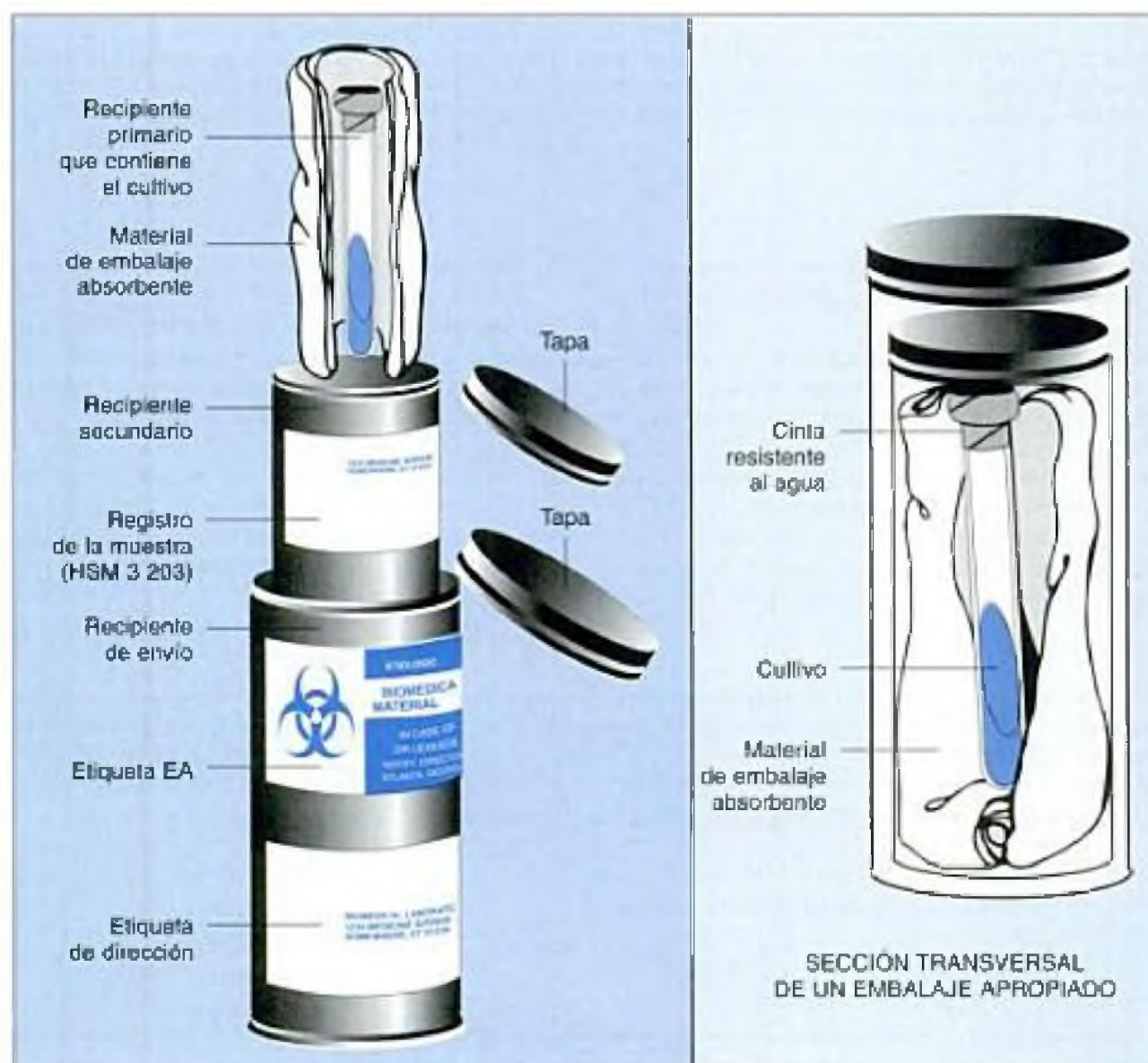


Figura 1-26 Técnica adecuada para embalar materiales con peligro biológico.

2. Punto de inflamabilidad: las sustancias combustibles volátiles liberan vapores sobre la superficie del líquido. El punto de inflamabilidad es la temperatura más baja posible a la cual se produce una suficiente concentración de vapores para que se enciendan. Las sustancias volátiles se conocen en forma conjunta como inflamables. La clasificación basada en el punto de inflamabilidad y el punto de ebullición es:

a. Inflamables

- 1) Clase 1A: punto de inflamabilidad, $< 22^{\circ}\text{C}$; punto de ebullición, $< 38^{\circ}\text{C}$
- 2) Clase 1B: punto de inflamabilidad, $< 22^{\circ}\text{C}$; punto de ebullición, $> 38^{\circ}\text{C}$
- 3) Clase 1C: punto de inflamabilidad, $> 21^{\circ}\text{C}$; punto de ebullición, $< 38^{\circ}\text{C}$

b. Combustibles

- 1) Clase IIIA: punto de inflamabilidad, $> 60^{\circ}\text{C}$ y $< 94^{\circ}\text{C}$
- 2) Clase IIIB: punto de inflamabilidad, $> 94^{\circ}\text{C}$

En el laboratorio de microbiología se pueden encontrar diversos materiales combustibles, aunque no en las cantidades que se utilizan en algunas otras áreas. Un peligro particular es el dietil éter, que puede formar peróxidos explosivos luego de su exposición al aire. El éter se utiliza en algunos procedimientos de concentración de parásitos. Hoy se dispone de otras alternativas a este procedimiento para evitar tal peligro. Si es necesario utilizar éter, debe almacenarse en la menor cantidad posible y de manera adecuada.

3. Las sustancias químicas corrosivas se definen como agentes que tienen un pH $< 2,1$ o $> 12,5$ o que pueden corroer el acero (SAE1020) más de 0,6 cm por año a una temperatura de $54,4^{\circ}\text{C}$. En el laboratorio, los corrosivos más comunes son los ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico. Se deben utilizar transportadores de botellas que contienen ácidos concentrados en cantidades mayores de 500 mL.
4. Las sustancias químicas incompatibles (identificadas de ese modo en las hojas de información sobre la seguridad del material) no deben utilizarse o almacenarse juntas.
5. Las lutas y cabinas de almacenamiento seguro deben ubicarse lejos de las fuentes de calor, llama, chispas y salidas. Las áreas de almacenamiento deben estar ventiladas en forma adecuada y ser de acceso limitado al personal.
6. Todos los recipientes deben estar claramente rotulados con:
 - a. Contenido
 - b. Advertencias de peligro
 - c. Precauciones especiales
 - d. Fecha de recibido/preparado
 - e. Fecha de apertura/puesta en uso
 - f. Fecha de vencimiento
 - g. Fabricante
7. En caso del derrame de una sustancia química líquida:^{43,73}
 - a. Determinar la naturaleza del peligro, si es necesario consultar la hoja de información sobre la seguridad del material. Si el derrame es una emergencia evacuar el área. Si el material presenta peligro de encenderse, eliminar todas las fuentes de ignición.
 - b. Notificar al personal apropiado y obtener más ayuda si fuera necesario. Identificar cualquier necesidad de dispositivos de protección personal.
 - c. Confinar el derrame en un área lo más pequeña posible.
 - d. Neutralizar los ácidos con carbonato disódico. Neutralizar los álcalis con ácido bórico al 1%. Para grandes cantidades de ácidos o bases enjuagar con abundante agua luego de la neutralización.
 - e. Limpiar cualquier área salpicada por el derrame.

Disposiciones previas requeridas por el IATA

Se realizaron las reglamentaciones para mercancías peligrosas 1.3.3.1



Figura 1-27 Logotipo del agente etiológico y "aviso al transportador" que debe colocarse en el exterior de cualquier paquete que contenga materiales peligrosos o infecciosos.

- f. Para derrames de líquidos inflamables y tóxicos, utilizar absorbentes para reducir la presión de vapor y evitar la ignición del líquido.
8. Desecho de las sustancias químicas:
 - a. Utilizar guantes de goma, delantal de goma y gafas.
 - b. Eliminar todos los objetos presentes en el lavabo designado para descarte. Dejar correr agua fría de modo que no salpique dentro del lavabo.
 - c. Verter lentamente el líquido lo más cerca como sea posible del drenaje, sin salpicar. Sólo se pueden descartar en el drenaje del lavabo cantidades menores de 500 mL.
 - d. Luego de finalizar el descarte, dejar que continúe corriendo agua limpia durante varios minutos.
 - e. Descartar los solventes orgánicos solubles en agua (metanol, acetona) como ya se describió. Para los líquidos orgánicos insolubles, sólo se pueden descartar de esta forma cantidades menores de 100 mL. Para cantidades mayores, se debe consultar con la oficina de seguridad del hospital o con la oficina de seguridad y salud ambiental local.
9. Peligros radiactivos: en el pasado, los laboratorios utilizaban sustancias radiactivas, en especial, para los inmunoanálisis. Estos procedimientos han sido reemplazados casi por completo por los enzimoimmunoanálisis. Si en el laboratorio se utiliza algún material radiactivo, se deben seguir las reglamentaciones apropiadas de manera estricta. Casi siempre hay un oficial de seguridad institucional para los materiales radiactivos, a menudo en el Departamento de Radiología.
10. Carcinógenos: se debe prestar especial atención a los temas de seguridad para este tipo de sustancias químicas que se ha demostrado que tienen cierto potencial neoplásico, a

veces sólo en animales de laboratorio. En el laboratorio de microbiología, el compuesto que más probablemente se encuentra en esta categoría es el formaldehído. La formalina es una solución estabilizada comercial de formaldehído, utilizada como solución al 10% en buffer (4% formaldehído). El formaldehído es combustible y un carcinógeno potencial. Las reglamentaciones locales para el almacenamiento, uso y desecho del formaldehído difieren. El área de trabajo debe estar bien ventilada; se debe utilizar preferentemente una campana de escape para sustancias químicas. El *College of American Pathologists* exige el control de los vapores de formaldehído en el área de trabajo; si se encuentran niveles aceptables, no se necesita repetir la prueba, a menos que cambien las condiciones.

- I L. Mercurio: el mercurio elemental es un importante peligro para la salud. En el laboratorio de microbiología se lo encuentra en los termómetros y en algunos reactivos fijadores para los frotis de parasitología. A pesar de que sólo se hallan involucradas pequeñas cantidades, muchas instituciones han elegido, de manera voluntaria o debido a leyes locales, eliminarlo por completo.

Incendios

1. Cada empleado del hospital es responsable de evitar los incendios y de ayudar a reducir al mínimo los siniestros que los ocasionan.
2. Mantener las áreas de trabajo libres de basura acumulada y de materiales inflamables. Los corredores, los pasillos y las escaleras deben mantenerse sin obstrucciones que puedan impedir la salida o agregar combustible a un incendio.
3. Conocer las fuentes de ignición, las llamas abiertas, los elementos de calor y los generadores de chispas (motores, interruptores de luz, fricción y estática). Más del 22% de los incendios de los hospitales son causados por instalaciones eléctricas defectuosas.
4. El personal debe estar instruido acerca de las diferencias y el uso de los extintores para las cuatro clases de incendios:
 - a. Clase A: incendios que involucren materiales combustibles ordinarios, como madera, papel, tela y plásticos; utilizar un extintor de agua a presión (tipo A).
 - b. Clase B: incendios que involucren líquidos inflamables, como alcohol, nafta, querosén y grasa; utilizar un extintor de dióxido de carbono (tipo B).
 - c. Clase C: incendios que involucren equipos eléctricos en los cuales puede existir peligro de electrocutarse debido a la conductividad eléctrica; no utilizar nunca un extintor de agua; utilizar un extintor de sustancias químicas secas (tipo C).
 - d. Clase D: incendios que involucren metales combustibles como magnesio y potasio. Se requieren técnicas especiales. Llamar de inmediato a la estación de bomberos local.
5. Las mantas para incendios se utilizan para sofocar la vestimenta incendiada, envolviendo a la víctima con ellas. Si la vestimenta se incendia, deberá ser arrojada al piso y apisonada para sofocar el fuego contra el piso. **No corra en busca de una manta;** la corriente de aire sólo ventilará las llamas y dará como resultado un accidente más serio. De manera similar, una manta para incendios debe utilizarse con la víctima sobre el piso; envolver a la persona parada con una manta sólo creará una chimenea para las llamas.
6. Cumpla con todas las reglamentaciones locales para los incendios. Participe en los simulacros periódicos que se realizan en el hospital. Cada empleado debe conocer el proce-

dimiento del simulacro de incendio y la ruta de evacuación de su área del laboratorio.

Bioterrorismo

La probabilidad de que los terroristas utilicen agentes químicos, biológicos o radiactivos ha sido real durante muchos años, pero adquirió un nuevo significado luego de: 1) la tragedia en el World Trade Center y 2) el descubrimiento de cartas enviadas a través del servicio postal que contenían esporas de ántrax. En la actualidad se requiere que todos los laboratorios limiten ciertos agentes a un uso absolutamente esencial y que le proporcione al gobierno un inventario de ellos. Además, cada laboratorio debe preparar un plan de contención para ocuparse del bioterrorismo. Muy pocos laboratorios de diagnóstico tienen a mano alguno de estos agentes seleccionados (véase recuadro 1-23). La responsabilidad principal de ocuparse de la mayoría de estos microorganismos recae sobre los laboratorios de referencia, los laboratorios de salud pública y otros laboratorios del gobierno. El principal trabajo de un laboratorio diagnóstico es reconocer la posibilidad de estar ante uno de estos agentes mencionados durante el procedimiento normal de rutina al realizar su tarea; luego se lo envía a una dependencia de apoyo designada y se notifica a las autoridades correspondientes. Si se sospecha terrorismo, la investigación tomará carácter delictivo. En el cuadro 1-23 se resumen las categorías de los posibles agentes de bioterrorismo.¹²

En los Estados Unidos, el plan nacional de preparación para el terrorismo contempla una categorización de los laboratorios en niveles múltiples con una responsabilidad gradual para evaluar las posibles amenazas. La clasificación de los laboratorios se detalla en el cuadro 1-24. Las cuatro categorías originales se compendiaron en tres.¹³

Aseguramiento de la calidad

El sello de los buenos laboratorios clínicos es prestar constante atención a la calidad del trabajo. El aseguramiento de la calidad es el amplio paraguas que cubre muchas actividades. A veces, parece que los nombres de los programas cambian con tanta frecuencia como los de las bacterias. Las denominaciones de mejoramiento de la calidad o mejoramiento total de la calidad han dado paso al aseguramiento de la calidad, pero en todos los casos el mensaje básico es que los microbiólogos deben mirar constantemente lo que están haciendo y mejorar los procesos. El control de la calidad es un procedimiento tradicional y se analizará por separado.

El aseguramiento de la calidad puede lograrse en forma interna o realizarse como parte de un programa externo. Se encuentran disponibles las guías nacionales de consenso.^{64,77} Debe comprender todas las fases del ciclo de diagnóstico.⁸⁸

En la sección de acreditación del laboratorio se discuten muchas de las características de un programa de aseguramiento de la calidad, que incluye los programas de calidad como un aspecto crítico. Las actividades internas abarcan la documentación del desempeño clínico de las ensayos (que deberá realizarse para cada prueba nueva que se introduzca en el laboratorio) o la documentación de la utilización del laboratorio por parte de los médicos. Se debe documentar el desempeño del personal técnico en cada tarea de la que son responsables. Se debe evaluar la equivalencia de las observaciones morfológicas entre los técnicos que realizan las mismas tareas. Se requiere la evaluación formal de las competencias de todo el personal que realiza las pruebas de laboratorio (incluidos los enfermeros y

Cuadro 1-23 Clasificación de los agentes biológicos y químicos con potencial para terrorismo

CATEGORÍA DEL AGENTE	DESCRIPCIÓN DE LA CATEGORÍA	EJEMPLOS
Categoría A	• Fácilmente diseminado o transmitido persona a persona • Causa alta mortalidad con potencialidad para un gran impacto en la salud pública • Puede causar pánico público y alteración social Y • Requiere especial acción para la preparación de la salud pública	• Viruela (virus de la viruela) • <i>Bacillus anthracis</i> (carbuncos) • <i>Yersinia pestis</i> (peste) • Toxina de <i>Clostridium botulinum</i> (botulismo) • <i>Francisella tularensis</i> (tularemia) • Filovirus (virus Marburg y virus Ébola) • Arenaviruses causantes de fiebre hemorrágica
Categoría B	• Moderadamente fácil de diseminar • Moderada morbilidad y baja mortalidad • Requieren un incremento en la vigilancia de enfermedades	• <i>Coxiella burnetii</i> (fiebre Q) • Especies de <i>Brucella</i> (brucelosis) • <i>Burkholderia mallei</i> (muermo) • Arbovirus (p. ej., virus de la encefalomiелitis del Este y del Oeste) • Toxina ricina de <i>Ricinus communis</i> (semilla de ricino) • Toxina ε de <i>Clostridium perfringens</i> • Enterotoxina B de estafilococos • Especies de <i>Salmonella</i> • <i>Shigella dysenteriae</i> • <i>Escherichia coli</i> (O157:H7) • <i>Vibrio cholerae</i> • <i>Cryptosporidium parvum</i>
Categoría C	Agentes emergentes con: • Disponibilidad • De fácil producción y diseminación • Potencial de alta morbilidad, mortalidad e impacto en la salud pública	• Virus Nipha • Hantavirus • Virus de la fiebre hemorrágica transmitida por garrapatas • Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas • Virus de la fiebre amarilla • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistente

Adaptado de la referencia¹¹.

los médicos) para todos los ensayos que no sean de exención. El examen puede ser de diferentes maneras: observación directa, exámenes escritos o pruebas "de campo" utilizando muestras del laboratorio. Se han publicado las guías de consenso nacional para implementar estos programas.¹⁶

La evaluación del desempeño del laboratorio se puede mejorar comparando el desempeño propio con el de los pares mediante un programa externo. El *College of American Pathologists* ofrece dos programas de este tipo.^{122,140} El parámetro que se elige para la evaluación se denomina indicador.

El primer programa, llamado Q-Probes, consiste en estudios transversales sobre un tema en particular, como la frecuencia en la que un microorganismo propio de la piel se halla en los hemocultivos. Cada laboratorio participante envía sus resultados del estudio que se han realizado de acuerdo con un protocolo definido. Estos resultados se analizan con cuidado y se elabora un informe que se entrega a todos los laboratorios participantes.

Por el contrario, el programa de Q-tracks es el control reiterado de un número limitado de indicadores definidos como útiles para establecer el desempeño de un laboratorio. Por ejemplo, el tiempo global de respuesta de un laboratorio para un determinado analito puede analizarse a lo largo del tiempo. Por lo tanto, es posible graficar el desempeño en relación con sus pares.

Como ya se dijo, un laboratorio puede también evaluar su desempeño en comparación con el de sus pares a través de la

participación en los ensayos de aptitud.^{16,140} En un comienzo, el *College of American Pathologists* proporcionaba estos ensayos como una herramienta de educación para el mejoramiento del desempeño de los laboratorios. Luego de la reglamentación de las dos leyes de CLIA, pasaron a ser una parte obligatoria para el funcionamiento del laboratorio.

Control de calidad

El control de calidad en un sentido estricto consiste en la evaluación continua y sistemática del trabajo para asegurar que el producto final se encuentra conforme a los límites de precisión y de exactitud tolerados previamente establecidos.¹ Los directores y supervisores de los laboratorios actuales deben darse cuenta de que el control de calidad es sólo una faceta del amplio terreno del aseguramiento de la calidad. Los interesados pueden acceder a los requerimientos del *College of American Pathologists* para el control de calidad (y también para la seguridad y otros temas importantes dentro de la gestión de laboratorios) obteniendo la Lista de Comprobación General de Laboratorios del sitio de Internet del *College of American Pathologists* (<http://www.cap.org>).

El control de calidad en microbiología es más un arte que una ciencia; involucra elementos intangibles, como el sentido común, el buen criterio y la atención constante a los detalles. Los programas se deben organizar teniendo en cuenta objetivos bien definidos.

Cuadro 1-24 Clasificación de los laboratorios involucrados en la investigación de terrorismo biológico o químico

NIVEL	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS
A	• Detección temprana de la diseminación intencional de agentes biológicos o químicos • Procesamiento inicial de las muestras clínicas	• Laboratorios de hospitales o de salud pública • Instituciones con bajo nivel de bioseguridad
B (antes B y C)	• Capacidad central para el aislamiento y la caracterización de agentes de bioterrorismo seleccionados • Presta servicios para reducir la sobrecarga de muestras de los laboratorios de un nivel mayor • Capacidad avanzada para la identificación rápida de agentes seleccionados, mediante técnicas de cultivo y moleculares • Participa en el desarrollo de pruebas y en la evaluación	• Laboratorios de salud pública locales y estatales • Laboratorios estatales de alto nivel • Centros médicos académicos
C (antes D)	• Niveles más altos de contención y sofisticación • Capacidad para detectar agentes diseñados	• Grupo selecto de laboratorios estatales • Laboratorios académicos que operan en un alto nivel de contención bajo contrato estatal
<i>Adaptado de la referencia¹⁰.</i>		

COMPONENTES DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD

Un programa básico de control de calidad para microbiología enumera varios elementos específicos que se deben considerar al implementar las diversas fases de un programa. Bartlett⁹ ideó y analizó diferentes niveles de actividades, que comprenden desde las más básicas hasta las más avanzadas. Utilizando su esquema, un supervisor puede seleccionar el nivel de actividad que es apropiado para el personal y el volumen de trabajo en un laboratorio determinado.

La comisión de acreditación e inspección de los laboratorios del *College of American Pathologists* (CAP) ha establecido los estándares para la acreditación de los laboratorios clínicos, entre ellos una lista de comprobación para la inspección de los laboratorios de microbiología. Esta lista le brinda a los supervisores una valiosa guía para realizar la evaluación punto por punto de las necesidades de control de calidad. Las reglamentaciones estatales de la CLIA '88 incluyen muchos de estos requerimientos.

Las reglamentaciones están en constante revisión y pueden ser modificadas. Por ejemplo, en enero de 2004, el CMS publicó la modificación a las reglamentaciones sobre "control de calidad equivalente". Esta modificación permite reducir la frecuencia de ciertas tareas de control de calidad luego de la validación de un laboratorio que ha cumplido con un criterio definido. Algunos de los cambios son más exigentes que los que solicitan algunas calificadas agencias de acreditación, como el CAP; otros lo son menos. Por ley, las agencias calificadas deben tener estándares que son al menos tan exigentes como el CMS, pero sus estándares pueden serlo aún más.

En un comienzo, se debe seleccionar un coordinador de control de calidad. Se deben establecer con claridad las obligaciones del coordinador y conferirle la autoridad apropiada para que pueda tratar en forma eficiente los problemas cuando éstos surjan. Es responsabilidad del coordinador establecer los estándares mínimos de control de calidad que el laboratorio debe alcanzar y esquematizar los diversos pasos que se deben seguir para monitorizar y vigilar a diario todas las facetas del programa.

El coordinador debe controlar que todas las actividades estén claramente descritas en un manual de control de calidad, en el cual también se deben esquematizar:

1. Los detalles de todas las prácticas de control de calidad, como los procedimientos y los esquemas para controlar el funcionamiento de los equipos.
2. El control de todos los medios y reactivos en cuanto a su reactividad, fecha de vencimiento y patrones de reacción apropiados frente a los organismos de prueba.
3. Todos los resultados de los ensayos de aptitud.

Se deben diseñar los formularios adecuados para recolectar los datos con un formato de columnas de números, gráficos o diagramas, de modo de poder detectar con rapidez cualquier elemento que esté fuera de los valores esperados. El coordinador debe revisar también todos los registros de control y verificar que todas las mediciones que se encuentran fuera de los valores esperados y que las acciones correctivas resultantes estén claramente anotadas. A continuación, se realiza un breve repaso de los numerosos componentes de un programa de control de calidad.

CONTROL DE LOS APARATOS DEL LABORATORIO

En todos los laboratorios de microbiología se debe establecer un programa de mantenimiento preventivo para asegurar el funcionamiento adecuado de los equipos eléctricos y mecánicos. Los aparatos deben revisarse a intervalos preestablecidos; se deben reemplazar ciertas partes de ellos luego de un tiempo de uso especificado, a pesar de que no parezcan gastadas. En el cuadro 1-25 se muestra una lista breve de algunos aparatos, el procedimiento de control que se debe llevar a cabo y la frecuencia y los límites de tolerancia. Se deben asignar las tareas entre los miembros del personal del laboratorio para asegurarse de que todas las inspecciones se lleven a cabo y que se registren todos los datos de manera exacta en cuadros o en el manual de mantenimiento. Es

Cuadro 1-25 Procedimientos de vigilancia del control de calidad del equipamiento microbiológico usados comúnmente

EQUIPAMIENTO	PROCEDIMIENTO	CRONOGRAMA	LÍMITES DE TOLERANCIA
Refrigeradores Congeladores	Registro de temperatura* Registro de temperatura*	Diario o continuo Diario o continuo	2-8 °C -8 a -20 °C -60 a -75 °C
Estufas	Registro de temperatura*	Diario o continuo	35.5 ± 1 °C
Estufas (CO ₂)	Medición del contenido de CO ₂ Uso de un analizador de gases sanguíneos o un dispositivo Fyrite ¹	Diario o dos veces por día	5-10%
Baños de agua termostatizados	Registro de temperatura*	Diario	36-38 °C 55-57 °C
Bloques de calentamiento (5 bloques térmicos)	Registro de temperatura*	Diario	± 1 °C del fijado
Autoclaves	Prueba con tira de espora (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	Por lo menos semanalmente	Sin crecimiento de esporas en los subcultivos indica un ensayo estéril
Medidores de pH	Prueba con soluciones de calibra- ción de pH	Con cada uso	± 0,1 unidades de pH del estándar que se usó
Jarros de anaerobiosis	Tira con indicador azul de metileno	Con cada uso	Un cambio de color de la tira de azul a blanco indica baja tensión de O ₂
Caja plástica anaerobia	Cultivo de <i>Clostridium novyi</i> tipo B	Realizarlo periódicamente	El crecimiento indica muy baja tensión de O ₂ . Esto se utiliza sólo cuando se requiere un tensión de O ₂ extremadamente baja
	Solución con indicador azul de metileno	Continuo o diario	Las soluciones permanecen incoloras si la tensión de O ₂ es baja
Aparato rotatorio para serología	Medición de las revoluciones por minuto	Con cada uso	180 ± 10 RPM
Centrifugas	Control de revoluciones con un tacómetro	Mensualmente	Dentro del 5% del fijado en el dial indicador
Cabinas de seguridad	Medición de la velocidad del aire a través de la apertura frontal ²	Semestral o cuatrimestral	50 ft de flujo de aire por minuto ± 5 ft/min

* Cada semáforo de monitorización debe ser calibrado contra un termómetro estándar.
¹ Biorad Instrument Co., Pittsburgh, PA.
² Velometer Jr., Alnor Instrument Co., Chicago, IL.

importante detectar de inmediato las tendencias ascendentes o descendentes, para que se puedan tomar las acciones correctivas antes de que se produzcan errores serios. Se debe determinar y registrar en forma diaria con un termómetro calibrado por la *Bureau of Standards* o con uno que se haya controlado con un termómetro calibrado, la temperatura de las estufas de incubación, refrigeradores, congeladores, baños de agua termostatizados y los bloques de calentamiento (bloques térmicos). Se debe determinar también en forma diaria la concentración de CO₂ en las estufas con atmósfera de CO₂. Se debe establecer la causa de cualquier lectura que se encuentre fuera del rango estipulado por el control de calidad y corregir de inmediato el defecto.

CONTROL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS E INSUMOS

Todos los medios y reactivos se deben revisar frente a los controles apropiados para establecer su correcta reactividad. Se reconoce que muchos de los medios comerciales modernos se realizan con un alto grado de calidad o confiabilidad. Se han creado recomendaciones de consenso para las necesidades locales del control de calidad.²⁴ Los pocos medios que pueden tener problemas ocasionales (p. ej., agar chocolate, el medio para *Campylobacter jejuni* y el agar de Thayer-Martin) deben someterse a pruebas de control en cada laboratorio. No existe necesidad de probar muchos otros medios si el fabricante proporciona la documentación que demuestra que se observó en ellos una correcta reactividad.

Cuadro 1-26 Control de calidad de los medios utilizados con mayor frecuencia: organismos de control sugeridos y reacciones esperadas		
MEDIO	MICROORGANISMOS DE CONTROL	REACCIONES ESPERADAS
Agar sangre	<i>Streptococcus</i> del grupo A <i>S. pneumoniae</i>	Crecimiento adecuado, β -hemólisis Crecimiento adecuado, α -hemólisis
Agar bilis-esulina	Especies de <i>Enterococcus</i> α -hemolíticos <i>Streptococcus</i> , no del grupo D	Crecimiento adecuado, negro Sin crecimiento; sin cambio de color del medio
Agar chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Crecimiento adecuado Crecimiento adecuado
Agar urea de Christensen	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Completamente rosa (positivo) Pico de flauta rosa (positivo parcial) Amarillo (negativo)
Agar citrato de Simmons	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Crecimiento o color azul (positivo) Sin crecimiento, permanece verde (negativo)
Agar cistina tripticasa (CTA) Dextrosa	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>Branhamella catarrhalis</i>	Amarillo (positivo) Sin cambio de color (negativo)
Sacarosa	<i>Escherichia coli</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	Amarillo (positivo) Sin cambio de color (negativo)
Maltosa	Especies de <i>Salmonella</i> , o <i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	Amarillo (positivo) Sin cambio de color (negativo)
Lactosa	<i>N. lactamica</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	Amarillo (positivo) Sin cambio de color (negativo)
Lisina descarboxilasa	<i>K. pneumoniae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	Azulado (positivo) Amarillo (negativo)
Arginina (dihidrolasa)	<i>E. cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Azulado (positivo) Amarillo (negativo)
Omitina	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>	Azulado (positivo) Amarillo (negativo)
Desoxirribonucleasa (DNasa)	<i>Serratia marcescens</i> <i>E. cloacae</i>	Zona de clarificación (adicional HCl 1 N) Sin zona de clarificación
Agar eosina-azul de metileno	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Shigella flexneri</i>	Crecimiento adecuado, brillo verde metálico Crecimiento adecuado, colonias violetas, sin brillo Crecimiento adecuado, colonias transparentes (lactosa negativo)
Agar enérgico de Hektoen	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i>	Colonias verdes con centros negros Colonias verdes transparentes Crecimiento levemente inhibido, colonias naranjas
Indol (de Kovac)	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Rojo (positivo) Sin color rojo (negativo)
Agar hierro de Kligler	<i>E. coli</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Pico de flauta ácido/fondo ácido Pico de flauta alcalino/fondo ácido Pico de flauta alcalino/fondo alcalino Pico de flauta alcalino/fondo negro
Agar lisina-hierro	<i>S. typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>P. mirabilis</i>	Pico de flauta y fondo violeta, H ₂ S + Pico de flauta violeta, fondo amarillo Pico de flauta rojo, fondo amarillo

(Continúa)

Cuadro 1-26 Control de calidad de los medios utilizados con mayor frecuencia: organismos de control sugeridos y reacciones esperadas (cont.)

MEDIO	MICROORGANISMOS DE CONTROL	REACCIONES ESPERADAS
Agar de MacConkey	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> Especies de <i>Enterococcus</i>	Colonias rosadas (lactosa positivo) Colonias incoloras, sin dispersión Sin crecimiento
Malonato	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Sin crecimiento Crecimiento adecuado, azul (positivo)
Movilidad (agar semisólido)	<i>P. mirabilis</i> <i>K. pneumoniae</i>	Medio turbio (positivo) Sin bordes filamentosos en la estría de siembra (negativo)
Caldo o agar nitrato	<i>E. coli</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	Rojo al agregar los reactivos Sin color rojo (negativo)
Agar sangre feniletil alcohol	Especies de <i>Streptococcus</i> <i>E. coli</i>	Crecimiento adecuado Sin crecimiento
<i>o</i> -nitrofenol- β -galactopiranosido (ONPG)	<i>Serratia marcescens</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Amarillo (positivo) Incoloro (negativo)
Fenilalanina desaminasa	<i>P. mirabilis</i> <i>E. coli</i>	Verde (adicionar 10% FeCl ₃) Sin color verde (negativo)
Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	Colonias incoloras, centro negro Sin crecimiento
Voges-Proskauer	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Rojo (adicionar reactivos) Sin desarrollo (negativo)
Agar xilosa-lisina-dextrosa (XLD)	Especies de <i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> Especies de <i>Shigella</i>	Colonias rojas (lisina positivo) Colonias amarillas (azúcares positivo) Colonias transparentes (negativo)

* Tomado de Microbiology Checklist, Collage of American Pathologist, Revisado 14 de octubre de 2003.

Cuadro 1-27 Control de calidad de reactivos y medios seleccionados*

MEDIOS O REACTIVOS	FRECUENCIA	CONTROLES
Tinción de Gram	Cada nuevo lote de colorantes y al menos semanalmente	Organismos grampositivos y gramnegativos
Otras tinciones no inmunológicas, no inmunofluorescentes	Cada día que se utiliza y cada nuevo lote, número de lote o envío	Reactividad apropiada
Tinciones fluorescentes	Cada vez que se utiliza	Reactividad apropiada
Sistemas de identificación de catalasa, coagulasa, oxidas, bacitracina, optochina, ONPG, discos X o V o XV	Cada nuevo lote, número de lote o envío	Controles positivos y negativos
Análisis (Salmonella y Shigella)	Cada nuevo lote, número de lote o envío cuando se prepara o abre y una vez cada 6 meses en lo sucesivo	Controles positivos y negativos
β -lactamasa (otras diferentes de nitrocefina)	Cada día que se utiliza	Controles positivos y negativos
β -lactamasa (nitrocefina)	Cada nuevo lote, número de lote o envío	Controles positivos y negativos
Sondas de ácidos nucleicos	Cada día que se utiliza	Controles positivos y negativos
Tinciones AFB	Cada día que se utiliza	Controles positivos y negativos
Antibiograma	Diariamente o semanalmente si cumple con el criterio (véase cap. 17)	Organismos apropiados

* Tomado de Microbiology Checklist, Collage of American Pathologist, Revisado 14 de octubre de 2003.

En el cuadro 1-26 se listan los organismos sugeridos y los resultados aceptables para los medios de cultivo utilizados con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos. En los laboratorios se pueden mantener organismos de reserva para control de calidad a través del subcultivo de las cepas bacterianas que se aíslan como parte del trabajo de rutina. Como alternativa, y más conveniente, se pueden comprar microorganismos de reserva en colecciones de cultivos, como ATCC (*American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Dr., Rockville MD) o promotores comerciales. El fabricante o el laboratorio local debe controlar en cada lote de medios de cultivo, su reactividad correcta y su capacidad como sustrato adecuado para el crecimiento bacteriano.

Los tubos de cultivo, las placas con medio y los reactivos deben presentar una etiqueta que indique en forma clara el contenido y las fechas de preparación y de vencimiento. Se debe hacer referencia a los tubos de cultivo, placas con medio y reactivos "codificados" de manera que aún el personal que no pertenece al laboratorio pueda interpretar el código. Se deben definir en forma precisa las reglas de control de calidad que se aplican a los antibiogramas.

Cada lote de medio en tubos o en placas debe ser sometido a un control de esterilidad, sobre todo aquellos a los cuales se les agregan componentes luego de su esterilización. El control de esterilidad debe realizarse en forma visual y por subcultivo. Por ejemplo, ciertos medios selectivos pueden suprimir el crecimiento visible de ciertas bacterias; sin embargo, pueden aparecer microorganismos viables en el subcultivo. El medio preparado también debe ser observado en cuanto a la presencia de otros signos de deterioro, como cambio de color, turbidez, evidencia de congelado/descongelado y estado de hidratación.

La frecuencia con la que se deben realizar las pruebas de control de calidad sobre los medios y los reactivos (incluidos los reactivos para serología) está claramente definida por varias agencias de acreditación. En el cuadro 1-27 se muestran algunas de las reglas para el control de calidad de medios y reactivos. Las recomendaciones para el control de calidad no son estáticas. Es importante seguir las recomendaciones actuales, al menos en parte, porque es probable que los cambios representen menos trabajo en lugar de más trabajo.

REFERENCIAS

- Althaus AC, Fletcher RD. Accuracy of calibrated-loop transfer. *J Clin Microbiol* 1913;16:40-4.
- Alla MJ, et al. Improved detection of bacterial growth in continuous ambulatory peritoneal dialysis effluent by use of BacT/Alert FAN bottles. *J Clin Microbiol* 1997;35:862-866.
- August MJ, et al. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. *Comitech* 1990;3A.
- Baery M, et al. Brief report: treatment of a laboratory-acquired *Sabia* virus infection. *N Engl J Med* 1995;333:294-296.
- Barlett RC. A plea for clinical relevance in microbiology. *Am J Clin Pathol* 1974; 61:867-872.
- Barlett RC, ed. *Medical Microbiology: Quality Cost and Clinical Relevance*. New York: John Wiley, 1974.
- Barlett RC. Leadership for quality: laboratory scientists have an unprecedented opportunity to contribute to the leadership required to introduce effective quality management. *ASM News* 1991;57:15-21.
- Beltrami EM, et al. Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:385-407.
- Bobulilla M, et al. Improved method for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2145-2147.
- Caliendo AM, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLI-COR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:2122-2127.
- Casadevall A, Profski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 2001;184:337-344.
- Centers for Disease Control. Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989;38:1-37.
- Centers for Disease Control. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC strategic planning workgroup. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49(RR-4):1-14.
- Centers for Disease Control. Appendix A. Practice recommendations for health-care facilities implementing the U.S. public health service guidelines for management of occupational exposures to bloodborne pathogens. *MMWR Recoman Rep* 2001;50 (RR-11):43-44.
- Centers for Disease Control. Appendix B. Management of occupational blood exposures. *MMWR Recoman Rep* 2001;50(RR-11):45-46.
- Center for Disease Control. Appendix C. Basic and expanded HIV postexposure prophylaxis regimens. *MMWR Recoman Rep* 2001;50(RR-11):47-52.
- Centers for Disease Control. Updated U.S. public health service guidelines for the management of occupational exposures to HBV, HCV, and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. *MMWR Recoman Rep* 2001;50(RR-11):1-42.
- Centers for Disease Control Appendix A. Regulatory framework for disinfection and sterilants. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52(RR-17):62-64.
- Centers for Disease Control. Appendix C. Methods for sterilizing and disinfecting patient-care items and environmental surfaces. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52(RR-17):66.
- Chastre J, et al. Prospective evaluation of the protected specimen brush for the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1984;130: 924-929.
- Cherry WB, Moody MD. Fluorescent-antibody techniques in diagnostic bacteriology. *Bacteriol Rev* 1965;29:222-250.
- Conamy JP, et al. Airborne rabies encephalitis: demonstration of rabies virus in the human central nervous system. *Neurology* 1977;27:67-68.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999.
- Crain EF, Gershel JC. Urinary tract infection in febrile infants younger than 8 weeks of age. *Pediatric* 1990;86:363-367.
- Curt JH, et al. A primer on cytotoxins: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:742-780.
- Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340-350.
- Delvies PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
- Delvies PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
- Delvies PJ, Roitt IM. The immune system: second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
- Disarello CA, Cannon JF, Wolff SM. New concept on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis* 1988;10:168-189, 1988.
- Fine MJ, et al. Evaluation of housestaff physicians' preparation and interpretation of sputum Gram stains for community-acquired pneumonia. *J Gen Intern Med* 1991;6:189-198.
- Flynn PM, et al. Differential quantitation with a commercial blood culture tube for diagnosis of catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1045-1048.
- Fraser DW, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977;297:1189-1197.
- Friedly G. Importance of bacterial stain in the diagnosis of infectious disease. *J Med Technol* 1985;1:823-833.
- Fung JC, et al. Growth of coagulase-negative staphylococci on colistin-nalidixic acid agar and susceptibility to polymyxins. *J Clin Microbiol* 1984;19:714-716.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:4:18-454.
- Garcia LS (Ed.) *Clinical Laboratory Management*. American Society for Microbiology, Washington DC, 2004.
- Gavin PJ, et al. The role of molecular typing in the epidemiologic investigation and control of nosocomial infections. *Pathol Case Rev* 2003;8:163-171.
- Gockley RW, et al. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J Clin Microbiol* 1977;6:396-399.
- Gribble MJ, et al. Pyuria: its relationship to bacteriuria in spinal cord injured patients on intermittent catheterization. *Arch Phys Med Rehabil* 1989;70:376-379.
- Gurtman RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999.
- Hagege GJ Jr, Harrington DJ. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Lab Med* 1984;15:109-115.
- Hall CJ, et al. Laboratory outbreak of Q fever acquired from sheep. *Lancet* 1982; 1:1004-1006.
- Hoel D, et al. Typhoid fever acquired in a medical technology teaching laboratory. *Lab Med* 1988;19:166-168.
- Hoff RG, et al. Bacteriuria screening by use of acridine orange-stained smears. *J Clin Microbiol* 1984;21:513-516.
- Hughes JD, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F Bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *J Clin Microbiol* 2001;39: 4468-4471.
- Hughes MD, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4 + lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med* 1997;126:929-938.
- Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd Ed. Washington, DC: ASM Press, 2004.

49. Isenberg HD, Washington JA, Doern G, Amsterdam D. Collection, handling and processing of specimens. In Balows A, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991:15-28.
50. James AN. Legal realities and practical applications in laboratory. *Lab Med* 1988;19:84-87.
51. Kaurach T, Michelson NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344:655-664.
52. Kay AB. Allergy and allergic diseases: first of two parts. *N Engl J Med* 2001;44:30-37.
53. Krieger DM, Howley PM. *Fields Virology*. 4th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
54. Koneman EW. The Other End of the Microscope: The Bacteria Tell Their Story. Washington, DC: ASM Press, 2002.
55. Kwon-Chang KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
56. Lauer BA, et al. Comparisons of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981;14:201-205.
57. Lelystrom-Himes JA, Gallin JJ. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000;343:1700-1714.
58. Lell B, et al. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999;28:794-799.
59. Lund ME, Hawkins RW. Evaluation of the prompt inoculation system for preparation of standardized bacteria inocula. *J Clin Microbiol* 1985;18:84-91.
60. Maki DC, et al. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305-1309.
61. Malech HL, Gallin JJ. Current concepts in immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987;317:687-694.
62. Mansell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.
63. Medzhitov R, Janeway C. Advances in immunology: innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344.
64. Mermel LA, et al. Outbreak of *Shigella sonnei* in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35:3163-3165.
65. Michon P, et al. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 2000;68:3164-3171.
66. Miller CD, et al. A twenty-five year review of laboratory-acquired human infections at the National Animal Disease Center. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987;48:271-275.
67. Miller JM. *A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology*. 2nd Ed. Washington, DC: ASM Press, 1998.
68. Miller JM, Holmes HT, Krisher K. General principles of specimen collection and handling. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:55-66.
69. Mills CA, Nash A, Stephen J. *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*. 5th Ed. Burlington, MA: Elsevier, 2000.
70. Morris AJ, et al. Cost and time savings following introduction of rejection criteria for clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:355-357.
71. Morris AJ, et al. Clinical impact of bacteria and fungi recovered only from broth culture. *J Clin Microbiol* 1995;33:161-165.
72. Murray PR, Washington JA II. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975;50:339-344.
73. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical laboratory safety: approved guideline (GP17-A). 1996.
74. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media: approved standard. 2nd Ed. (M22-A2). 1996.
75. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical laboratory design: approved guideline (GP13-A). 1998.
76. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Selecting and evaluating a referral laboratory: approved guideline (GP09-A). 1998.
77. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Continuous quality improvement: essential management approaches: approved guideline (GP22-A). 1999.
78. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Using proficiency testing (PT) to improve the clinical laboratory: approved guideline (GP27-A). 1999.
79. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections: approved guideline. 2nd Ed. (M29-A2). 2001.
80. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Abbreviated identification of bacteria and yeast: approved guideline (M35-A). 2002.
81. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Assessment of laboratory tests when proficiency testing is not available: approved guideline (GP29-A). 2002.
82. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical laboratory technical procedures manual: approved guideline. 4th ed. (G492-A-4). 2002.
83. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical laboratory waste management: approved guideline. 2nd ed. (GP05-A2). 2002.
84. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Application of a quality system model for laboratory services: approved guideline. 2nd Ed. (GP26-A2). 2003.
85. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality control of microbiological transport system: approved standard (M40-A). 2003.
86. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Training and competence assessment: approved guideline. 2nd ed. (GP21-A2). 2004.
87. O'Hara CM, Weinstein MP, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:183-207.
88. Patel R, Pata CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:86-123.
89. Peterson LR, Brossette SE. Hunting health care-associated infections from the clinical microbiology laboratory: passive, active, and virtual surveillance. *J Clin Microbiol* 2002;40:1-4.
90. Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab Sci* 1976;13:105-114.
91. Pike RM. Past and present hazards of working with infectious agents. *Arch Pathol Lab Med* 1978;102:333-336.
92. Pike RM. Laboratory-associated infections: incidence, fatalities, causes and prevention. *Annu Rev Microbiol* 1979;33:41-66.
93. Quinn A, et al. Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal M protein. *Infect Immun* 2001;69:4072-4078.
94. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 1977;6:305-309.
95. Reimer LG, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:67-73.
96. Rendshaw AA, et al. The lack of value of repeated *Clostridium difficile* cytotoxicity assays. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:49-52.
97. Richard P, Rathbun K. *Medical Risk Management: Preventive Strategies for Health Care Providers*. Rockville, MD: Aspen Press, 1983.
98. Richards WD, Wright HS. Preservation of tissue specimen during transport to mycobacteriology laboratories. *J Clin Microbiol* 1983;17:393-395.
99. Richmond JY, McKinney RW. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Ed. Washington DC: U.S. Government Printing Office, 1999.
100. Ryan EJ, Ray CG. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. 4th Ed. Columbus, OH: McGraw Hill/Appleton & Lange, 2003.
101. Salyers AA, Whit DD. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. 2nd Ed. Washington DC: ASM Press, 2001.
102. Schiffman RJ. Q-probes (short-term studies of the laboratory's role in quality care): nosocomial infections data analysis and critique. *Coll Am Pathol* 1990;1-14.
103. Schreckenberger PC. Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical laboratory. *ASM News* 2001;67:388-389.
104. Schwartz RS. Shattuck lecture: diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N Engl J Med* 2003;348:1017-1026.
105. Siegel DL, et al. Inappropriate testing for diarrheal disease in the hospital. *JAMA* 1990;263:979-982.
106. Simko JP, et al. Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex virus (HSV) documented by detection of HSV DNA. *Clin Infect Dis* 2002;35:414-419.
107. Smith TF, et al. Isolation of viruses from single throat swabs processed for diagnosis of Group A beta-hemolytic streptococci by fluorescent antibody technique. *Am J Clin Pathol* 1973;60:707-710.
108. Steward DK, et al. Failure of the urinalysis and quantitative urine culture in diagnosing symptomatic urinary tract infections in patients with long-term urinary catheters. *Am J Infect Control* 1985;13:154-160.
109. Strand CL. Proficiency testing: one important component of continuous quality improvement. *Am J Clin Pathol* 1994;102:393-394.
110. Tang YW, et al. Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. *Clin Infect Dis* 1999;29:805-806.
111. Taralac K, et al. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture-negative meningitis. *Clin Infect Dis* 2001;33:406-408.
112. Thomson RJ Jr, Miller JM. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington DC: ASM Press 2003:286-330.
113. Thorley-Lawson DA, Gross A. Mechanisms of disease: persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2000;350:1128-1137.
114. Uhling DT, Haslam AI. Significance of catheter tip cultures. *Invest Urol* 1977;15:37-38.
115. Van Sely RE. Bacterial sputum cultures: a clinician's viewpoint. *Mayo Clin Proc* 1977;52:39-41.
116. Walport MJ. Complement: second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1140-1144.
117. Walport MJ. Complement: first of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066.
118. Wadani AG, et al. Handling of infectious agents. *J Am Vet Med Assoc* 1972;161:1557-1565.
119. Widmer AE, Frei R. Decontamination, disinfection, and sterilization. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:77-108.
120. Wilson ML, Peller LD. Laboratory design. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenen RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, 2001:22-30.
121. Winn WC Jr, Kossatz JM. Bacterial infections. In Danjans J, Linde J, eds. *Anderson's Textbook of Pathology*. 10th Ed. St. Louis: Mosby, 1995:747-865.
122. Zarbo RJ, et al. Q-tracks: a College of American Pathologists program of continuous laboratory monitoring and longitudinal tracking. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1036-1044.

Introducción a la microbiología

Parte II: Guías para la recolección, el transporte, el procesamiento, el análisis y el informe de los cultivos a partir de muestras de localizaciones específicas

Infecciones del aparato respiratorio

Infecciones de las vías respiratorias
altas

Flora endógena

Faringitis

Otras infecciones de la cavidad bucal
diferentes de la faringitis

Infecciones de la nasofaringe y cultivos
nasofaríngeos

Otitis media y sinusitis

Epiglottitis

Laringitis

Otras infecciones de las vías respiratorias
altas

Infecciones de las vías respiratorias
bajas

Traqueobronquitis

Bronquiolitis

Neumonía

Neumonía crónica

Empiema

Neumonía en poblaciones especiales

Recolección de muestras para
el diagnóstico de las infecciones
de las vías respiratorias bajas

Pruebas de laboratorio y diagnóstico
de neumonía

Infecciones del tubo digestivo

Infecciones intestinales

Síntomas clínicos

Recolección de muestras de heces

Consideraciones epidemiológicas
en la evaluación de los pacientes
con gastroenteritis

Infecciones del tubo digestivo alto

Síntomas clínicos

Obtención de muestras del tubo
digestivo alto

Infecciones urinarias

Signos y síntomas clínicos

Factores del huésped

Recolección de muestras de orina
para cultivo

Muestras de orina del chorro medio
de la micción

Otras muestras de orina de micción
espontánea

Recolección a partir del catéter

Punción suprapúbica

Cultivo de muestras de orina

Pruebas de cribado para infecciones
urinarias

Pruebas de cribado para bacteriuria

Pruebas de cribado para pluria

Infecciones del aparato genital

Infecciones de transmisión sexual

Uretritis y cervicitis

Úlceras genitales

Infecciones genitales transmitidas por otra vía diferente de la sexual

Vaginitis y vaginosis

Infecciones de los genitales internos femeninos

Complicaciones sistémicas de las infecciones genitales

Diagnóstico de las infecciones genitales

Diagnóstico de uretritis, cervicitis y vaginitis

Diagnóstico de úlceras genitales y verrugas venéreas

Recolección de muestras genitales

Infecciones óseas y de las articulaciones

Presentación clínica

Diagnóstico de las infecciones óseas y de las articulaciones

Infecciones del sistema nervioso central

Meningitis

Encefalitis y abscesos cerebrales

Diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central

Obtención de muestras

Evaluación de la respuesta inflamatoria y de las técnicas de microscopía

Detección directa de antígenos y de ácidos nucleicos

Diagnóstico serológico

Diagnóstico por cultivo

Heridas, abscesos y celulitis

Presentación clínica

Diagnóstico de infecciones de heridas, abscesos y celulitis

Recolección de muestras

Examen microscópico de las muestras

Cultivos

Infecciones oculares

Presentación clínica

Conjuntivitis

Queratitis

Uveítis y endoftalmitis

Diagnóstico de las infecciones oculares

Recolección de las muestras

Examen microscópico

Cultivos

Infecciones de la sangre

Presentación clínica y patogenia

Bacteriemia y septicemia

Tipos de bacteriemia

Infección intravascular

Bacteriemia y sepsis asociadas con los catéteres

Recolección de hemocultivos

Contaminación con flora de la piel

Cantidad y oportunidad de los cultivos

Medios de cultivo

Sistemas de procesamiento de hemocultivos

Sistemas manuales de hemocultivo

Sistema de hemocultivo por lisis y centrifugación

Sistemas de hemocultivo automatizados e informatizados

Estudios comparativos

Consideraciones especiales

Microorganismos con requerimientos nutricionales especiales y endocarditis

Bacteriemia y sepsis asociadas con los catéteres

Tejidos y biopsias

En este capítulo estudiaremos los pasos necesarios para el diagnóstico de las infecciones. En cada una de las siguientes secciones se presentarán los signos y los síntomas de las infecciones que involucran los principales sistemas de órganos. Se describen los procedimientos para la recolección, el transporte y el procesamiento de las muestras. La información se resume en el cuadro 2-1. En otras palabras, en este capítulo se analizará la fase preanalítica del ciclo diagnóstico. Las fases posteriores se considerarán sólo brevemente, ya que se tratan en los capítulos siguientes.

Infecciones del aparato respiratorio

El aparato respiratorio se divide en las vías respiratorias altas (la nariz, la garganta, la orofaringe y la nasofaringe) y las vías

respiratorias bajas (la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los sacos alveolares de los pulmones). Para este análisis, el oído medio (que se conecta con la parte posterior de la faríngea través de la trompa de Eustaquio), las glándulas salivales (comunicadas con la cavidad bucal por medio de conductos excretores) y los senos paranasales (conectados con la cavidad nasal por medio de conductos de drenaje) se consideran parte de las vías respiratorias altas.

Infecciones de las vías respiratorias altas

FLORA ENDÓGENA

El diagnóstico de las infecciones de las vías respiratorias altas es complicado debido a la presencia de la mayoría de los patógenos en personas sanas sin de síntomas. Incluso *S. pyogenes* suele hallarse en pequeñas cantidades en la garganta de individuos asintomáticos. La principal excepción a esta regla es

Cuadro 2-1 Diagnóstico de infecciones bacterianas en distintas partes del cuerpo

SITIO DE INFECCIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS	MUESTRAS PARA CULTIVO	ESPECIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE ASOCIADAS CON LAS INFECCIONES
Aparato respiratorio	Vías respiratorias altas, senos paranasales: Dolor de cabeza Dolor y enrojecimiento del área malar Rinitis Radiografía: opacidad de los senos paranasales, nivel de líquido o engrosamiento de la membrana	Agudo: Hisopado nasofaríngeo Lavado de los senos paranasales Crónico: Lavado de los senos paranasales Muestra de biopsia quirúrgica	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> , grupo A β -hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Especies de <i>Klebsiella</i> y otras <i>Enterobacteriaceae</i> Especies de <i>Bacteroides</i> y otros anaerobios (senos paranasales)
	Vías respiratorias altas, garganta y faringe: Enrojecimiento y edema de mucosa Exudado amigdalino Formación de pseudomembrana Edema de la úvula Cubierta grisácea de la lengua/"lengua en fresa" Agrandamiento de los ganglios cervicales	Hisopado de la faringe posterior Hisopado de las amígdalas (abscesos) Hisopado nasofaríngeo	<i>Streptococcus</i> , grupo A β -hemolítico <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Bordetella pertussis</i>
	Vías respiratorias bajas, pulmones y bronquios Tos: sanguinolenta o profusa Dolor de pecho Díscos Condensación pulmonar: Estertores y rales Disminución de los sonidos respiratorios Matidez localizada ante la percusión Infiltrados radiográficos Lesiones en la cavidad Empiema	Espato (escasa recuperación) Sangre Secreciones por broncoscopia Aspirado transtraqueal Aspirado o biopsia de pulmón	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> y otras <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> Especies de <i>Legionella</i> Especies de <i>Mycobacterium</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> y otros anaerobios Especies de <i>Bordetella</i>
Oído medio	Supuración serosa o purulenta Dolor profundo en el oído y la mandíbula Dolor de cabeza punzante Eritema y protrusión de la membrana timpánica	Agudo: No cultivar Hisopado nasofaríngeo Aspirado de membrana timpánica Crónico: Drenaje del meato externo	Agudo: <i>Streptococcus pneumoniae</i> y otros estreptococos <i>Haemophilus influenzae</i> Crónico: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Especies de <i>Proteus</i> Bacterias anaerobias
Tubo digestivo	Esófago, estómago y duodeno: Gastritis y enfermedad ulceropéptica	Biopsia gástrica o duodenal	<i>Helicobacter pylori</i>
	Intestino delgado y grueso: Diarrea Díscos Purulenta Mucosa Sanguinolenta Dolor abdominal con cólicos	Muestras de heces Hisopado rectal o moco rectal Hemocultivo (fiebre tifoidea)	<i>Campylobacter jejuni</i> y otras especies de <i>Campylobacter</i> Especies de <i>Salmonella</i> Especies de <i>Shigella</i> <i>Escherichia coli</i> (cepas toxigénicas) <i>Vibrio cholerae</i> y otras especies de <i>Vibrio</i> Especies de <i>Yersinia</i> <i>Clostridium difficile</i> (demostración de la toxina)

(Continúa)

Cuadro 2-1 Diagnóstico de infecciones bacterianas en distintas partes del cuerpo (cont.)

SITIO DE INFECCIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS	MUESTRAS PARA CULTIVO	ESPECIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE ASOCIADAS CON LAS INFECCIONES
Aparato urinario	Infección vesical: Piria Disuria Hematuria Dolor y sensibilidad a la presión: suprapúbica o de abdomen bajo Infección renal: Dolor de espalda Sensibilidad a la compresión del ángulo costovertebral	Orina del chorro medio de la micción Orina obtenida por cateterismo Punción suprapúbica	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> Especies de <i>Klebsiella</i> Especies de <i>Proteus</i> Especies de <i>Enterococcus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>S. saprophyticus</i>
Aparato genital	Hombres: Secreciones uretrales: serosa o purulenta Ardor durante la micción Hematuria terminal	Secreciones uretrales Secreciones prostáticas	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (<i>N. meningitidis</i>) <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Treponema pallidum</i> (sífilis) Especies de <i>Mobiluncus</i> y otros anaerobios <i>Gardnerella vaginalis</i>
	Mujeres: Secreciones vaginales purulentas Ardor durante la micción Dolor abdominal bajo, espasmos y sensibilidad a la presión Chancro mucomembranoso o chancroide	Cuello uterino Recto (hisopado del esfínter anal) Hisopado uretral Examen en campo oscuro	No bacterianas: <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Candida albicans</i> Especies de <i>Mycoplasma</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> Virus del herpes simple
Sistema nervioso central	Dolor de cabeza Dolor de cuello y espalda Tortícolis (rigidez de cuello) Elevación de la pierna recta (en extensión): positiva Signo de Kernig Náuseas y vómitos Estupor a coma Erupción petequial	Líquido cefalorraquídeo Punción subdural Hemocultivo Cultivo faríngeo o de esputo	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> , grupos A y B β -hemolítico (grupo B en lactantes) <i>Enterobacteriaceae</i> : pacientes débiles, lactantes y poscraneotomía <i>Listeria monocytogenes</i>
Ojo	Secreción conjuntival: serosa o purulenta Enrojecimiento conjuntival (hiperemia): ojos rosados Dolor ocular y sensibilidad a la presión	Secreciones purulentas Fondo de saco Ángulo interno del ojo	Especies de <i>Haemophilus</i> Especies de <i>Moraxella</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (informese de inmediato)
Sangre	Picos febriles Escalofríos	Sangre: dos o tres cultivos, repetir según sea necesario	Especies de <i>Streptococcus</i> Grupo A: todas las edades
	Soplo cardíaco (endocarditis) Petequias: piel y mucosas "Hemorragias en astillas" en las uñas Malestar	Cualquier sitio primario sospechoso de infección: Líquido cefalorraquídeo Aparato respiratorio Piel-ombiligo Piel-oido Heridas Aparato urinario	<i>S. viridans</i> (endocarditis) Grupos A, B, D, recién nacidos <i>S. pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Haemophilus influenzae</i>

(Continúa)

Cuadro 2-1 Diagnóstico de infecciones bacterianas en distintas partes del cuerpo (cont.)			
SITIO DE INFECCIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS	MUESTRAS PARA CULTIVO	ESPECIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE ASOCIADAS CON LAS INFECCIONES
			Grupo HACEK (especies de <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> y especies de <i>Kingella</i>) (véase cap. 8) <i>Escherichia coli</i> y otras coliformes <i>Salmonella typhi</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacteroides fragilis</i> y otras bacterias anaerobias
Heridas	Secreciones: serosas o purulentas Abscesos: subcutáneos o submucosos Enrojecimiento y edema Crepitación (formación de gas) Dolor Ulceración o formación de senos	Aspirados de drenaje Hisopado profundo de drenajes purulentos Biopsia de tejido	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Especies de <i>Clostridium</i> , especies de <i>Bacteroides</i> y otras bacterias anaerobias <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Especies de <i>Enterococcus</i>
Huesos y articulaciones	Inflamación articular Enrojecimiento y calor Dolor durante el movimiento Sensibilidad a la presión durante la palpación Radiografía: sinovitis u osteomielitis	Aspirado articular Biopsia sinovial Astilla de huesos o aspirado de médula ósea	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> Especies de <i>Mycobacterium</i>

Neisseria gonorrhoeae, que se encuentra sólo como una infección de transmisión sexual. La flora de la orofaringe de las personas sanas se compone principalmente de *Streptococcus viridans*, estreptococos β -hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, muchas bacterias anaerobias, como especies de *Fusobacterium* y *Actinomyces israelii*, levaduras como *Candida albicans*, adenovirus y virus del herpes simple; todos ellos habitan las vías respiratorias altas sin causar enfermedad. En los individuos enfermos que son internados en un hospital, la flora endógena cambia de grampositiva (predominantemente estreptococos) a gramnegativa (*Enterobacteriaceae* y especies de *Pseudomonas*).¹²⁹ La razón de este cambio parece ser la pérdida de la fibronectina, una proteína que aumenta la unión de las bacterias grampositivas a la superficie de las células epiteliales de la orofaringe.^{176,317}

FARINGITIS

La faringitis aguda es la infección respiratoria alta más común. Por mucho, el patógeno más importante es *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β -hemolítico del grupo A). Las infecciones virales son la otra causa común de faringitis.²⁵
Faringitis estreptocócica. La faringitis por *Streptococcus pyogenes* puede sospecharse clínicamente cuando un paciente presenta inflamación y edema de la mucosa faríngea, dolor de garganta, dificultad para tragar y síntomas secundarios como fie-

bre, cefalea, adenopatías cervicales anteriores dolorosas a la palpación y, en ocasiones, erupción cutánea escarlatiforme. También pueden observarse exudados purulentos en la faringe posterior y las amígdalas. La presentación clínica de la faringitis estreptocócica y la de la no estreptocócica en general se superponen.²⁶ A pesar de que el diagnóstico se ha sustentado casi en forma exclusiva en criterios clínicos, la opinión predominante es que resulta imposible determinar la causa de la enfermedad a partir de estos criterios y, por lo tanto, se requieren pruebas de laboratorio.²⁷

Una membrana firme, fibrinosa y gris ("seudomembrana"), los exudados purulentos provenientes de abscesos o fistulas y las ulceraciones de las mucosas sugieren una enfermedad infecciosa diferente de la faringitis estreptocócica aguda y, en consecuencia, se necesita un enfoque diagnóstico distinto del que se requiere para la enfermedad estreptocócica.

Los estreptococos β -hemolíticos diferentes de los del grupo A (grupos C y G) causan síntomas similares, pero más leves que las cepas del grupo A.²⁸ Éstos no presentan una asociación con la fiebre reumática como secuela no infecciosa. A pesar de que las cepas del grupo A pueden hallarse a veces en pequeñas cantidades en la orofaringe, las cepas colonizantes regulares son las de los grupos C y G. Por lo tanto, el aislamiento de estos microorganismos es más difícil de interpretar. Si se los aísla como un cultivo puro o como la flora predominante, es razonable informar su presencia con una nota que indique su significado clínico y la interpretación.

El estudio de referencia para el diagnóstico de la faringitis estreptocócica es el cultivo bacteriano en agar sangre de carnero. En los laboratorios, los consultorios y las clínicas se utilizan pruebas rápidas para la detección de antígenos de estreptococos del grupo A. La mayoría de los ensayos tienen alta especificidad, pero la sensibilidad no es lo suficientemente buena como para confiar en un resultado negativo.²³ Por consiguiente, se debe realizar un cultivo bacteriano luego de una prueba rápida negativa. La principal ventaja de las pruebas de antígenos es que permiten el tratamiento rápido del paciente y con lo que se reduce el tiempo de la dolencia y el paciente puede retornar antes a la escuela o al trabajo. La frecuencia de las secuelas no infecciosas (fiebre reumática y glomerulonefritis) no es mayor si sólo se utiliza el cultivo convencional para el diagnóstico. Las pruebas rápidas de antígeno agregan costos, muchas de ellas se clasifican como moderadamente complejas (véase cap. 1) e implican una inversión adicional de tiempo y esfuerzo del personal clínico. Existe escaso justificativo para su realización en un laboratorio central, dado que el paciente ya habrá regresado a su casa para el momento en que esté el resultado. Cada médico debe determinar la utilidad de la realización de las pruebas de antígenos.

Difteria. En la actualidad, la difteria es muy poco común en los Estados Unidos.²⁴ Se trata principalmente de una infección de los niños que se presenta como brotes esporádicos, pero los adultos también pueden infectarse, sobre todo en los grupos socioeconómicos más bajos.¹³¹ La gruesa membrana blanco azulado o gris que cubre la faringe posterior, con importante edema de los tejidos subyacentes y adyacentes, casi siempre se difiere con facilidad del intenso eritema de la faringitis estreptocócica aguda. El diagnóstico se realiza por medio del cultivo de la membrana en el medio de Loeffler o el medio selectivo de telurito. Es preferible que las muestras para el cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* se envíen a un laboratorio de referencia o de salud pública (véase cap. 14).

Faringitis por *Arcanobacterium haemolyticum*. Esta bacteria causa faringitis aguda que se asemeja en gran medida a la faringitis estreptocócica; incluso muchos pacientes presentan una erupción escarlátiforme. Suele afectar a los adolescentes y adultos jóvenes, a diferencia del estreptococo β -hemolítico que por lo general causa enfermedad en los niños pequeños.²⁵ *Arcanobacterium* (antes denominada *Corynebacterium*) *haemolyticum* se aísla mejor en agar sangre humana que en agar sangre de carnero, pero puede aislarse en un laboratorio clínico. Si no se realiza una tinción de Gram o una prueba de catalasa puede tomarse como un estreptococo que no pertenece al grupo A (véase cap. 14).

Faringitis gonocócica. La infección de la orofaringe por *Neisseria gonorrhoeae* es casi siempre asintomática, pero se pueden presentar síntomas clínicos y asociarse con la enfermedad diseminada.²⁶ Se debe sospechar en mujeres y varones homosexuales que practican sexo oral. Los médicos deben comunicar al laboratorio esta sospecha para que la muestra se siembre en un medio para el aislamiento de gonococos.

Faringitis viral. La causa viral más común de faringitis es el virus de Epstein-Barr. Luego de una fase prodrómica febril inespecífica tiene lugar una faringitis aguda con amigdalitis, exudados blancos y linfadenopatías cervicales. Pueden observarse petequias en el paladar.²⁷ Posteriormente el diagnóstico se hace más obvio por la presencia de los signos y los síntomas sistémicos de la mononucleosis infecciosa, como alteraciones hematológicas, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía generalizada. Las primeras etapas de la faringitis pueden sugerir enfermedad estreptocócica, pero en los adolescentes y los

adultos jóvenes la infección suele ser sintomática. El diagnóstico es serológico. Se puede observar una enfermedad similar como parte de un síndrome retroviral agudo, causado por el virus de la inmunodeficiencia humana, pero el comienzo es más agudo y no hay exudado. En el síndrome retroviral agudo es común la presencia de una erupción maculopapular, que rara vez aparece en la mononucleosis infecciosa a menos que se administre ampicilina.

El adenovirus causa una faringitis aguda que se asemeja mucho a la faringitis estreptocócica. A menudo se presenta, además, conjuntivitis, lo cual es un indicio de su etiología (fiebre faringoconjuntival). Algunos serotipos de virus Coxsackie A provocan una faringitis aguda con vesículas en la faringe posterior como parte de la enfermedad de mano, pie y boca. Esta infección es común en los niños y se diagnostica con facilidad en forma clínica por la aparición de vesículas cutáneas y mucosas. La faringitis por virus del herpes simple se describió en adultos jóvenes, pero este virus se encuentra en personas asintomáticas, al igual que el adenovirus. En el capítulo 23 se ofrecen más detalles acerca de las infecciones virales.

Otras infecciones que causan faringitis. Se describió a *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* como agentes causales de faringitis, pero provocan más a menudo enfermedad en las vías respiratorias bajas. Las especies de *Candida*, sobre todo *Candida albicans*, produce exudados cremosos constantes cuando infecta la orofaringe, pero no causa una faringitis ostensible. Citomegalovirus puede causar un síndrome de mononucleosis infecciosa y numerosos virus respiratorios pueden producir dolencias en la faringe como parte de una enfermedad respiratoria aguda.

A pesar de que hay cierto desacuerdo en la literatura médica, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* son considerados por la mayoría de los microbiólogos flora colonizante y no como agentes etiológicos de faringitis. Se pueden aislar en un cultivo cuando la causa verdadera de la faringitis es un agente que no se ha buscado, como un virus. Por esta razón, la solicitud de "cultivo completo faríngeo" debe desalentarse. La prueba que se debe solicitar es "cultivo de estreptococos" o "búsqueda de estreptococos".

OTRAS INFECCIONES DE LA CAVIDAD BUCAL DIFERENTES DE LA FARINGITIS

La gingivitis y las caries dentales son causadas por bacterias, pero son atendidas principalmente por los odontólogos y no por los médicos. En la actualidad, las infecciones bacterianas de las cavidades nasal y bucal, diferentes de la faringitis, son poco frecuentes. Debido a la imposibilidad de recolectar una muestra para cultivo de la superficie de estas cavidades sin incluir abundante flora endógena, los cultivos bacterianos de estas lesiones no generan resultados interpretables.

La gingivostomatitis ulcerativa necrosante (infección de Vincent, angina de Vincent o "boca de trinchera") es una infección sinérgica causada por múltiples bacterias anaerobias de la cavidad bucal. Hoy en día, rara vez se la observa y el cultivo no está indicado. Esta enfermedad puede estar acompañada por sepsis e infecciones metastásicas; sin embargo, se deben obtener hemocultivos en los casos en los que se la sospecha. La observación de bacilos fusiformes gramnegativos o espiroquetas en los frotis teñidos con la tinción de Gram, preparados a partir de una lesión de úlcera bucal o gingival, es útil para el diagnóstico presuntivo de angina de Vincent. Los cultivos de la boca y de la cavidad bucal pocas veces son de ayuda debido a la presencia de numerosas bacterias anaerobias comensales.

Las especies de *Capnocytophaga*, bacterias fusiformes que suelen encontrarse en la orofaringe, también fueron asociadas con ulceraciones de la mucosa bucal y con hemocultivos positivos, sobre todo en los pacientes con neutropenia grave.³⁰⁸ Estos microorganismos pueden aislarse utilizando medios selectivos para *Neisseria* debido a su resistencia a vancomicina, colistina y trimetoprima. Mediante la utilización de estos medios selectivos, Rummen y cols.³³⁶ aislaron especies de *Capnocytophaga* en el 96% de los cultivos de orofaringe en comparación con sólo el 6% de los aislamientos obtenidos en las placas de agar chocolate sembradas a la vez.

Si la historia clínica describe una úlcera en la mucosa de la cavidad bucal que existe desde hace mucho tiempo y que no cicatriza, se debe considerar la posibilidad de que se trate de la diseminación cutánea de una enfermedad fúngica sistémica. Se puede solicitar una biopsia de tejido para estudios histológicos y examen directo. Las especies de *Candida*, en especial *C. albicans*, pueden causar manchas blancas en la mucosa bucal o comprometer un área más extensa de la cavidad con la formación de un exudado grueso, de aspecto similar a la cuajada, que se puede diagnosticar por la observación de pseudohifas y blastoconidios en brotación en un frotis del exudado teñido con la tinción de Gram.

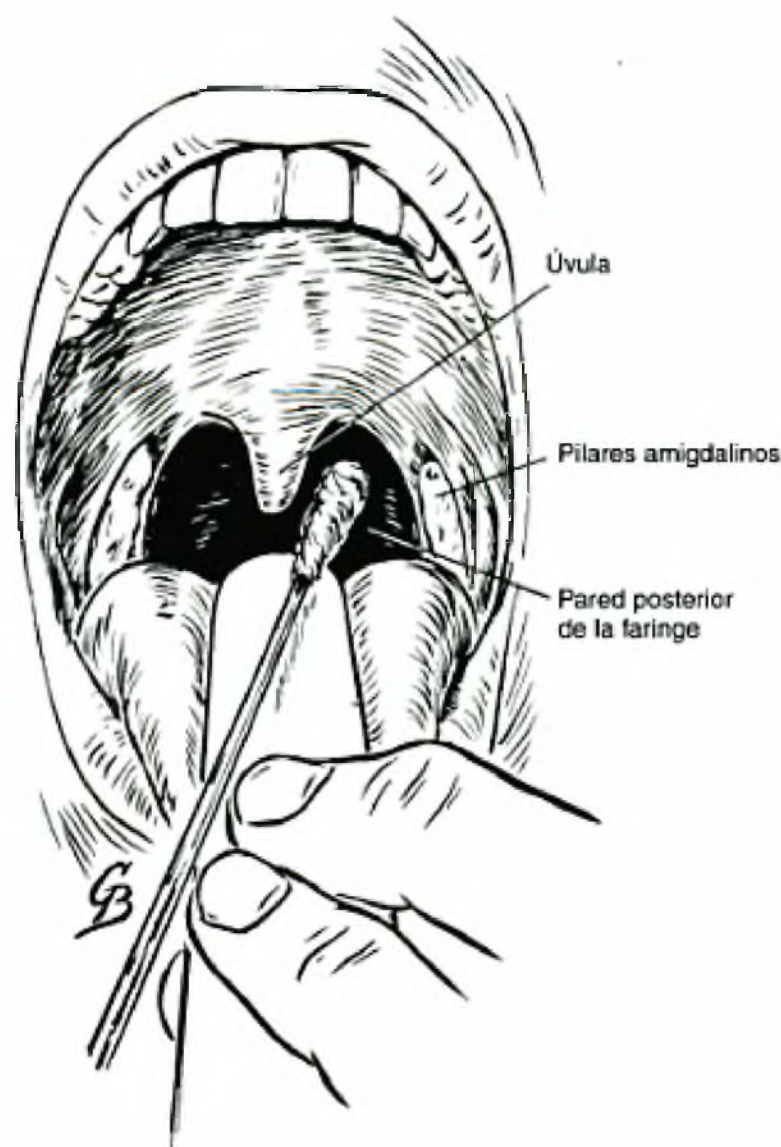


Figura 2-1 Técnica de cultivo faríngeo. Se le indica al paciente que abra bien la boca y que diga "ah". Se deprime en forma delicada la lengua con un bajalengua y se guía un hisopo sobre la lengua hacia la porción posterior de la faringe. Se pasa el hisopo con un movimiento de barrido suave por la mucosa que se encuentra por detrás de la úvula y entre los pilares amigdalinos.

El virus del herpes simple, casi exclusivamente el serotipo 1, puede provocar una gingivostomatitis aguda como parte de la infección primaria. En la mayoría de las personas, la exposición a este virus ocurre durante la niñez o la juventud. Las lesiones vesiculares aparecen en la piel del rostro y en la mucosa de los labios, pero se pueden extender dentro de la parte anterior de la boca. El diagnóstico se debe realizar por la demostración de células infectadas en un frotis teñido (preparación de Tzanck) o por cultivo.

Recolección de cultivos faríngeos. El método correcto de obtener una muestra de hisopado faríngeo se ilustra en la figura 2-1. Se debe enfocar una luz brillante dentro de la cavidad bucal, por encima del hombro de la persona que toma la muestra, de modo de llevar el hisopo hasta la faringe posterior. Se le indica al paciente que incline la cabeza hacia atrás y respire profundo. La lengua se presiona con suavidad con un bajalengua para visualizar las fosas amigdalinas y la faringe posterior. El hisopo se extiende entre los pilares amigdalinos por detrás de la úvula. Se debe tener cuidado de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal o la lengua para reducir al mínimo la contaminación con bacterias comensales. Cuando el paciente pronuncia un "ah" largo facilita la elevación de la úvula y ayuda a evitar las arcadas. Las áreas amigdalinas y la parte posterior de la faringe deben frotarse con firmeza con el hisopo. Se debe también tomar una muestra de todo exudado purulento.

Luego de la recolección, el hisopo debe colocarse de inmediato dentro de un tubo estéril o en otro recipiente adecuado para transportarlo al laboratorio. Si sólo se desea el aislamiento de estreptococos del grupo A β -hemolíticos (es decir "prueba de estreptococos"), se puede dejar que los hisopos se sequen durante el transporte sin que se comprometa el aislamiento de los microorganismos viables. Algunos laboratorios de referencia recomiendan colocar las puntas de los hisopos en un desecante, por ejemplo, un gel de sílice, para evitar el crecimiento de flora comensal y mejorar el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*. Los hisopos para aislamientos virales se deben guardar en un medio de transporte especial (véase cap. 23), aunque algunos microbiólogos observaron que los colocados en medios de transporte diseñados para bacterias son aceptables para el cultivo viral.²⁶⁴

INFECCIONES DE LA NASOFARINGE Y CULTIVOS NASOFARÍNGEOS

La infección más frecuente de la nasofaringe es el "resfriado común", causado casi siempre por uno de los más de 100 serotipos de rinovirus. Esta infección rara vez pone en riesgo la vida, aunque ahora se reconoce que las vías respiratorias bajas e incluso otros sistemas pueden afectarse.⁷⁵ Sin embargo, el resfriado común es la principal causa de morbilidad y dada la gran cantidad de días laborales que se pierde en esta afección se convierte en un problema económico relevante. El hecho de que muy pocos de nosotros hemos tenido tuberculosis o fiebre hemorrágica, pero de que todos hemos sufrido un resfriado común ilustra la ubicuidad de esta infección. El síntoma principal es la rinitis (goteo de la nariz). No se presenta fiebre como parte de la infección. Los estudios de laboratorio no son necesarios porque la enfermedad es autolimitada y no se dispone aún de un tratamiento específico.

La obtención de muestras nasofaríngeas es de muy poco valor práctico, excepto en algunas situaciones definidas. Los hisopados nasofaríngeos son de valor limitado para establecer el diagnóstico de otitis media aguda³⁴⁸ o sinusitis bacteriana,⁶⁵ pero son la muestra de elección para el aislamiento de *Bordetella pertussis*, el agente etiológico de la tos ferina.¹²⁰ Los

hisopados y aspirados nasofaríngeos son igualmente eficaces para el diagnóstico de infecciones respiratorias virales,⁹¹ aunque algunos virólogos prefieren los aspirados para el aislamiento del virus sincitial respiratorio.

Las muestras nasofaríngeas se obtienen por visualización directa con iluminación frontal. Con el pulgar de una mano se levanta con suavidad la punta de la nariz. Se humedece con agua o solución salina estéril la punta de un hisopo nasofaríngeo pequeño de alambre flexible y se introduce en forma suave en una de las narinas. Se guía el hisopo hacia atrás y hacia arriba a lo largo del tabique nasal hasta sentir una clara resistencia que indica que se llegó a la pared posterior de la faringe. Se retira con suavidad el hisopo. Si durante la introducción se encuentra una resistencia indebida, se debe intentar con la narina opuesta. Se deja el hisopo en contacto con la pared posterior de la nasofaringe durante 15–30 segundos si el paciente puede tolerar la molestia.

OTITIS MEDIA Y SINUSITIS

El oído medio y los senos paranasales se comunican con la vía aérea superior por medio de conductos. Las infecciones, principalmente causadas por virus y bacterias, se producen cuando los patógenos que se encuentran en la nariz y la garganta acceden a los oídos o los senos que suelen ser estériles.^{95,108,204} Los virus respiratorios y ciertas bacterias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*, causan infecciones agudas.¹¹⁴ Cuando la infección se convierte en crónica, los bacilos gramnegativos aerobios facultativos, las bacterias anaerobias y los hongos adquieren un papel relevante y la infección es polimicrobiana.^{60,95} Es casi imposible obtener una muestra que pueda interpretarse de manera adecuada mediante el muestreo de las vías aéreas.

La toma de una muestra para cultivo de estas estructuras es dificultosa. Por fortuna, los patógenos en las infecciones agudas se pueden predecir; por lo tanto, es posible iniciar una terapia con antibióticos sin necesidad de procedimientos invasivos. En los procesos crónicos, se requieren procedimientos invasivos o abordajes quirúrgicos.

EPIGLOTTITIS

La epiglottitis bacteriana aguda, principalmente causada por *Haemophilus influenzae* tipo B,¹⁸⁰ es una infección potencialmente mortal, pero que ha sido casi erradicada con la vacunación. El edema de la epiglottitis puede obstruir la vía respiratoria a menos que se realice una traqueostomía. La mayoría de los historiadores creen que George Washington murió de una epiglottitis aguda, que fue tratada mediante el sangrado repetitivo.¹⁸¹ El más joven de sus tres médicos quería probar la técnica de la traqueostomía recién desarrollada, pero fue refrenado en sus intenciones por sus superiores “más sabios”. El diagnóstico de epiglottitis se debe hacer por sus manifestaciones clínicas, ya que si se toca la epiglottis para obtener una muestra puede agravarse la obstrucción. Cuando *Haemophilus influenzae* es el agente etiológico de la epiglottitis, los hemocultivos suelen ser positivos.

LARINGITIS

La laringitis aguda y, más a menudo, la laringotraqueobronquitis (*croup*) son causadas principalmente por los virus respiratorios. Otra causa común es *Mycoplasma pneumoniae*.⁶⁵

OTRAS INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS

Las infecciones de los tejidos blandos de la cabeza y el cuello suelen originarse en la cavidad bucal y son causadas por microorganismos que normalmente residen allí. Los abscesos y las infecciones del espacio retrofaríngeo (angina) son complicaciones de las amigdalitis y faringitis estreptocócicas. Esto puede dar como resultado la compresión de la vía aérea, lo cual representa una emergencia médica.¹⁰² Las muestras de abscesos periamigdalinos se obtienen por aspiración percutánea para evitar la contaminación con la flora orofaríngea.

De manera similar, las infecciones dentales se pueden extender a los tejidos blandos adyacentes, lo cual origina un absceso o dentro del hueso, osteomielitis. *Actinomyces israelii*, un componente de la flora de la orofaringe de algunas personas, puede causar infecciones crónicas del cuello que supuran (actinomicosis).^{98,101} Se debe recolectar material del seno que está supurando por aspiración o por legajo; un hisopo no es adecuado para obtener “gránulos de azufre” (concreciones) en los que se concentran las bacterias. En forma alternativa, se puede colocar una gasa sobre el seno que supura para recolectar los gránulos que quedan así atrapados en la trama de la tela. El material de drenaje puede colocarse en una placa de Petri, diluirse con agua y examinarse para la búsqueda de las concreciones. Si los gránulos están aplastados, la observación de bacilos grampositivos ramificados establece el diagnóstico. El gránulo aplastado puede luego cultivarse en condiciones anaerobias para determinar la causa específica.

Históricamente, las micobacterias también causan linfadenopatías cervicales y los ganglios a menudo drenan hacia la superficie de la piel (escrófula). Estas linfadenopatías son causadas por lo general por *Mycobacterium bovis*, que ingresa en el organismo a través de la orofaringe luego de la ingesta de leche contaminada. La pasteurización erradicó esa infección. La linfadenopatía tuberculosa suele originarse luego de una enfermedad pulmonar primaria. La infección por micobacterias de los ganglios cervicales actual más común es causada por el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y afecta principalmente a los niños pequeños.²¹ A diferencia de otras infecciones por micobacterias que requieren tratamiento antibiótico, la infección por MAC en los niños puede tratarse en forma eficaz mediante la escisión quirúrgica de los ganglios afectados.

En el pasado, la infección más frecuente de las glándulas salivales era la parotiditis, pero fue erradicada gracias a la eficacia de la inmunización. Las infecciones bacterianas son poco comunes.

Infecciones de las vías respiratorias bajas

Las vías respiratorias bajas están formadas por todas las estructuras que se encuentran por debajo de la laringe: tráquea (traqueítis), bronquios y bronquiólos (bronquitis y bronquiolitis) y los espacios aéreos distales (neumonía).

TRAQUEOBRONQUITIS

Las infecciones agudas pueden ser causadas por bacterias o por virus. En los niños predominan las infecciones virales y por micoplasma.⁶⁵ Los síntomas son tos, fiebre y producción de esputo en grados variables. *Bordetella pertussis* o *B. parapertussis* causan una enfermedad diferente caracterizada por un estridor inspiratorio; *B. parapertussis* suele producir una enfermedad más leve.³¹ Sin embargo, el estridor característico de la tos ferina no se presenta en las fases iniciales de la enfermedad. Los episodios de apnea (ausencia de respiración) son comunes,

pero no letales. El adenovirus puede causar un síndrome similar aunque su papel etiológico es controvertido. *Chlamydia pneumoniae*, un patógeno reconocido más recientemente, puede causar bronquitis aguda y neumonía.

La traqueobronquitis crónica es similar en los síntomas a la enfermedad aguda, pero es más prolongada y menos intensa. Las bacterias son la causa más frecuente, en especial *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* no encapsulados y *Moraxella catarrhalis*.

La enfermedad aguda prolongada puede cursar solapada con bronquitis crónica. *Mycoplasma pneumoniae* fue casi siempre asociado con los crónica, pero hoy se sabe que *Bordetella pertussis* puede causar enfermedad crónica en los niños de mayor edad, adolescentes y adultos²⁵² y *Chlamydia pneumoniae* puede producir una enfermedad crónica.¹⁰⁸

Las infecciones virales no suelen diagnosticarse con el apoyo del laboratorio a menos que la enfermedad sea lo suficientemente grave como para requerir hospitalización. La tos ferina y la infección por *Chlamydia* se diagnostican por cultivo o, cada vez más, por métodos moleculares. A menudo, se evalúa la bronquitis crónica a través del cultivo de esputo si la enfermedad es lo suficientemente grave. Se deben hacer solicitudes especiales si se consideran *Bordetella*, *Mycoplasma* o *Chlamydia*.

BRONQUIOLITIS

Las infecciones de las vías aéreas más pequeñas próximas a los conductos alveolares son casi siempre producidas por virus y por *Mycoplasma pneumoniae*.^{113,325} La bronquiolitis afecta principalmente a los lactantes y a los niños pequeños y suele ocurrir durante el invierno. Después de un período prodrómico de infecciones respiratorias, principalmente rinitis, los síntomas predominantes son la tos, el jadeo y el estridor (por dificultad respiratoria). El diagnóstico diferencial incluye el asma y la obstrucción por otras causas, como cuerpos extraños. La enfermedad es autolimitada y requiere el diagnóstico de laboratorio sólo si el paciente está lo suficientemente enfermo como para necesitar hospitalización.

NEUMONÍA

La neumonía, la infección más seria de las vías respiratorias, se localiza en los espacios aéreos distales, desde los conductos alveolares hasta los sacos alveolares. Los síntomas son fiebre, tos, producción de esputo en grados variables, disnea (falta de aire, dificultad respiratoria) y dolor en el pecho. Este dolor puede ser difuso, vago y constante o localizado e intermitente, que se acentúa con la respiración profunda si hay pleuritis. La disnea suele indicar que los bronquiolos terminales y los alvéolos están afectados en un proceso neumónico más extenso. Los signos físicos que señalan la afección de las vías respiratorias bajas son estertores y ronquidos, alteración del murmullo respiratorio y matidez localizada a la percusión en los casos de neumonía lobular.⁶⁹

La neumonía ha sido dividida en varios tipos: neumonía atípica, neumonía aguda y neumonía crónica. Además, la neumonía por aspiración, los abscesos de pulmón y el empiema requieren una consideración especial. Por último, desde el punto de vista de la atención del paciente, la neumonía se puede clasificar como neumonía del paciente ambulatorio ("paciente que deambula") y neumonía que requiere hospitalización; neumonía adquirida en la comunidad y neumonía adquirida en el nosocomio; neumonía en pacientes inmunosu-

primidos; neumonía en pacientes con fibrosis quística y neumonía de los extremos de la vida. La diferenciación entre la neumonía lobular, causada en general por *Streptococcus pneumoniae* (neumococos) y *Klebsiella pneumoniae* serotipo 1 (neumonía de Friedländer) y la neumonía multifocal, causada por otras bacterias, es de poca utilidad clínica dada la gran superposición entre ambos patrones.

El tipo de neumonía es el resultado de la combinación de factores microbianos y del estado de los mecanismos de defensa del huésped. La mayoría de las neumonías surgen como resultado de la inhalación del patógeno respiratorio o de la aspiración (casi siempre microscópica y subclínica) de las secreciones de las vías respiratorias altas. Así como cambia la flora que coloniza la orofaringe, también lo hace la naturaleza de los microorganismos que infectan el pulmón.

Neumonía atípica. La neumonía atípica se definió en la década de 1930 como una infección de las vías respiratorias bajas que no se asemejaba a las lesiones conocidas clásicas. La principal diferencia es que en la neumonía atípica la producción de esputo es mínima. La infección es a menudo más leve que en la neumonía clásica, aunque esto no siempre es así. Los principales patógenos causales de la neumonía atípica son *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y las especies de *Legionella*.

Neumonía aguda. La neumonía aguda del paciente que no está internado (neumonía adquirida en la comunidad) es una combinación entre la neumonía atípica y la clásica causada por las bacterias de la orofaringe. El patógeno "clásico" más importante sigue siendo el neumococo; otras bacterias son *Haemophilus influenzae* (en la actualidad predominantemente por cepas no tipificables) y *Moraxella catarrhalis*.^{11,171,185}

La neumonía viral es poco común en los adultos inmunocompetentes. Se puede presentar en un pequeño porcentaje de adultos con gripe. En esta situación, la infección bacteriana secundaria (superinfección) es la principal amenaza. En los niños pequeños, la neumonía viral aguda es de mayor consideración, dado que en ellos se puede superponer con la bronquiolitis causada por el virus sincitial respiratorio y el virus parainfluenza tipo 3. La causa más común de neumonía viral en los pacientes inmunosuprimidos es el citomegalovirus.

La neumonía aguda intrahospitalaria suele ser causada por *Enterobacteriaceae*, especies de *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.³⁶ Los cambios en los agentes etiológicos reflejan las modificaciones en la naturaleza de la flora que coloniza las vías respiratorias altas (véase cap. 1).

Neumonía por aspiración. A pesar de que la mayoría de las neumonías son causadas por la aspiración del contenido de la orofaringe, la aspiración masiva origina un cuadro distinto de la neumonía focal y afecta diferentes partes del pulmón según el paciente esté de pie o acostado (lóbulo inferior y segmento superior del lóbulo superior). Los microorganismos que infectan al paciente no hospitalizado son una mezcla de bacterias aerobias (principalmente grampositivas) y anaerobias.³ En el paciente hospitalizado, la neumonía por aspiración se correlaciona con la colonización de las vías aéreas superiores por bacterias gramnegativas.

NEUMONÍA CRÓNICA

Como su nombre lo indica, el curso de la neumonía crónica es prolongado. Los síntomas son menos alarmantes que los de la neumonía aguda. Como resultado, el diagnóstico puede demorarse semanas o meses, debido a la presencia de síntomas y signos no específicos, como fiebre leve, malestar ("sentirse

enfermo") y pérdida de peso que pueden ser las únicas manifestaciones de la infección. Los agentes etiológicos de las neumonías crónicas son las micobacterias y los hongos, pero las infecciones bacterianas subyacentes también son importantes. Las especies de *Candida* no se encuentran entre la lista de los patógenos pulmonares, excepto como parte de una candidiasis diseminada en los pacientes inmunosuprimidos.

Abscesos pulmonares. El absceso pulmonar, muy relacionado con la neumonía por aspiración, a veces es denominado absceso gangrenoso de pulmón debido al olor fecaloide de las bacterias anaerobias que lo infectan.⁶⁰ La formación del absceso se encuentra también en relación con los factores de virulencia de los gérmenes. *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y las especies de *Pseudomonas* causan a menudo lesiones destructivas. Es característica la invasión de los vasos sanguíneos por ciertos hongos, principalmente especies de *Aspergillus* y los cigomicetos. Si se produce una trombosis puede interrumpirse la oxigenación de los tejidos y sobrevenir muerte, en un proceso que se denomina infarto. *Pseudomonas aeruginosa* también puede causar vasculitis. Cuando un agente infeccioso y la trombosis están presentes en forma simultánea, el proceso se denomina infarto séptico y es muy destructivo. La trombosis puede ocurrir in situ o puede ser el resultado de un coágulo que viaja a través del torrente sanguíneo hacia el pulmón (embolia).

Los granulomas son otro tipo de lesión destructiva (véase cap. 1), en general producidos por micobacterias, en especial *Mycobacterium tuberculosis* y por hongos dismórficos, en particular *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis*.

EMPIEMA

La inflamación de la pleura (la membrana mesotelial que recubre el pulmón y la pared interna del tórax) es común en la neumonía (pleuresía) y puede producir un exudado de líquido (derrame pleural).² Si el derrame pleural se infecta, el pus viscoso da como resultado el empiema. Las causas son las mismas que las de la neumonía bacteriana. Su curación puede obliterar la cavidad pleural.

NEUMONÍA EN POBLACIONES ESPECIALES

La neumonía en las personas mayores es de mayor riesgo que en los adultos jóvenes, pero la lista de patógenos asociados es similar, con *S. pneumoniae* como el patógeno más frecuente.^{162,201} Hoy se reconoce que ciertos patógenos, como el virus sincitial respiratorio, que se creía que eran agentes etiológicos de la enfermedad en los niños, también infectan a los adultos y a las personas mayores.

Los pacientes inmunosuprimidos están expuestos al riesgo de sufrir infecciones por muchos patógenos que no suelen causar enfermedades en las personas inmunocompetentes. Entre estos patógenos oportunistas se encuentran los parásitos, como *Toxoplasma gondii*; virus, incluidos el citomegalovirus; hongos como las especies de *Aspergillus*, cigomicetos, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis jiroveci* (carinii) y micobacterias, como el complejo *Mycobacterium avium*.²³³

Los pacientes con fibrosis quística son una categoría especial de enfermos.⁹³ En el curso de su enfermedad estos pacientes se infectan con una serie de patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en la fibrosis quística presentan un carácter mucoso característico que en otros pacientes se observa con mucho menor frecuencia. Más recien-

temente, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ambas consideradas antes especies de *Pseudomonas*) y las especies de *Alcaligenes* se han convertido en la principal preocupación en la fibrosis quística porque causan infecciones difíciles de tratar y los patógenos se diseminan con facilidad de una persona a otra.

La enfermedad broncopulmonar alérgica es causada muy a menudo por *Aspergillus fumigatus*.⁹⁸ Este patógeno versátil, aunque oportunista, puede producir una enfermedad invasiva en los pacientes inmunosuprimidos, micetomas (bolas fúngicas) en cavidades preexistentes, así como una reacción inmunitaria en individuos con predisposición atópica (alérgica).^{90,91} En las aspergilosis alérgicas, las hifas se encuentran en los espacios aéreos donde causan una reacción inflamatoria pero no invaden los tejidos.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS BAJAS

Espuito. El esputo expectorado representa la muestra más simple y más económica para el diagnóstico de las infecciones de las vías respiratorias bajas. La utilidad de esta muestra es tema de considerable debate dada la dificultad de algunos pacientes para movilizar las secreciones y la frecuencia con la cual la muestra se contamina con la flora de la orofaringe cuando pasa a través de la boca.²²⁵ Sin embargo, cuando la muestra se recolecta en forma cuidadosa puede proporcionar información útil para el tratamiento inicial de la neumonía adquirida en la comunidad.²²⁶

Se debe instruir al paciente acerca de la recolección adecuada de la muestra de esputo, en vez de saliva. Si los pacientes se cepillan los dientes y hacen gárgaras con agua justo antes de obtener la muestra se reduce el número de bacterias contaminantes de la orofaringe. Spada y cols.²⁰⁴ demostraron una disminución de 1 log en la concentración promedio de bacterias contaminantes de $3,6 \pm 7,5 \times 10^6$ a $3,7 \pm 7,2 \times 10^7$ en muestras de esputo de pacientes que fueron obtenidas inmediatamente después de realizar un simple lavado bucal. Se debe evitar la realización de lavados bucales o gárgaras con productos que puedan contener sustancias antibacterianas. Una vez recolectada la muestra, debe enviarse enseguida al laboratorio en vez de dejarla junto a la cama. Es preferible obtener muestras de esputo temprano por la mañana porque contienen secreciones que se juntaron durante la noche y en las cuales es más probable que se concentren las bacterias patógenas. Se debe desaconsejar la recolección de muestras durante 24 horas debido a que no sólo hay mayor probabilidad de contaminación, sino que, además, las bacterias patógenas que pueden estar en alta concentración en una muestra pueden diluirse con el agregado de las muestras siguientes más acuosas. Cuando la producción del esputo es escasa, puede ser eficaz la inducción a través de la nebulización con solución salina para producir una muestra más representativa de las vías respiratorias bajas. Debe evitarse el uso de "solución salina para inyecciones" ya que muchas preparaciones contienen sustancias antibacterianas.²²⁷

Para la recolección de esputo existen en el mercado dispositivos especiales que comercializan las compañías que proveen insumos para laboratorios o se puede utilizar un frasco de boca ancha estéril con una tapa de rosca ajustada. Para evitar la contaminación desde el exterior del recipiente, se le debe indicar al paciente que presione el borde por debajo del labio inferior para recolectar toda la muestra expectorada.¹

Aspiración endotraqueal. Se puede obtener una muestra introduciendo un catéter a través de la laringe dentro de la tráquea. Si

el tubo endotraqueal está en su lugar o si existe una traqueotomía, la aspiración de las secreciones traqueales es simple. A menudo se presume que la aspiración endotraqueal evita algunos de los problemas de contaminación del esputo expectorado. De hecho, la intubación introduce la posibilidad de contaminación ya que las secreciones bucales pueden escurrirse hacia abajo por el tubo endotraqueal. Por lo tanto, estas muestras deben interpretarse con las mismas consideraciones que se tienen en cuenta para el esputo expectorado. Se ha sugerido que los cultivos cuantitativos de los aspirados traqueales pueden proporcionar una mejor información (véase más adelante la explicación sobre el lavado broncoalveolar).²² La técnica cuantitativa incluye la realización de una dilución del esputo que ya ha sido licuado enzimáticamente antes de su siembra sobre una placa de agar. Un enfoque semicuantitativo más simple, en el cual el esputo se lava dos veces con solución salina y se siembra en estría sobre el agar de manera usual (véase cap. 1) se correlaciona muy bien con la técnica cuantitativa. Esta técnica no ha sido adoptada ampliamente, pero la mayoría de los laboratorios la utilizan (aunque pocos realizan los pasos de lavado). **Aspiración translaríngea (transtraqueal).** La aspiración translaríngea es una técnica invasiva que se introdujo para evitar los problemas de contaminación. Las dificultades técnicas en la realización adecuada del procedimiento y sus complicaciones han reducido la frecuencia con la cual se lo aplica.

Broncoscopia rígida. Con el broncoscopio rígido se pueden tomar muestras sólo de las vías aéreas centrales. A pesar de que es adecuado para los cultivos de micobacterias, no es apropiado para los microorganismos que colonizan la orofaringe e infectan las vías respiratorias bajas. Hoy en día rara vez se utiliza.

Broncoscopia flexible. La broncoscopia con fibra óptica es una técnica utilizada con frecuencia para la obtención de biopsias, lavados y cepillados transbronquiales, sobre todo en pacientes con abscesos de pulmón o sospecha de otras infecciones pulmonares profundas. La técnica de cepillado bronquial utiliza un catéter doble telescópico recubierto con polietilenglicol en el extremo distal para la protección de un pequeño cepillo bronquial. Esta técnica se recomienda para el aislamiento óptimo de bacterias aerobias y anaerobias facultativas y estrictas, desde las lesiones pulmonares profundas.¹⁰ Se pueden obtener distintas muestras de las lesiones focales luego de la localización fluoroscópica de la punta del broncoscopio. Las muestras que no se pueden cultivar en forma inmediata deben colocarse en un medio de transporte y mantenimiento para su envío al laboratorio. El éxito de este procedimiento depende de lo siguiente: 1) obtener suficiente material de cepillado desde los bronquiolos distales y los alvéolos para realizar varios frotis, 2) preparar un juego completo de tinciones especiales y múltiples cultivos y 3) buscar más de un tipo de microorganismo.

Lavado broncoalveolar. El lavado broncoalveolar involucra la inyección de 30 a 50 mL de solución fisiológica a través del broncoscopio de fibra óptica que se introdujo en las ramificaciones bronquiolares periféricas. La solución salina luego se aspira y se envía para realizar los frotis y los cultivos. Los cultivos semicuantitativos o cuantitativos de las secreciones respiratorias obtenidas por medio de las técnicas de cepillado bronquial protegido y lavado alveolar se recomiendan para el diagnóstico de neumonía en pacientes intubados que se encuentran con respiración asistida.³⁰ Los microorganismos presentes en concentraciones mayores de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL y las muestras que presentan bacterias intracelulares en más del 25% de las células inflamatorias son

indicadores de neumonía que requiere tratamiento específico. Lamentablemente, la experiencia con la microbiología cuantitativa de las secreciones respiratorias ha sido bastante variable.²⁸⁰ Un grupo de investigadores encontró alta especificidad si se utilizaba un valor de corte de 10^3 UFC/mL para los líquidos obtenidos por medio de lavado broncoalveolar, pero con una sensibilidad del 33%, debido sobre todo a la implementación previa de una terapia con antibióticos.²⁸⁹ Estos autores concluyeron que con esta concentración bacteriana la neumonía puede diagnosticarse con facilidad, pero un resultado negativo no excluye el diagnóstico de neumonía.

Punción y biopsia pulmonares. La aspiración percutánea o la biopsia por aguja pueden realizarse a ciegas o por medio de una guía fluoroscópica, particularmente si se presenta una lesión localizada.²⁹⁰ La biopsia de pulmón a cielo abierto es el procedimiento más invasivo y se reserva sólo para situaciones en las cuales han fracasado las otras medidas.

Cuando los cultivos son negativos o no aclaran el diagnóstico pueden ser útiles ciertos procedimientos adicionales para determinar la etiología de las infecciones respiratorias. Los hemocultivos se deben obtener siempre durante la fase aguda de la neumonía. Se puede aislar *Streptococcus pneumoniae* a partir de la sangre en 25-30% de los pacientes con neumonía neumocócica, a menudo cuando los cultivos de esputo son negativos.¹⁹⁴

Si no se produce esputo es posible detectar antígenos bacterianos de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de orina.^{20,195} El antígeno puede excretarse durante días, semanas o incluso meses; por lo tanto, un ensayo positivo no documenta en absoluto una infección reciente. Se requiere una correlación cuidadosa con la información clínica.

PRUEBAS DE LABORATORIO Y DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍA

El diagnóstico etiológico de la neumonía es una tarea conjunta que requiere la participación del microbiólogo, el radiólogo y el médico clínico. El diagnóstico de neumonía es clínico y se realiza utilizando la historia clínica, el estetoscopio y las radiografías de tórax. Con algunas excepciones importantes, como el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, la neumonía no se diagnostica en el laboratorio de microbiología. Los médicos que envían una muestra de esputo al laboratorio sin tener el diagnóstico clínico en su mano están solicitando una información confusa o que incluso los desorientará. Una vez establecido el diagnóstico de enfermedad, el laboratorio puede ayudar a definir la etiología y a seleccionar el tratamiento adecuado.⁴²

Las muestras de esputo deben procesarse lo antes posible después de su recolección. Se ha encontrado una disminución considerable en el aislamiento de microorganismos a partir de muestras de esputo que se conservaron refrigeradas durante 20 horas,³¹³ a pesar de que se afecta el número o la calidad de las células epiteliales y de los neutrófilos segmentados. También se halló una disminución en el número de bacilos tuberculosos viables que se pueden aislar de una muestra de esputo después de conservarla a temperatura ambiente durante varios días,²⁹⁸ aunque la concentración de los bacilos ácido-alcohol resistentes que se observó luego de la tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes no se redujo hasta después de los 20 días.

La calidad de la muestra de esputo debe determinarse utilizando uno de los sistemas de graduación que se describieron en el capítulo 1. Existe controversia acerca del valor de informar una identificación bacteriana presuntiva sobre la base de los

criterios morfológicos. Barlett y cols.¹³ sugirieron por primera vez que las categorías de bacterias podían definirse con exactitud por medio de la morfología que se observa en los frotis de esputos teñidos con la tinción de Gram. Por ejemplo, se realiza la identificación morfológica de los estafilococos, "bacteroides-haemophilus", y de bacterias de morfología mixta con un 75% de exactitud si las muestras de esputo son de alta calidad. Se ha demostrado³⁸ que la enumeración semicuantitativa de las bacterias en una muestra de esputo teñida con tinción de Gram no puede reproducirse de un técnico a otro (o incluso con el mismo técnico que examine el frotis en ocasiones repetidas) y que estas estimaciones deben ser informadas. Una explicación posible para esta observación es la variabilidad que se encuentra entre las distintas zonas de los frotis. Por otra parte, un informe más optimista³⁹ indica que las tinciones de Gram de las muestras de esputo de alta calidad, realizadas en una población seleccionada de adultos con neumonía adquirida en la comunidad, le pueden proporcionar al médico suficiente información para comenzar una terapia empírica con antibióticos. Cualquiera que sea el caso, se requiere una considerable experiencia de parte del observador y una correlación regular de los resultados de laboratorio con los indicadores clínicos antes de otorgar valor a la interpretación de la tinción de Gram de una muestra de esputo.

Una herramienta útil para el aseguramiento de la calidad es la comparación de las tinciones de Gram y los cultivos. Si los microorganismos que se observan en el frotis no crecen en el cultivo o si los que crecen en cantidades moderadas o altas no se observan en el frotis, éste debe ser revisado. La tinción de Gram es relativamente poco sensible (deben estar presentes unas 10^5 UFC/mL para poder visualizarlas); por lo tanto, pequeñas cantidades de bacterias en el cultivo pueden no ser visibles en el frotis. Si el frotis no fue interpretado de manera correcta, se lo debe revisar nuevamente junto al observador, lo cual sirve como aprendizaje. Si la interpretación del frotis fue correcta, puede ser un indicio de que se deben considerar otras estrategias además del cultivo.

El sistema de graduación para las muestras de esputos no se aplica a las infecciones de las vías respiratorias bajas causadas por especies de *Legionella*, micobacterias, hongos y virus. Estas infecciones no siempre generan respuestas purulentas con células inflamatorias.

La determinación semicuantitativa de los bacilos tuberculosos que se observan en los frotis teñidos con la tinción ácido-alcohol resistente en los exámenes secuenciales de esputo es útil para determinar la eficacia del tratamiento con antituberculosos. Una disminución de 4+ a 1+ o escasos o incluso ningún bacilo luego de 4 a 6 semanas de tratamiento indica una buena respuesta al fármaco y puede utilizarse para determinar el momento seguro de enviar al paciente a su hogar.

La importancia de los microorganismos que se aíslan de muestras respiratorias debe evaluarse siempre a la luz de la información clínica. La interpretación de los cultivos de esputo es muy difícil, ya que no son específicos ni sensibles en la evaluación de las infecciones de las vías respiratorias bajas. Lentino y Lucks¹⁵⁶ han puesto de manifiesto, de manera sucinta, este problema basados en su experiencia a partir de un estudio de 249 pacientes con sospecha de neumonía (recuadro 2-1).

También puede ser difícil establecer la etiología bacteriana de la bronquitis aguda o crónica, puesto que muchas especies bacterianas pueden hallarse como flora normal o comensales de las vías respiratorias (cuadro 2-2). El aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* como

Recuadro 2-1 Interpretación del cultivo de esputo: observaciones de Lentino y Lucks¹⁵⁶

1. Aplicando el sistema de clasificación de la calidad del esputo de Barlett y de Murria y Washington como se describió en el capítulo 1, el 48% de los cultivos de esputo recibidos en sus laboratorios no pasaron la escala de calidad y reflejaron principalmente a las secreciones bucales.
2. El 26,5% de las muestras de esputo purulento fueron de pacientes sin evidencias radiológicas o clínicas de neumonía.
3. El 40% de las muestras de esputo obtenidas de pacientes con evidencia de neumonía no fueron de expectoración profunda y nuevamente reflejaron más las secreciones bucales.
4. Sólo el 10,8% de los pacientes que produjeron un esputo no purulento tenían neumonía.
5. Sólo el 36,8% de los pacientes con neumonía produjeron esputo purulento.

microorganismos predominantes de las secreciones respiratorias, sobre todo cuando los frotis teñidos con Gram apoyan su presencia o los microorganismos también se aíslan a partir de los hemocultivos simultáneos, corrobora su papel en la aparición de la neumonía aguda.^{69,332} Para aumentar el rendimiento en la detección de ciertos microorganismos, en particular *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*), puede ser necesaria la recolección de muestras de esputo inducido, luego de la nebulización con solución salina.

Si se sospecha de infecciones pulmonares causadas por micobacterias, hongos, parásitos humanos o virus, se deben utilizar técnicas especiales para aislar los agentes etiológicos, como se describe en los capítulos dedicados a cada uno de estos grupos de microorganismos. A pesar de que el aislamiento de ciertos hongos, como los hongos dimorfos patógenos, suele indicar enfermedad, otros hongos, como las especies de *Aspergillus*, deben aislarse en forma repetida a partir de muestras sucesivas antes de poder confirmar el diagnóstico. La presencia de hifas de hongos es menos probable que represente una contaminación ambiental. El diagnóstico de neumonía viral se realizará con mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos y en niños que se encuentran lo suficientemente enfermos como para requerir internación.

Los hemocultivos, la detección de antígenos urinarios y las técnicas cuantitativas de cultivo ya fueron explicados. Hoy se cuenta con técnicas moleculares modernas para el diagnóstico rápido viral y de las infecciones por micobacterias; es poco probable que en un futuro se amplíe el número de situaciones en las cuales se aplican estos enfoques. Como estrategia útil se ha propuesto la medición de un receptor desencadenante soluble que se expresa en las células mieloides,³⁴ pero los resultados promisorios requieren confirmación.

Infecciones del tubo digestivo

Infecciones Intestinales

SÍNTOMAS CLÍNICOS

El síntoma más común que se presenta en las infecciones del tubo digestivo bajo es la diarrea.³³⁷ A pesar de que ésta es difícil de definir en forma cuantitativa, los pacientes saben cuándo han tenido un número de deposiciones mayor que el normal y cuándo las heces tienen un aspecto más blando o más líquido que el usual. La diarrea puede acompañarse por dolor abdomi-

Cuadro 2-2 Selección de la flora comensal y de los patógenos potenciales del aparato respiratorio

FLORA COMENSAL	PATÓGENOS POTENCIALES
<i>Streptococcus</i> α-hemolíticos <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos, diferentes de los del grupo A Especies de <i>Candida</i> <i>Stafilococcus coagulasa-negativos</i> Especies de <i>Corynebacterium</i> (difteroides) <i>Haemophilus parainfluenzae</i> Especies de <i>Neisseria</i>	Adenovirus Anaerobios (como parte de una infección mixta) <i>Bordetella pertussis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> Cinomegalovirus <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Virus del herpes simple Especies de <i>Legionella</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> Especies de <i>Mycobacterium</i> <i>Mycobacterium pneumoniae</i> Mixovirus y parainfluenza <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> (carinii) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)

nal y cólicos de intensidad variable. La "gastroenteritis" es un término utilizado para describir varios tipos de infección gastrointestinal baja.

La "disentería" es un término utilizado para describir el cuadro en el cual la diarrea se acompaña por dolor abdominal con cólicos y tenesmo (tensión dolorosa ante el paso de las heces). La disentería es el resultado de la acción de microorganismos "enteroinvasivos" que penetran la mucosa e inflaman la pared intestinal. A menudo, las heces contienen células inflamatorias y glóbulos rojos y puede también observarse sangre.

En el extremo opuesto de este espectro se encuentran los síndromes diarreicos profusamente acuosos no dolorosos causados por virus y ciertos parásitos y bacterias. Los síndromes diarreicos acuosos y más agudos se resuelven en forma espontánea al cabo de una semana. Si los síntomas persisten sin ninguna explicación, se deben considerar los parásitos, como *Giardia lamblia* y otras etiologías no infecciosas. Las heces producidas durante una infección por *Giardia* son a menudo hediondas, grasosas y flotan en el agua.

La fiebre entérica representa una categoría especial y, por fortuna, poco común. Este síndrome está causado por *Salmonella typhi*, aunque otras especies y serovares de *Salmonella* también pueden ocasionar una enfermedad similar. La fiebre entérica se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza que al principio remite y luego se hace constante, dolor abdominal, esplenomegalia, bradicardia (pulso lento) relativa y leucopenia. La diarrea no es prominente; de hecho, el estreñimiento puede ser más común al principio de la enfermedad. Además, algunos patógenos invasivos pueden estar asociados con enfermedad sistémica e infección metastásica en otros órganos, sobre todo en los pacientes con enfermedades subyacentes, como las hepatopatías crónicas.

Ciertos agentes infecciosos están asociados con determinados factores de riesgo o características clínicas. Algunos agen-

tes, como microsporidio, se encuentran casi exclusivamente en los pacientes inmunosuprimidos. Casi siempre, *Clostridium difficile* causa enfermedad sólo en los pacientes que fueron tratados con antibióticos que alteran la flora gastrointestinal normal. Muchos de estos agentes se transmiten por alimentos y agua contaminada.⁴⁶ En el cuadro 2-3 se resumen los principales síndromes de las enfermedades del tubo digestivo bajo.

En la mayoría de las comunidades, los agentes que se identifican con mayor asiduidad en las gastroenteritis son *Campylobacter jejuni*, especies de *Salmonella*, *Giardia lamblia*, rotavirus y norovirus (virus similares a Norwalk, para los cuales no se cuenta aún con pruebas de laboratorio).⁴² Sin embargo, cuando todo está hecho y dicho, el rendimiento diagnóstico a partir de los coprocultivos en la mayoría de los laboratorios clínicos es un desalentador 1,5% a 5,6%.^{28*}

Algunos agentes que causan gastroenteritis requieren tratamiento inmediato; por ejemplo, las especies de *Shigella*; para otros no existe tratamiento específico, por ejemplo los virus; en otros casos el tratamiento está indicado sólo si se presenta una enfermedad con complicación o fiebre entérica, por ejemplo, las especies de *Salmonella*. Es muy probable que los médicos indiquen coprocultivos ante alguna de las siguientes situaciones:¹¹⁵

1. El paciente tiene síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
2. El paciente ha viajado recientemente a un país en vías de desarrollo.
3. Presencia de heces con sangre.
4. Presencia de diarrea durante más de tres días.
5. La diarrea requirió rehidratación intravenosa.
6. Hay fiebre.

Los laboratorios difieren mucho en la sofisticación de los métodos de análisis de las muestras de heces. En un estudio realizado en 388 laboratorios clínicos durante 1999, la mayoría

Cuadro 2-3 Principales síndromes de las gastroenteritis y agentes etiológicos más comunes

SÍNDROME	BACTERIA	VIRUS	PARÁSITOS	COMENTARIOS
Diarrea inflamatoria, incluida disentería	Especies de <i>Shigella</i> , <i>E. coli</i> enteroinvasiva, <i>E. coli</i> enterohemorrágica, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium difficile</i>	Ninguno	<i>Entamoeba histolytica</i>	Afecta el colon; a menudo presencia de leucocitos en las heces
Diarrea no inflamatoria	<i>E. coli</i> enterotoxigénica, <i>E. coli</i> enteroagregativa, <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Norovirus, rotavirus, adenovirus entérico, astrovirus, etc.	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Isoospora belli</i> , <i>Cyclospora cayentensis</i>	Afecta el intestino delgado proximal; usualmente ausencia de leucocitos en las heces
Diarrea con enfermedad sistémica, incluida fiebre entérica	<i>Salmonella typhi</i> , otras especies de <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , especies de <i>Campylobacter</i>	Ninguno	Ninguno	Afecta el intestino delgado distal; puede haber leucocitos mononucleares en las heces

de los microbiólogos examinaron las muestras de heces para estudiar la presencia de especies de *Salmonella*, de *Shigella* y de *Campylobacter*. Por el contrario, cerca del 50% de los laboratorios incluyeron *Escherichia coli* O157:H7 y especies de *Vibrio* y de *Yersinia* en su protocolo diagnóstico.²⁹⁸ La búsqueda de parásitos en las muestras de heces se realizó en sólo 59% de 455 laboratorios estudiados y las muestras fueron enviadas a un laboratorio de referencia para su análisis.¹³² La investigación de especies de *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayentensis* y microsporidio en heces se realizó sólo por demanda específica en el 89% de estos laboratorios. Es muy importante que cada laboratorio indique los patógenos que se buscaron cuando informan los resultados al médico. Un informe que indique "no se aislaron patógenos entéricos" no es aceptable. En un estudio que incluyó a casi 3 000 médicos de cinco estados, el 28% de ellos no sabía si el laboratorio había analizado la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y el 40% desconocía si se había realizado la búsqueda de las especies de *Yersinia* o de las especies de *Vibrio*.¹¹⁵

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES

La recolección de muestras de heces diarreicas no es difícil. Se deben recolectar muestras para la detección de todos los patógenos en recipientes limpios (no necesariamente estériles), de boca ancha, que pueden cubrirse con una tapa muy ajustada. Los recipientes no deben contener conservantes, detergentes o iones metálicos. Se debe también evitar la contaminación con orina. Si se sospecha la presencia de un parásito intestinal, como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* o especies de *Cryptosporidium*, debe colocarse una pequeña porción de la muestra con conservantes como alcohol polivinílico (u otro alternativo pero que no contenga mercurio) y formol al 10%. Las muestras de heces para la detección de virus no deben colocarse en medios de transporte viral dado que las partículas virales pueden diluirse, más allá de la sensibilidad del sistema de detección utilizado.

En algunos casos es necesaria la recolección de un hisopado rectal en lugar de una muestra de heces, sobre todo en los recién nacidos o en adultos muy debilitados. Los hisopados

rectales pueden ser más eficaces que las muestras de heces para el aislamiento de ciertas cepas de *Shigella*, ya que estos microorganismos son sensibles al enfriamiento y al secado. También se ha informado que los hisopados rectales son más eficaces para el aislamiento de *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados.¹⁶¹ El hisopo debe ser introducido un poco allá del esfínter anal, evitando el contacto directo con la materia fecal del recto. Los hisopos deben ser inoculados de inmediato en el medio de cultivo o colocados en un sistema de transporte adecuado para evitar que se sequen. Los hisopados rectales también son necesarios para el diagnóstico de la infección gonocócica rectal.

CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES CON GASTROENTERITIS

Se debe realizar una historia médica detallada que incluya los viajes recientes, el consumo de alimentos o agua potencialmente contaminada y la presencia de enfermedad similar en amigos o familiares. En particular se deben registrar los viajes a países fuera de los Estados Unidos, donde ciertas enfermedades asociadas con diarreas pueden ser endémicas. La causa más común de la "diarrea del viajero" (también llamada "revancha de Moctezuma", "vientre de Delhi" y otros nombres pintorescos) es *E. coli* enterotoxigénica,¹ pero otros patógenos importantes, como *Entamoeba histolytica* son también habituales fuera de los Estados Unidos. La mala calidad del agua y de los abastecimientos de alimentos, la escasa disponibilidad de almacenamiento en frío y la contaminación a partir de las personas que preparan los alimentos ponen en peligro a los viajeros. Sin embargo, en estos tiempos del comercio global, quedarse en casa tampoco implica estar libre de riesgo. Se han informado gastroenteritis epidémicas como resultado del consumo de alimentos contaminados.⁴⁸ Se trata casi siempre de vegetales o frutas que no se cocinan antes de consumirse y que han sido importadas de otros países. Por ejemplo, se detectó un brote multiestatal de infección por *Cyclospora* proveniente de frambuesas importadas de Centroamérica sólo después de que se acumularon los informes en los centros nacionales de referencia.¹¹⁶ Es importante recordar que las bacterias habituales de

Cuadro 2-4 Asociación de infecciones gastrointestinales con factores específicos

FACTOR	AGENTE(S) INFECCIOSOS
Viajar de mochilero y beber agua de arroyos de montaña	<i>Giardia lamblia</i>
Productos lácteos	Especies de <i>Salmonella</i> , especies de <i>Campylobacter</i> , especies de <i>Yersinia</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Costa este y costa del golfo	Vibrios halofílicos; p. ej., <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i>
Ensaladas de patata y huevo, productos de repostería	<i>Staphylococcus aureus</i>
Huevos	Especies de <i>Salmonella</i>
Fruta fresca	Especies de <i>Cryptosporidium</i> , especies de <i>Cyclospora</i>
Arroz frito	<i>Bacillus cereus</i>
Hamburguesa	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Pacientes inmunosuprimidos	Especies de <i>Cryptosporidium</i> , <i>Isospora belli</i> , complejo <i>Mycobacterium avium</i> , hiperinfección por <i>Strongyloides stercoralis</i> , citomegalovirus, especies de <i>Candida</i>
Mariscos	Especies de <i>Vibrio</i> , norovirus, virus de la hepatitis A

las aves de corral (que se mueren durante la cocción) pueden causar enfermedad si los alimentos crudos, como los vegetales, entran en contacto con las tablas de picar o los mostradores utilizados para su preparación. Ciertas localidades, ámbitos clínicos o alimentos se relacionan particularmente con patógenos específicos (cuadro 2-4). Sin embargo, es posible cualquier combinación, incluso aquellas no descritas antes, lo que subraya la importancia de realizar una historia clínica cuidadosa y de informar los casos a las autoridades de salud pública.

Infecciones del tubo digestivo alto

El tubo digestivo alto está formado por el esófago, el estómago y el duodeno proximal (desde la orofaringe hasta el intestino).

SÍNTOMAS CLÍNICOS

La esofagitis está asociada con dificultad y dolor al tragar (disfagia) y con dolor que se irradia hacia la espalda. La mucosa gastroesofágica está expuesta a alto riesgo de ulceración. Los agentes infecciosos más comunes son *Candida albicans* y el virus del herpes simple; ambos producen enfermedad erosiva.

Cuando el estómago y la unión gastroesofágica se encuentran involucrados, los síntomas son anorexia, sensación de náuseas (en ocasiones con vómitos profusos) y dolor en el abdomen superior. Debido al pH muy bajo del ácido gástrico, el

99,9% de las bacterias que se ingieren mueren luego de 30 minutos de exposición, por lo tanto, la gastritis debida a la invasión directa del estómago es rara. En consecuencia, la infección gastrointestinal alta es causada más a menudo por virus y toxinas bacterianas. El ácido gástrico también desempeña un papel importante en la protección del tubo digestivo bajo contra las infecciones bacterianas. La terapia con antiácidos, que neutraliza el pH gástrico bajo, y la gastrectomía, en la cual se elimina la mayor parte de la mucosa formadora de ácido, predisponen a las infecciones entéricas por diversas especies bacterianas. Guerrant¹⁰³ describió que la dosis de *V. cholerae* requerida para causar una infección en personas sanas (10^6 microorganismos por mililitro) se redujo a sólo 10^4 /mL en voluntarios a los cuales se les administró bicarbonato para neutralizar la acidez gástrica.

Se ha asociado *Helicobacter pylori* (antes *Campylobacter pylori*) con la gastritis y la úlcera péptica.^{152,174,281} El microorganismo tiene una propiedad bioquímica única de hidrolizar en forma ávida y rápida la urea y de liberar iones amonio. Se presume que las bacterias se rodean de una nube alcalina que posibilita su supervivencia en el ambiente muy ácido de la mucosa gástrica. La etiología infecciosa de la úlcera péptica permaneció sin conocerse durante tanto tiempo porque ésta no presentaba los signos y los síntomas clásicos de una enfermedad infecciosa. El hallazgo de esta infección “no infecciosa” ha abierto nuevas perspectivas en el espectro de las enfermedades causadas por los microorganismos.

Un factor principal de las infecciones gastrointestinales altas es la ingesta de microorganismos o toxinas bacterianas preformadas que se encuentran en alimentos y bebidas, conocidas como intoxicación por alimentos. La gastritis aguda y a menudo fulminante, acompañada por debilitamiento general y vómitos, luego de la ingestión de alimentos muy contaminados con microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, especies de *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*, no es el resultado de la invasión bacteriana directa de la pared gástrica, sino que es consecuencia de la acción emética directa que las neurotoxinas preformadas ejercen sobre el componente central del sistema nervioso autónomo.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL TUBO DIGESTIVO ALTO

La obtención de muestras gástricas para cultivo es muy poco frecuente y se limita a algunas situaciones cuyo diagnóstico es imposible por otros medios. Las bacterias causales de una intoxicación aguda por alimentos se pueden aislar del material del vómito.

Se realizan biopsias gástricas para detectar *Helicobacter pylori*.^{288,297} Las muestras se pueden cultivar para aislar *H. pylori*, un procedimiento que rara vez se efectúa en un laboratorio clínico; se puede analizar la presencia de actividad de ureasa, un indicio presuntivo de la presencia de *H. pylori*; o se puede realizar un examen histológico para observar la presencia de gastritis o de bacterias espiraladas. De manera alternativa, se puede efectuar un examen serológico.

El aspirado del contenido duodenal puede ser útil para realizar el diagnóstico de giardiasis o estrongiloidiasis, si no se pudo detectar el patógeno a través del examen de muestras repetidas de heces. La utilización de un equipo comercial de la “prueba de la cuerda” (*string test*) (Enterotest®, HDC, Milpitas, CA) es una alternativa para pasar el tubo gástrico. El Enterotest® consiste en una cápsula que contiene una cuerda fuertemente enrollada. Se desenrolla un tramo corto de la cuerda y el extremo se pega con cinta adhesiva a la mejilla del

paciente; luego se le indica que trague la cápsula. En alrededor de 30 a 60 minutos, cuando la cápsula alcanzó el duodeno superior, se retira con cuidado la cuerda, se extrae cualquier mucosidad adherida a ella y se coloca sobre la superficie de un portaobjetos para su examen directo con el microscopio.

Infecciones urinarias

El aparato urinario se divide en una porción superior, compuesta por los riñones, la pelvis renal y los uréteres, y una porción inferior, compuesta por la vejiga urinaria y la uretra. Las infecciones urinarias altas suelen ser ascendentes; es decir, se originan en la vejiga y ascienden a través de los uréteres hasta los riñones. Normalmente, la válvula vesicouretral evita el reflujo de la orina desde la vejiga hacia los uréteres. Las personas con anomalías urogenitales o con sobredistensión de la vejiga debido a obstrucciones del flujo de salida, mal funcionamiento neurogénico o presión del útero agrandado durante el embarazo, son muy sensibles a las infecciones urinarias ascendentes. Las infecciones de la pelvis renal (pielitis) y del riñón (pielonefritis) son las complicaciones más frecuentes. Las infecciones pueden ser agudas o recurrentes con daño inflamatorio crónico.

Las infecciones urinarias altas rara vez son el resultado de la diseminación por vía sanguínea de una bacteria dentro de la corteza renal en pacientes con septicemia. Las manifestaciones comunes son los abscesos multifocales o la pielonefritis supurativa.

A veces, las infecciones urinarias se dividen en dos categorías: no complicadas y complicadas.^{273,307} En una mujer joven sin enfermedad subyacente urinaria o sistémica las infecciones no complicadas son la cistitis aguda o la pielonefritis. Si el diagnóstico es cistitis, se puede instituir una terapia empírica con antibióticos sin recurrir al cultivo, dado que *Escherichia coli* es responsable de casi todas estas infecciones. Para demostrar que el proceso es inflamatorio se debe realizar un análisis de orina o una prueba para esterasa leucocitaria: si los neutrófilos polimorfonucleares están ausentes, se debe efectuar un cultivo antes de comenzar el tratamiento con antibióticos. No es necesario realizar un cultivo de seguimiento ("prueba de cura") a menos que los síntomas persistan.

La cistitis o la pielonefritis en los varones, los niños, los pacientes cateterizados en forma crónica y las mujeres con infecciones recurrentes, anomalías urológicas o enfermedades subyacentes se consideran una infección complicada. Se requiere análisis de orina y urocultivo para la cistitis complicada y para todos los casos de pielonefritis.^{273,307}

Signos y síntomas clínicos

Las principales manifestaciones clínicas de las infecciones urinarias altas son fiebre (a menudo con escalofríos) y dolor en el flanco. La frecuencia, la urgencia y la disuria son muy sugestivas de infecciones de la vejiga urinaria y de la uretra. Sin embargo, en algunos pacientes con pielonefritis u otras infecciones urinarias altas los primeros síntomas son compatibles con los de las infecciones urinarias bajas. La diferenciación es importante porque el enfoque de la terapia con antibióticos para estas dos entidades es distinto.^{273,307}

Las infecciones urinarias bajas suelen comprometer la vejiga o la uretra. Los síntomas son similares para las infecciones en ambas localizaciones, por lo cual algunas veces el proceso se denomina síndrome uretral agudo.²⁷³ Las manifestaciones

clínicas usuales son la micción frecuente y sin dolor de pequeñas cantidades de orina turbia (frecuencia y disuria) y malestar o dolor suprapúbico. La vaginitis en la mujer y la prostatitis en el hombre pueden causar síntomas similares, pero casi siempre se pueden diferenciar en forma clínica. El diagnóstico es particularmente difícil en las personas mayores, en las cuales puede no haber fiebre ni leucocitosis durante la infección.

Se discute mucho sobre el significado de la bacteriuria asintomática. A pesar de que este fenómeno ha sido documentado en muchos tipos de pacientes y escenarios clínicos, la necesidad de tratamiento de la bacteriuria se presenta sólo en algunas situaciones clínicas: embarazo, mujeres que están siendo sometidas a procedimientos genitourinarios invasivos y receptores de trasplantes renales durante el período postrasplante inmediato.³²³

Factores del huésped

La prevalencia de las infecciones urinarias varía con el género y la edad del paciente. En los recién nacidos y los lactantes, son más comunes en los varones, con una prevalencia global del 1%. La mayoría de estas infecciones se asocian con anomalías congénitas. En los niños en edad escolar existe una mayor prevalencia en las mujeres.²⁷⁹ Esta relación permanece constante en la adultez. En ciertas condiciones, como el embarazo o la diabetes, se observan altas tasas de incidencia de infecciones urinarias. En los ancianos, se puede esperar un aumento de infecciones urinarias tanto en las mujeres (20%) como en los varones (10%), en los cuales existen condiciones predisponentes, por ejemplo, uropatías obstructivas en la próstata, escaso vaciamiento de la vejiga por prolapso uterino y procedimientos que requieren instrumentación, tanto en hombres como en mujeres.

Sin embargo, las mujeres sexualmente activas son por mucho la población con mayor riesgo de tener una infección del tracto urinario sintomática o una bacteriuria asintomática.²⁷⁶ A pesar de que la infección asintomática en este grupo no produce problemas médicos serios, puede ser un marcador de infecciones sintomáticas futuras.³⁰³ Las mujeres son más susceptibles que los hombres debido a la longitud más corta de la uretra. Los patógenos usuales son la flora bacteriana perineal que se origina en el tubo digestivo, sobre todo si la bacteria tiene factores que facilitan su unión al epitelio urinario.²³⁸ El coito facilita la entrada de las bacterias en la uretra femenina.

Un segundo grupo de individuos que se encuentran en riesgo de infección urinaria son los pacientes cateterizados en forma crónica.²⁷¹ Un cuerpo extraño, como el catéter urinario permanente, garantiza su colonización a los 5 días de su colocación. La bacteriuria asintomática resultante no es dañina por sí misma, pero expone al paciente a la aparición de infección sintomática, como pielonefritis y sepsis urinaria. Cuando el paciente también sufre de demencia, como muchos ancianos, puede ser difícil determinar si la infección es sintomática. En ausencia de fiebre o leucocitosis, los únicos indicadores pueden ser cambios sutiles en la personalidad o en el estado mental. Estas características las pueden detectar mejor las personas que asisten cotidianamente al enfermo que el médico, quien ve al paciente en forma intermitente.

Recolección de muestras de orina para cultivo

El aparato urinario normal no suele contener bacterias, con la excepción de la mucosa uretral que presenta microflora.¹³³ La orina puede contaminarse fácilmente con bacterias del con-

Cuadro 2-5 Cierta flora comensal y patógenos potenciales del aparato urinario

FLORA COMENSAL	PATÓGENOS POTENCIALES
Streptococcus α/β hemolíticos	<i>Corynebacterium urealyticum</i> (D2) ^a
Especies de <i>Bacillus</i>	Especies de <i>Enterococcus</i>
Estafilococos coagulasa-negativos	<i>Enterobacteriaceae</i> ^a
Difteroides	Especies de <i>Pseudomonas</i>
Especies de <i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> (hombres ancianos) <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (mujeres jóvenes)

^a *Proteae* y *Corynebacterium urealyticum* descomponen la urea, alcalinizan la orina y predisponen a la formación de cálculos.

ducto vaginal y del perineo, o con la flora bacteriana propia de la uretra. En el cuadro 2-5 se enumera una selección de microorganismos considerados contaminantes o patógenos potenciales del aparato urinario.

MUESTRAS DE ORINA DEL CHORRO MEDIO DE LA MICCIÓN

Las muestras de orina se recolectan del chorro medio de la micción en condiciones adecuadas de higiene. En las mujeres, esta técnica requiere indicaciones precisas del personal para lograr mejores resultados.²³ Primero se limpia el área periuretral y el perineo con dos o tres paños de gasa embebidos en agua jabonosa, utilizando un movimiento hacia adelante hacia atrás, seguido de un enjuague con solución salina o agua estéril. Bradbury obtuvo evidencia de que la limpieza incorrecta del área periuretral y del perineo en las mujeres puede no afectar la calidad de las muestras de orina del chorro medio para cultivo. A pesar de esta sugerencia, recomendamos llevar a

cabo este procedimiento de limpieza cuando se recolecta una muestra de orina para cultivo en las mujeres.

Los labios vaginales deben mantenerse separados durante la micción espontánea y descartar los primeros mililitros de orina deben ser descartados dentro de una bacinilla o en el inodoro para eliminar las bacterias de la uretra (fig. 2-2). El chorro medio de la orina se recolecta entonces en un recipiente estéril de boca ancha que pueda cerrarse con una tapa ajustada. La limpieza con agua jabonosa no suele requerirse para los hombres; en su lugar se limpia el meato uretral inmediatamente antes de la micción espontánea, con lo cual la recolección de la muestra del chorro medio de orina es suficiente.

Es frecuente que se les solicite a los pacientes atendidos en el consultorio médico o en una clínica que obtengan su propia muestra de orina. Esta práctica es aceptable si se le dieron al paciente las directivas precisas para la recolección adecuada de la muestra. Se recomienda imprimir las instrucciones sobre una tarjeta que el paciente pueda considerar después de escuchar las instrucciones verbales. Cuando el paciente no parece comprender o cuando el idioma es un impedimento, la enfermera o el asistente del consultorio deben leerle las instrucciones punto por punto o proporcionarle asistencia directa para recolectar la muestra. En el recuadro 2-2 se muestra un ejemplo de una tarjeta con estas instrucciones.

El cumplimiento del procedimiento de recolección de orina puede controlarse a lo largo del tiempo teniendo en cuenta la frecuencia con la cual el recuento de colonias de las muestras se encuentra en un rango entre 10 000 y 100 000 UFC/mL. La mayoría de los pacientes tendrán recuentos de colonias que se encuentran fuera del rango. Los pacientes sin infección no tendrán bacterias o bien el recuento será inferior a 10^2 UFC/mL. Los pacientes infectados tendrán un recuento de 100 000 UFC/mL o más. La frecuencia de un recuento intermedio no debe exceder el 5-10% si el procedimiento de recolección de la muestra es correcto. Las muestras deben procesarse dentro de las dos horas de la recolección para obtener recuentos de colonias exactos.

El equipo de recolección de orina B-D® (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD), diseñado para mantener la población bacteriana en la orina a temperatura ambiente durante 24 horas, es tan eficaz como la conservación de las muestras refrigeradas durante toda la noche.¹²² A pesar de que se puede notar cierta

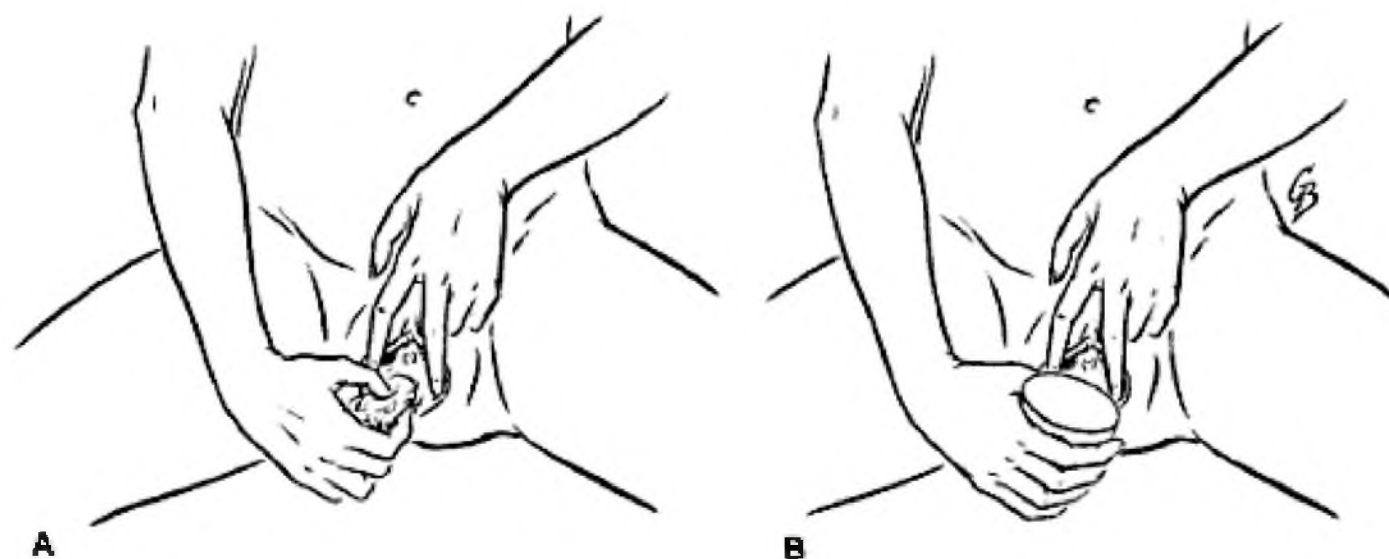


Figura 2-2 Recolección de orina del chorro medio en condiciones de higiene adecuadas. (A) Se separan los labios con los dedos y se limpia con un apósito de gasa de 10 × 10 cm embebido en jabón verde. (B) Se recolecta la porción media de la orina en un recipiente estéril.

Recuadro 2-2 Instrucciones para la obtención de muestras de orina del chorro medio en condiciones de higiene adecuadas (mujeres)

1. Quitarse la ropa interior, sentarse confortablemente en el asiento del retrete y colocar una rodilla lo más lejos posible hacia el costado.
2. Separar con una mano los labios vaginales y mantenerlos así mientras se realiza una misma la higienización y recolección de la muestra.
3. Lavado. Asegurarse de lavar y enjuagar bien antes de recolectar la muestra de orina. Utilizar cada una de los cuatro apósitos estériles de 10 x 10 cm envueltos en 10% de jabón verde, pasar el apósito desde adelante hacia atrás. Lavar entre los pliegues de la piel con máximo cuidado.
4. Enjuagar. Después de haber lavado con los apósitos enjabonados, enjuagar con un apósito húmedo con el mismo movimiento de adelante hacia atrás. No utilizar ningún apósito más de una vez.
5. Mantener separados los labios vaginales y dejar caer las primeras gotas de orina en el inodoro. Sustener el recipiente del lado externo y permitir que la orina remanente caiga dentro de éste.
6. Tapar el recipiente o pedirle a la enfermera que lo haga.

disminución en el recuento de colonias luego de un almacenamiento prolongado, este sistema se recomienda para el transporte de muestras de orina cuyo procesamiento se retrasa hasta 24 horas. Los sistemas de transporte que incluyen ácido bórico (el cual se encuentra entre los aditivos del equipo de recolección de orina B-D®) pueden ser un método alternativo para la recolección de muestras en el domicilio o en lugares alejados. Jewkes y cols.,¹²⁸ a partir de un estudio que incluyó a 84 niños, concluyeron que la recolección de orina en ácido bórico reducía al mínimo la contaminación, a pesar de que el crecimiento de los posibles patógenos también podía inhibirse en un pequeño número de casos.

La recolección de una muestra válida de orina del chorro medio obtenida en condiciones adecuadas de higiene para cultivo de hombres ancianos con incontinencia que residen en geriátricos también representa un problema. Nicolle y cols.²⁰⁴ informaron haber diagnosticado con éxito las infecciones urinarias en este grupo de pacientes utilizando un dispositivo de recolección externo que consiste en un condón estéril y una bolsa para orina que se lleva en la pierna. Antes de colocar el condón se limpia el glande con jabón y agua y se enjuaga con solución salina estéril. La bolsa para orina se examina cada 10 a 15 minutos hasta haber obtenido la muestra. Dado que las contaminaciones con bajo recuento de bacterias están presentes en casi el 50% de los pacientes, se requiere el traslado rápido de la muestra al laboratorio y la inoculación inmediata en el medio de cultivo. Los recuentos bacterianos mayores de 10^5 UFC/mL, sobre todo si se obtienen en dos recolecciones sucesivas, tienen una alta correlación con otros indicadores de infección urinaria.

OTRAS MUESTRAS DE ORINA DE MICCIÓN ESPONTÁNEA

El objetivo de recolectar el chorro medio es obtener una muestra de orina que haya estado retenida en la vejiga y descartar la parte inicial de la micción que ha estado en contacto con la uretra y se encuentra presumiblemente contaminada con la flora uretral. Sin embargo, si se investiga una uretritis, la porción inicial de la orina de micción espontánea es la que real-

mente interesa. De manera alternativa (aunque más dolorosa), se puede introducir un hisopo en la uretra distal para tomar la muestra. La utilidad principal de las muestras de orina de micción espontánea es el diagnóstico de uretritis causada por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.¹³⁰

Sin embargo, si se considera el diagnóstico de prostatitis aguda, las secreciones prostáticas son el material de elección. La técnica más común es el cultivo diferencial de la orina luego de un masaje prostático. Un aumento de 10 veces en el recuento bacteriano luego del masaje prostático sugiere el diagnóstico.⁸⁸

RECOLECCIÓN A PARTIR DEL CATÉTER

Debe evitarse en la medida de lo posible la colocación de un catéter con el único propósito de obtener una muestra de orina debido al riesgo de introducir patógenos bacterianos. En un estudio que incluyó a 105 mujeres con sospecha de infección urinaria,³⁶ los resultados de los cultivos de las muestras de orina del chorro medio obtenida en condiciones adecuadas de higiene no difirieron en cuanto a sensibilidad, especificidad o valores predictivos positivos o negativos de los de las muestras obtenidas en paralelo por medio de un catéter de entrada y salida (catéter I y O) recolectadas inmediatamente después de las muestras del chorro medio. La colocación de un catéter se debe restringir a los pacientes que son incapaces de emitir una muestra del chorro medio adecuada y debe realizarse prestando meticulosa atención a la asepsia de la técnica. Los primeros mililitros de orina del catéter deben descartarse para eliminar cualquier microorganismo que pueda haberse alojado en la punta del catéter en su tránsito a través de la uretra.

Las muestras de orina pueden obtenerse de un catéter permanente utilizando una aguja 28 y una jeringa. Se debe asegurar la desinfección del área donde se realice la punción. La orina puede aspirarse a través del colector de goma blanda entre el catéter y el tubo de recolección. Las muestras no deben obtenerse de las bolsas de recolección del catéter. A pesar de que se intenta utilizar pañales húmedos o bolsas como medios de recolección de orina en los lactantes, es un gran desafío interpretar los resultados obtenidos de estas muestras. Las puntas de los catéteres de Foley no son adecuadas para el cultivo porque se encuentran siempre contaminadas con microorganismos uretrales o colonizantes.²⁰⁴

PUNCIÓN SUPRAPÚBICA

La punción suprapúbica se reserva, casi en forma exclusiva, para los recién nacidos y los niños pequeños. En la figura 2-3 se ilustra esta técnica. Este procedimiento se realiza mejor cuando la vejiga está llena. Para llevar a cabo esta práctica, se desinfecta la piel suprapúbica que se encuentra sobre la vejiga y se colocan en el lugar campos quirúrgicos estériles. Se inyecta en forma subcutánea un anestésico (p. ej., 1% de lidocaína HCl) en el sitio donde se hará la punción. Con la punta de un bisturí quirúrgico aguzado para punción, se realiza una pequeña incisión en la epidermis. A través de esta herida se introduce delicadamente dentro de la vejiga una aguja para punción espinal de bisel corto y calibre 18 y se aspiran 10 mL de orina con una jeringa.

Cultivo de muestras de orina

Se requieren medios selectivos y no selectivos. Casi siempre es suficiente una combinación de agar sangre de camero al 5%

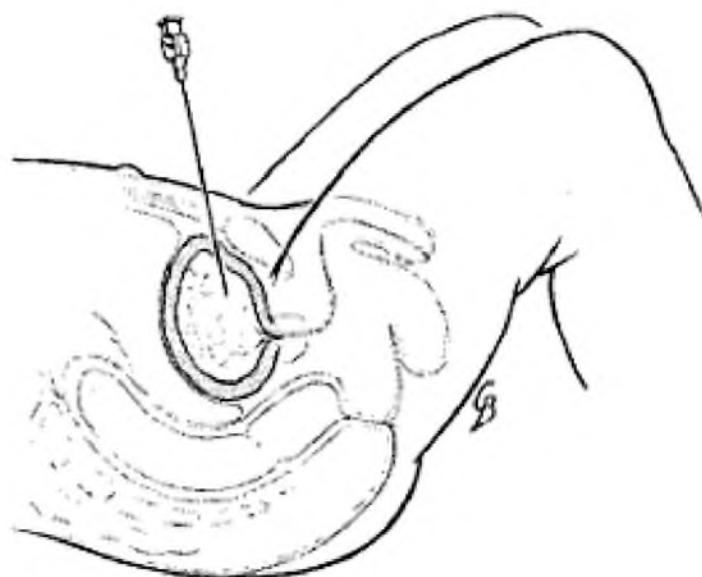


Figura 2-3 Aspiración suprapúbica de la vejiga urinaria. Se dirige una aguja en forma percutánea dentro de la vejiga urinaria justo por arriba de la sínfisis púbica. La orina se puede obtener con una jeringa.

y de agar de MacConkey para el aislamiento de los microorganismos que se enumeran en el cuadro 2-5. Los microbiólogos de los laboratorios que atienden principalmente a pacientes ambulatorios, en los cuales el patógeno más esperado es *Escherichia coli*, prefieren utilizar agar eosina-azul de metileno (EMB) debido a la morfología distintiva que presenta *E. coli* en este medio. Aunque algunos microbiólogos incorporaron también un medio selectivo para bacterias grampositivas (p. ej., agar sangre colistina-ácido nalidíxico [CNA] o agar feniletilalcohol [PEA]), el rendimiento de esta incorporación no justifica el gasto.⁴³ En muchos laboratorios la inoculación de placas por duplicado con ansas calibradas de 0,01 mL y 0,001 mL se realiza para comparar los recuentos bacterianos como parte del control de calidad y para facilitar el recuento de colonias.

Luego de inocular con un ansa calibrada la superficie de cada placa de agar, ésta debe sembrarse por completo en estrías sobre todos los cuadrantes como se describió en el capítulo 1, de modo que se pueda realizar el recuento semicuantitativo de colonias después de la inoculación. El criterio más utilizado para determinar si se debe realizar las pruebas de identificación y el antibiograma de un aislamiento determinado es un recuento de colonias mayor o igual a 10^3 UFC/mL. Cuando el recuento de colonias se encuentra entre 10^4 y 10^5 UFC/mL, o cuando se aíslan especies múltiples, el director de cada laboratorio debe decidir, caso por caso, si se efectúan o no las pruebas de identificación y el antibiograma. Algunos microbiólogos utilizan 10^4 UFC/mL como punto de corte, ya que las ansas calibradas tienden a subestimar el recuento de colonias. De manera similar, en algunos laboratorios se requiere un cultivo puro, mientras que en otros se evalúan dos patógenos (para un mayor detalle sobre la evaluación de los cultivos mixtos véase cap. 1).

Los cultivos de muestras de orina obtenidas del catéter o suprapúbicas suelen analizarse en detalle, aun con bajo recuento de colonias o con el aislamiento de múltiples tipos de microorganismos. Los recuentos de colonias de bacilos entéricos gramnegativos tan bajos como 10^2 UFC/mL pueden ser significativos en mujeres con síndrome uretral agudo;^{274,275} sin embargo, el médico debe avisar al laboratorio sobre los casos sospechosos, dado que las técnicas semicuantitativas de cultivo de orina no están diseñadas para detectar recuentos de colonias tan

bajos. El significado de las infecciones asociadas con estos “recuentos bajos de colonias” se ha documentado sólo en mujeres infectadas por bacilos entéricos. La contaminación es una cuestión para tener en cuenta cuando se evalúan cultivos con bajos recuentos de colonias. Los resultados de un estudio en el que se utilizó un ansa de 0,01 mL mostraron un incremento de muestras contaminadas de un 19%.⁴³ En estos casos es apropiado conversar con el médico sobre la estrategia por seguir.

Pruebas de cribado para infecciones urinarias

La bibliografía referida a las pruebas de cribado para infecciones urinarias es voluminosa, contradictoria y confusa. Es útil considerar que las pruebas de cribado para bacteriuria son una tarea muy diferente de aquellas para inflamación.³²³ Ambas se considerarán por separado.

Con la excepción de algunas situaciones en las cuales la bacteriuria sintomática es clínicamente importante, el objetivo final de interés es la infección urinaria sintomática. Muchos estudios utilizan la presencia de 10^3 bacterias como una alternativa a este objetivo final, pero esta estrategia es desafortunada. Quizás es más útil pensar en el problema en los mismos términos utilizados para describir el abordaje de la neumonía. El diagnóstico de las infecciones urinarias se realiza por medio de la evaluación de los síntomas clínicos o por la presencia de una respuesta inflamatoria. Una vez documentada la infección, el cultivo microbiológico es útil para determinar la etiología de esa infección.

PRUEBAS DE CRIBADO PARA BACTERIURIA

La presencia de bacteriuria en concentraciones que sugieren infección urinaria puede determinarse mediante el examen microscópico de la orina, las pruebas de detección de productos bacterianos y el cultivo. Ninguna de estas pruebas detecta recuentos bajos de colonias en orina con la sensibilidad adecuada.

Examen microscópico. La tinción de Gram es un método económico para estimar la bacteriuria. En un estudio se demostró una sensibilidad del 94% y una especificidad del 90% para detectar recuentos de colonias de al menos 10^3 UFC/mL cuando se observó al menos un microorganismo por campo de inmersión en una muestra de orina no centrifugada.³⁰⁹ Esta estrategia tiene la ventaja de que se puede caracterizar la reactividad de Gram de un microorganismo. Sin embargo, la tinción de Gram de una muestra de orina no se utiliza en la mayoría de los laboratorios clínicos como prueba de cribado porque la revisión metódica de los frotis es un trabajo demasiado arduo. Se ha informado que el examen de muestras de orina centrifugadas sin tinción como parte del análisis de orina tiene una sensibilidad similar a la tinción de Gram de una muestra de orina no centrifugada,⁴³ pero esta experiencia no es universal y la mayoría de los médicos no dependen del análisis de orina para la detección de bacteriuria. El examen microscópico con moderado aumento para diferenciar las bacterias de otras partículas en preparaciones sin tefir puede ser un desafío. Una herramienta útil de aseguramiento de la calidad es la comparación de los resultados del cultivo con los del análisis de orina.

Pruebas para productos bacterianos. Una estrategia común para determinar bacteriuria es la utilización de una tira de inmersión impregnada con un reactivo (tira reactiva), diseñada para detectar la presencia de nitritos en orina (pruebas de Griess) y para estimar indirectamente el número de neutrófilos segmentados mediante la detección de la actividad de la esterasa leucocita-

Cuadro 2-6 Flora comensal y agentes etiológicos seleccionados del aparato genital

SITIO ANATÓMICO	FLORA COMENSAL	ETIOLOGÍAS DE LAS ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL (ETS)	ETIOLOGÍAS NO ETS
Uretra	<i>Enterobacteriaceae</i> , α/γ -estreptococos, especies de <i>Enterococcus</i> , difteroides, estafilococos coagulasa-negativos, anaerobios (distal 1-2 cm)	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Genitales externos y piel del perineo	Difteroides, estafilococos coagulasa-negativos, especies de <i>Micrococcus</i> , levaduras, especies de <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Virus del herpes simple, tipo 1; virus del papiloma humano; <i>Treponema pallidum</i> ; <i>Haemophilus ducreyi</i> ; granuloma inguinal; linfogranuloma venéreo (<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipos L1-L3)	Virus del herpes simple, tipo 1; especies de <i>Candida</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>
Vagina	Especies de <i>Lactobacillus</i> , anaerobios, <i>Enterobacteriaceae</i> , α/γ -estreptococos, especies de <i>Enterococcus</i> , difteroides, estafilococos coagulasa-negativos (varía con la edad)	Virus del papiloma humano	Especies de <i>Candida</i> , vaginosis bacteriana, <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> (síndrome del shock tóxico)
Endocérvis	Normalmente estéril o escasamente contaminado con flora vaginal	Virus del papiloma humano, virus del herpes simple, tipo 2; <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>	Virus del herpes simple, tipo 1; citomegalovirus
Endometrio, trompa de Falopio, ovarios	Normalmente estéril	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>	Infección mixta aerobia-anaerobia (ascendente); <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Actinomyces israelii</i> (en pacientes con dispositivos anticonceptivos intrauterinos)
Infecciones sistémicas con portal de entrada genital		Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C	

ria (Ames[®], Elkhart, IN; Chemstrips[®], Biodynamics/Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN).²¹⁴ El fundamento de la prueba de nitritos es que la mayoría de las infecciones urinarias son causadas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (sobre todo, *Escherichia coli*) que reducen a los nitritos. Esta prueba carece de exactitud cuando se la utiliza sola.^{131,191} Se pueden observar resultados falsos positivos si el transporte de las muestras se demoró y, en consecuencia, se produce un sobrecrecimiento de las bacterias reductoras de nitratos, o por interferencia de fármacos. También pueden observarse resultados falsos negativos si el microorganismo que causa la infección no reduce nitratos (p. ej., especies de *Enterococcus*) o si el paciente realiza una dieta sin vegetales, con lo cual pierde una importante fuente de nitratos.

La sensibilidad de la combinación de la tira reactiva de nitrito-esterasa leucocitaria con la bacteriuria de 10^5 UFC/mL está en el rango del 79-93%, con una especificidad aproximada del 82-98%.^{131,214} En un estudio multicéntrico en que se analizaron 298 muestras de orina con recuentos de colonias menores de 10^5 UFC/mL,²¹² la tira LN detectó el 81% de los casos. Sin embargo, en un subgrupo de 204 muestras de pacientes que además de recuentos de colonias menores de 10^5 UFC/mL pre-

sentaron piuria (es decir, inflamación y bacterias) la tasa de detección se incrementó al 95%.

Una estrategia alternativa es la detección de catalasa, que es producida por la mayoría de los patógenos urinarios, comercializada como Uriscreeen[®] (Diatech Diagnostics, Allston, MA). Esta prueba parece funcionar de manera similar a los nitritos y presenta las mismas desventajas. Si los patógenos en un grupo particular de pacientes producen catalasa, una prueba negativa de catalasa excluye de manera efectiva una bacteriuria con alto recuento de colonias; no brinda ninguna ventaja adicional con respecto a la prueba de esterasa leucocitaria.^{212,301}

Detección de bacteriuria por cultivo. El cultivo convencional es una estrategia simple y económica para el cribado. A pesar de que requiere 24 horas de incubación, la decisión de tratamiento rara vez es urgente. Algunos médicos prefieren inocular una muestra de orina utilizando un sistema de cultivo laminar (*dip slide*) en su consultorio, en lugar de enviarla al laboratorio. El sistema de cultivo laminar (SOLAR-CULT[®]; Solar Biologicals, Ogdensburg, NY; Uricult[®], Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia) consiste en una paleta recubierta a cada lado con agar para aislar bacterias grampositivas y gramnegativas. La paleta se sumerge en la orina, se escurre, se

coloca nuevamente en su contenedor y se incuba. La cuantificación del crecimiento se obtiene por comparación con una cartilla. Los sistemas de cultivo laminar no son pruebas de dispensa; el médico que los utiliza debe cumplir con los requerimientos de las pruebas sin dispensa, incluso si no se realizan pruebas de identificación bacteriana ni antibiograma. La ventaja de esta estrategia es su simplicidad y la economía para las muestras negativas. La desventaja es la dificultad de obtener subcultivos para la evaluación siguiente de las colonias. En la era pos-CLIA 1988 (véase cap. 1) muchos médicos prefieren mandar directamente la muestra original a un laboratorio de diagnóstico.

PRUEBAS DE CRIBADO PARA PIURIA

La esterasa leucocitaria (LE) es producida por los neutrófilos polimorfonucleares. Una tira reactiva impregnada con una solución buffer que contiene un éster del ácido indoxil carboxílico y una sal de diazonio, puede utilizarse para detectar la actividad de esterasa leucocitaria en la orina. Una ventaja de esta prueba es que los leucocitos no necesitan estar viables para detectar la actividad LE. Cuando se realiza sola, esta prueba se correlaciona con un recuento de 10 o más leucocitos por campo de alto aumento (WBC/HPF) en la orina, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 94%.¹⁴⁹ Los hallazgos de pruebas de LE falsas positivas pueden ser el resultado de los altos niveles urinarios de ácido ascórbico o albúmina (> 300 mg/dL) o de la presencia de preservantes y detergentes. La mayoría de los resultados falsos negativos se encuentran cuando el recuento de leucocitos en orina está en un rango marginal de 5 a 10/campo de alto aumento. En un estudio realizado por Kierkegaard y cols.¹⁵⁰ se describió que el 35% de las muestras de orina pasaron de positivas (30 WBC/HPF) a negativas (10 WBC/HPF o menos) cuando la orina fue demorada en el transporte por ≥ 3 horas. Por lo tanto, la prueba de LE puede reflejar mejor la piuria que el recuento microscópico de neutrófilos cuando es imposible controlar el intervalo entre la recolección y el procesamiento.

Una opción útil para ofrecerle a los médicos es realizar un cultivo de orina sólo si la prueba de esterasa leucocitaria es positiva (es decir, si hay un proceso inflamatorio). Sin duda, esta estrategia no es adecuada en las pocas situaciones en las cuales la bacteriuria asintomática tiene relevancia o si el paciente está neutropénico. Si el paciente presenta los síntomas de una infección urinaria aguda se debe ofrecer la opción de ordenar un cultivo de orina más allá de la presencia de piuria documentada o no.

Infecciones del aparato genital

El aparato genital está formado por órganos externos e internos en ambos sexos. En los varones, los genitales internos son los testículos, el epidídimo, las vesículas seminales y la uretra (la próstata se analizará más adelante). En las mujeres, los genitales internos son los ovarios, las trompas de Falopio, el útero (principalmente el endometrio), el cuello uterino y la vagina con sus glándulas accesorias. Los genitales externos son el pene en los varones y los labios en las mujeres.

Las infecciones se pueden dividir de manera conceptual: infecciones de transmisión sexual, infecciones del parto y vaginitis. En el cuadro 2-6 se resumen la flora comensal y los patógenos comunes del aparato genital.

Infecciones de transmisión sexual¹⁵¹

URETRITIS Y CERVICITIS

El agente etiológico más común de las infecciones de transmisión sexual es *Chlamydia trachomatis*, que causa uretritis y cervicitis. En el hombre los síntomas que se relacionan principalmente con la uretritis son el dolor durante la micción y la secreción uretral. Puede existir infección asintomática, pero es menos común que en las mujeres. En éstas, además de la uretritis aguda, una manifestación habitual de infección es la cervicitis mucopurulenta distintiva.¹⁵² La complicación más seria de estas infecciones es la enfermedad inflamatoria pélvica, que causa una cicatriz inflamatoria de las trompas de Falopio que conduce a la esterilidad y a los embarazos ectópicos. En el caso especial de *C. trachomatis*, la infección puede ser asintomática, por lo tanto, para evitar estas serias complicaciones es necesaria su búsqueda en las mujeres sexualmente activas.¹⁵³

ÚLCERAS GENITALES

Virus del herpes simple. Varios agentes infecciosos, la mayoría de transmisión sexual, causan lesiones ulcerosas en los genitales externos o internos.¹⁵⁴ Por mucho, el más común es el virus del herpes simple. La infección inicial suele ser asintomática,¹⁵⁵ y en un pequeño porcentaje de mujeres y hombres se produce la liberación asintomática de virus.¹⁵⁶ De hecho, la tasa de producción de virus para una infección clínicamente evidente y para una asintomática es muy similar.¹⁵⁷ La enfermedad sintomática suele acompañarse de lesiones vesiculares con una base eritematosa en el glande del pene, la vulva, el perineo, las nalgas o el cuello del útero. Las vesículas son dolorosas, se pueden ulcerar y estar acompañadas de síntomas sistémicos, como fiebre, malestar, anorexia y adenopatías inguinales bilaterales blandas.

El virus del herpes simple tiene dos serotipos que causan infecciones que difieren epidemiológica y clínicamente. El tipo 1 produce primoinfección en lactantes, niños y adolescentes. Las infecciones son principalmente en la mitad superior del cuerpo, pero un tercio de las infecciones genitales son causadas por este serotipo. Dado que puede infectar el aparato genital por medio de autoinoculación a partir de secreciones orales, la transmisión sexual no es necesaria. Por el contrario, la adquisición del virus tipo 2 se asocia con la actividad sexual y su presencia implica contacto sexual con una persona infectada. La prevalencia relativa de los dos serotipos presenta variación geográfica.¹⁵⁸ Lamentablemente, en los Estados Unidos la infección con el tipo 2 está en aumento.¹⁵⁹ La presencia o la ausencia de síntomas luego de una infección con virus del herpes simple tipo 2 se modifica por la presencia de anticuerpos preexistentes contra el tipo 1¹⁶⁰ y puede estar influida por las características de la cepa que infecta.

El virus del herpes simple establece latencia en los ganglios espinales luego de la infección primaria. Si la cepa que infecta es de tipo 2, la reactivación es más común y la enfermedad es más grave que si infecta la cepa de tipo 1. En ambos casos la frecuencia de las recurrencias disminuye con el tiempo.¹⁶¹

Otras úlceras genitales. Además del virus del herpes simple tipo 2, otros síndromes de úlcera genital son: sífilis, chaneroide (causado por *Haemophilus ducreyi*),¹⁶² linfogranuloma venéreo (causado por los serotipos L1, L2 y L3 de *Chlamydia trachomatis*),¹⁶³ granuloma inguinal (causado por *Calymatobacterium granulomatis*) y trauma.¹⁶⁴ A diferencia de las úlceras causadas por el virus del herpes simple, los chaneros sifilíticos son dolorosos y tienen bordes indurados con una base limpia.¹⁶⁵ Por otro lado, a diferencia de los chaneros sifilíticos, las úlce-

ras chancroides no tienen bordes indurados. La pústula primaria del linfogranuloma venéreo puede asemejarse a la lesión del virus del herpes simple; sin embargo, esta última suele reconocerse por la presencia de adenopatía inguinal necrosante bilateral masiva. La lesión primaria del granuloma inguinal es un nódulo subcutáneo que erosiona la superficie, a partir del cual se desarrolla una lesión granulomatosa elevada, indolora y rojiza.

Lamentablemente, a pesar de que en la mayoría de las áreas de los Estados Unidos estos agentes que causan úlcera genital son relativamente poco comunes, cada vez son más habituales. Sobre todo la sífilis¹⁷ y el chancroide^{18,19} deben considerarse diagnósticos diferenciales en ciertas áreas geográficas y en ciertos grupos de pacientes. En particular, el chancroide puede estar subinformado.²⁴⁶

Interacciones entre las úlceras genitales y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Los pacientes con úlceras genitales de diferentes etiologías tienen mayor riesgo de contraer HIV. Por otra parte, es más frecuente que los hombres infectados con HIV liberen virus del herpes simple tipo 2 que los no infectados (aun si estos últimos tienen conductas homosexuales)²⁴⁷ y, cuando presentan lesiones ulcerosas herpéticas, también más probable que liberen activamente HIV por el aparato genital.²⁴²

Verrugas venéreas. El virus del papiloma humano (HPV) produce excrescencias exofíticas en el epitelio escamoso de la piel (verrugas comunes y verrugas plantares) y de la superficie mucosa de los aparatos respiratorio y genital.¹⁴⁰ Las verrugas anogenitales sintomáticas suelen estar causadas por los genotipos 6 y 11. El condiloma acuminado es una excrescencia similar a una coliflor que aparece en la superficie de las mucosas húmedas, por lo común en la vulva, la vagina y el ano. Las lesiones queratósicas y las pústulas lisas aparecen sobre la piel seca mientras que las "verrugas planas" asintomáticas se pueden encontrar en áreas blandas o secas. Las lesiones remiten casi siempre en forma espontánea sin tratamiento, pero la infección latente o subclínica es común. Las manifestaciones más serias de la infección por HPV son la displasia celular y la neoplasia, producidas por ciertos genotipos, en particular los tipos 16 y 18.²³

Infecciones genitales transmitidas por otra vía diferente de la sexual

VAGINITIS Y VAGINOSIS

Un cierto número de agentes infecciosos causa vaginitis, pero los irritantes no infecciosos también pueden provocar inflamación, en especial si la mucosa vaginal se encuentra atrofica.²⁴⁸ A menudo, la enfermedad compromete la vulva (vulvovaginitis) y las infecciones mixtas son frecuentes. Las presentaciones clásicas se describen más adelante. Lamentablemente, los síntomas se superponen y no es posible establecer un diagnóstico clínico definitivo.²⁴⁹ Es necesario determinar el agente etiológico por análisis microbiológicos. Casi la mitad de las infecciones vaginales no tienen una etiología que se pueda demostrar.²⁴¹

Trichomonas vaginalis produce clásicamente una secreción amarilla verdosa o amarilla espumosa y abundante que se acumula en el fórnix vaginal posterior. La secreción típica de la candidiasis es más gruesa y similar al cuajo y la mucosa vaginal tiende a ser eritematosa. El agente más común es *Candida albicans*, pero en ocasiones otras especies de *Candida* y aun otros géneros infectan la vagina.

Vaginosis bacteriana. *Gardnerella vaginalis*, que en un principio se pensaba que estaba asociada con la vaginosis bacteriana, actúa en realidad de manera sinérgica con bacterias aerobias del género *Bacteroides*, *Peptococcus* y *Mobiluncus* para produ-

cir la secreción característica con mal olor.²⁵⁰ El aislamiento de *G. vaginalis* en ausencia de flora anaerobia mixta y síntomas de vaginosis bacteriana constituye probablemente flora normal vaginal. Se describió que la vaginosis bacteriana⁷⁴ (definida sobre la base de los criterios clínicos) no se encuentra en el 55% de las mujeres de las cuales se aisló *G. vaginalis*. Se enfatiza la importancia del reconocimiento clínico de la vaginosis bacteriana y de establecer un diagnóstico de laboratorio.¹¹⁶ En un estudio que incluyó a 49 mujeres con parto prematuro, de un subgrupo de 12 que presentaban vaginosis bacteriana concurrente, 8 (67%) tuvieron un aumento de 2,1 veces del riesgo de nacimiento prematuro antes de las 37 semanas de gestación. La vaginosis bacteriana también se asocia con bajo peso al nacer.

INFECCIONES DE LOS GENITALES INTERNOS FEMENINOS

Estas infecciones son el resultado del ingreso de la flora vaginal en el aparato genital superior.^{44,117} Por lo tanto, los agentes etiológicos son una mezcla de bacterias aerobias y anaerobias. Se ha documentado con claridad una asociación entre *Actinomyces israelii* y endometritis en las mujeres que utilizan dispositivos intrauterinos plásticos.⁷¹ Se estima que la etiología involucra la formación de un nido de carbonato de calcio en el plástico, en el cual crecen las especies de *Actinomyces*. Las mujeres que utilizan dispositivos de cobre rara vez se infectan, quizá porque el metal es moderadamente bacteriostático. La presencia de *A. israelii* se asocia con infecciones más crónicas y persistentes. El papel de las especies de *Mycoplasma* y de las especies de *Ureaplasma* en las infecciones genitales es controvertido.

En el período posparto, la fiebre e incluso la sepsis (infecciones del puerperio) son una consecuencia común de una infección.²⁴⁰ Las infecciones más devastadoras son causadas por *Clostridium perfringens*, casi siempre como consecuencia de un aborto ilegal con instrumentos no estériles y por *Streptococcus pyogenes*, la principal causa de fiebre puerperal. Uno de los hitos de la epidemiología y del control de las infecciones fue el estudio de la fiebre puerperal realizado por Semmelweis, quien demostró que los médicos que no se lavaban las manos llevaban la infección desde la sala de autopsias a las pacientes embarazadas.¹²⁷ Los médicos le respondieron con ostracismo; aún hoy, luego de un siglo, el personal médico no ha aprendido la simple lección de realizar el lavado adecuado de manos.

Complicaciones sistémicas de las infecciones genitales

Las infecciones de muchos sistemas de órganos pueden llegar a la sangre, lo que da como resultado una infección diseminada y una enfermedad metastásica distante. En las mujeres los agentes infecciosos genitales también se pueden diseminar a través de la cavidad peritoneal y las toxinas pueden producir efectos extragenitales luego de ser absorbidas por la mucosa. *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y muchos otros agentes que causan infecciones del aparato genital superior son patógenos que se diseminan por vía sanguínea. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* producen una perihepatitis conocida como síndrome de Fitz-Hugh-Curtis.^{140,326}

*Haemophilus ducreyi*²³¹ y los serotipos de *C. trachomatis* asociados con el linfogranuloma venéreo¹³² se diseminan a los ganglios regionales, donde producen lesiones edematosas, dolorosas y que supuran denominadas bubones (como en la peste bubónica). Además, los granulomas del linfogranuloma venéreo pueden hallarse en la mucosa rectal en individuos que

practicar coito anal receptivo.²⁰⁹ El granuloma inguinal, también conocido como donovanosis, no causa linfadenopatía regional,¹⁴ pero algunas variantes de la infección pueden producir cicatrices y dar como resultado un bloqueo linfático, linfedema e incluso elefantiasis de los genitales externos.²⁵¹ Rara vez se observa donovanosis extragenital en alguna otra parte del cuerpo.²⁵¹ Por último, como ya se mencionó, el virus del herpes simple migra a través de los nervios periféricos a los ganglios sacros. La reactivación del virus puede dar como resultado meningitis aséptica y también enfermedad genital recurrente.

Las infecciones genitales pueden, además, afectar al feto y al recién nacido. Algunos agentes infecciosos, principalmente los virus, atraviesan la placenta e infectan al feto en desarrollo.²¹⁷ Estas infecciones congénitas incluyen el virus de la rubéola, citomegalovirus, parvovirus, virus de la varicela zóster y HIV y también *Toxoplasma gondii* y *Treponema pallidum*. Otros agentes infectan al neonato durante el parto vaginal (o en el útero si una infección ascendente causa corioamnionitis). Estos agentes infecciosos, principalmente bacterias, incluyen *Neisseria gonorrhoeae* (conjuntivitis), *Chlamydia trachomatis* (conjuntivitis y neumonía neonatal) y otros agentes asociados con sepsis neonatal, predominantemente virus del herpes simple,¹⁴¹ *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.¹¹⁹

Diagnóstico de las infecciones genitales

DIAGNÓSTICO DE URETRITIS, CERVICITIS Y VAGINITIS

Uretritis y cervicitis. La estrategia tradicional de diagnóstico de la uretritis gonocócica es examinar un frotis teñido con la tinción de Gram para la búsqueda de diplococos gramnegativos intracelulares con forma de bicocho. A pesar de que el síntoma característico de presentación en las mujeres puede ser una secreción uretral, las manifestaciones clínicas suelen ser más complicadas y pueden presentarse diferentes grados de cervicitis exudativa, vaginitis, salpingitis y enfermedad inflamatoria pelviana. Para establecer el diagnóstico en una mujer no es suficiente el examen de un frotis de exudado cervical o uretral teñido con tinción de Gram, ya que la morfología y las características de tinción de otras especies bacterianas imitan a los gonococos. Por lo tanto, la tinción de Gram se recomienda sólo para los hombres con secreción uretral.¹³⁰

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento del agente etiológico en cultivo o la demostración de antígenos o de ácidos nucleicos bacterianos. Se recomienda el cultivo (una muestra con documentación en custodia) cuando se considera abuso sexual o que puedan surgir probables preguntas medicolegales debido a la absoluta especificidad de este enfoque. Las estrategias de diagnóstico molecular han superado a la detección de antígenos. El diagnóstico molecular es más sensible que el cultivo de *C. trachomatis* y equivalente al de *N. gonorrhoeae*.¹³⁰

Vaginitis. El método más rápido y económico para el diagnóstico de las infecciones vaginales es una preparación en fresco de las secreciones. Es posible detectar levaduras de especies de *Candida*, *Trichomonas vaginalis* móviles (sólo si la muestra se examina enseguida) y las células claves de la vaginosis bacteriana a través del examen microscópico de una gota de secreción sin teñir. La vaginosis bacteriana puede diagnosticarse de varias maneras. Es probable que los niveles elevados de actividad de sialidasa en la secreción vaginal sean el resultado de la actividad enzimática de las especies de *Bacteroides* y de *Prevotella*.³⁰ La elevación del pH de la secreción vaginal por encima de 4,5 junto con alta cantidad de *G. vaginalis* (determinada por medio de una sonda específica de DNA)^{24,255} son otros

marcadores útiles para confirmar el diagnóstico. Cook y cols.²⁴ encontraron que la persistencia de un pH elevado, los niveles altos de poliaminas y de ácidos grasos en la secreción vaginal y los recuentos bajos de células claves de la vaginosis eran anomalías residuales valiosas para predecir la recurrencia de vaginosis bacteriana. Las células claves de la vaginosis son células del epitelio vaginal recubiertas con bacterias que le producen un cambio en su índice de refracción; son el resultado de una flora vaginal alterada presente en la vaginosis bacteriana. Se describieron porcentajes de falsos positivos tan altos como 18,5% debido a que otras bacterias también pueden adherirse a las células epiteliales. Se describió un 10% de falsos negativos por la inhibición de la unión de las bacterias a la superficie celular por acción de la IgA. Sin embargo, cuando la prueba de células claves de la vaginosis se combina con la prueba de producción de aminas (*whiff test*), se logra un valor predictivo negativo del 99%, adecuado para descartar vaginosis bacteriana en pruebas de cribado. La producción de aminas se detecta mezclando volúmenes iguales de secreción genital y KOH al 10%; la percepción de "olor a pescado" indica un resultado positivo.¹³² El examen microscópico de las células claves de la vaginosis se puede realizar con un montaje húmedo o con un frotis teñido, utilizando las tinciones de Papanicolaou (Pap) o de Gram. También es útil para el diagnóstico la observación en el cambio de la flora de bacilos grampositivos característicos (especies de *Lactobacillus*) a flora mixta.¹⁵¹ Como ya se analizó, el cultivo no es útil para el diagnóstico de vaginosis. Por extensión, tampoco lo son los métodos enzimáticos o moleculares para demostrar ciertas bacterias seleccionadas como *G. vaginalis*.

Si no es posible examinar una muestra rápidamente, existe un método conveniente y sensible para el diagnóstico de las infecciones por *T. vaginalis*. El InPouch TV Test® (Biomed Diagnostics, White City, OR) consiste en un medio nutritivo en una bolsa plástica. Después de colocar la secreción vaginal, la bolsa se sella. Luego, puede examinarse en forma inmediata como una muestra húmeda o incubada para la observación periódica posterior de los trofozoitos móviles. A pesar de que es menos sensible que el cultivo o que una preparación húmeda (en la cual la movilidad de los parásitos facilita su detección), los tricomónidos pueden visualizarse con tinción de Gram o de Pap.

El cultivo de los patógenos bacterianos tiene un papel limitado en el diagnóstico de vaginitis. En las pacientes con infecciones persistentes o recurrentes, se puede utilizar el cultivo de hongos para poner en evidencia un pequeño número de levaduras que no se observaron en el examen directo del frotis.

DIAGNÓSTICO DE ÚLCERAS GENITALES Y VERRUGAS VENÉREAS

El diagnóstico de úlceras genitales puede realizarse por microscopia directa, microscopia de inmunofluorescencia, métodos moleculares o cultivo, según el microorganismo y la situación clínica. Se puede tomar una muestra de las úlceras herpéticas para cultivo viral o para demostrar la citopatología característica. El virus del herpes simple produce células gigantes multinucleadas con inclusiones intracelulares, que pueden visualizarse luego de una tinción de Wright (o tinción de Wright-Giemsa), tinción hematoxilina-eosina o tinción de Pap (prueba de Tzanck). Como alternativa, se pueden utilizar reactivos de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa para teñir antígenos virales en las células epiteliales o para demostrar la presencia del antígeno en un enzimoanálisis.¹⁶⁷

Los cuerpos de Donovan del granuloma inguinal pueden visualizarse (con dificultad) mediante la tinción de las bacterias intracelulares en las células mononucleares, utilizando la tinción de Wright (o una equivalente), hematoxilina-eosina (utilizada principalmente para los estudios histológicos de las biopsias) o la tinción de Pap.^{61,233} La técnica clásica para el diagnóstico del chancroide utiliza agar sangre de conejo que no se encuentra disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico microbiológico.¹⁰⁹ Por fortuna, *Haemophilus ducreyi* puede cultivarse sobre una variante del agar chocolate enriquecido que se utiliza para *Neisseria gonorrhoeae*.^{39,109} Si no se cuenta con el medio modificado, se puede sustituir con agar chocolate enriquecido. *Haemophilus ducreyi* es lábil y no sobrevive bien durante el transporte. Sin embargo, si se utiliza un medio de transporte estándar como el medio de Amies y se refrigera la muestra, se puede aislar la bacteria con aceptable exactitud.⁶⁰ El linfogranuloma venéreo suele diagnosticarse por serología, pero se puede cultivar *Chlamydia trachomatis* a partir de material obtenido de un ganglio linfático regional que supura.²⁴⁰

El diagnóstico de sífilis primaria se realiza casi siempre por medio del microscopio de campo oscuro sobre la muestra obtenida por raspado de la base de la úlcera.²⁵¹ El raspado debe examinarse de inmediato porque la visualización depende de la viabilidad de los treponemas móviles. También se cuenta con reactivos para inmunofluorescencia para *Treponema pallidum* producidos por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), pero no está asegurada su disponibilidad continua. Con estos reactivos de inmunofluorescencia es posible teñir un frotis seco luego de su transporte al laboratorio.¹²⁵ También se puede realizar el diagnóstico serológico, pero aun el procedimiento de la fluorescencia para treponema previa absorción del anticuerpo (FTA-ABS) puede ser negativo en las primeras etapas de la infección. Si se considera una sífilis y las pruebas iniciales son negativas, se debe realizar el seguimiento del paciente con pruebas serológicas estándares.

El diagnóstico de las verrugas venéreas debe efectuarse con técnicas moleculares ya que el virus del papiloma humano no crece en cultivo celular y las respuestas serológicas no son confiables. Si se sospecha una verruga venérea se debe avisar al laboratorio para que realice la determinación de los genotipos de "bajo riesgo" (para neoplasia cervical), sobre todo los tipos 6 y 11.¹⁰⁰ Los genotipos de riesgo moderado a alto se investigan, más a menudo, como forma de evaluar las etapas precursoras del cáncer cervical.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS GENITALES

Recolección de muestras uretrales masculinas. Cuando la secreción uretral es escasa y no se observan diplococos intracelulares en una muestra al azar, puede ser útil la recolección de una muestra a la mañana temprano antes de orinar. El exudado puede obtenerse del orificio uretral mediante la estimulación por medio del masaje suave de la uretra; si el material no se obtiene fácilmente, se puede introducir la punta de un pequeño hisopo de algodón, rayón o Dacron® con soporte de plástico o de aluminio 3 a 4 cm en la uretra anterior. El hisopo debe dejarse en el lugar durante algunos segundos para que las fibras se embeban en el exudado. Si se está obteniendo una muestra para el cultivo de *Chlamydia trachomatis*, el hisopo debe rotarse 360° para obtener algunas células epiteliales.

Los fabricantes proporcionan equipos de recolección diseñados para cada ensayo comercial. Si se utilizan métodos de amplificación de ácidos nucleicos, la orina es la muestra adecuada más simple de obtener y más aceptable para el paciente

que el hisopado uretral. Se recolecta la primera parte de la orina, que contiene las células epiteliales y las bacterias que han sido arrastradas, a diferencia de la recolección de la muestra de orina del chorro medio que se requiere para el diagnóstico de cistitis. Los fabricantes de los equipos varían en cuanto a las especificaciones que recomiendan para el cultivo.

Recolección de muestras genitales femeninas. En las mujeres con signos y síntomas de infección genital aguda es común obtener muestras del cuello uterino y de la uretra. Las muestras cervicales se recolectan con la ayuda de un espéculo luego de eliminar el moco cervical con un hisopo grande. Para obtener la muestra, se recomienda la utilización de un hisopo más pequeño con un cabo de plástico y una punta de Dacron® o poliéster.¹⁶⁸ La punta del hisopo se inserta unos milímetros pasando el orificio cervical, se rota con firmeza para obtener el exudado y las células cervicales y se retira con cuidado de no tocar las paredes laterales del conducto vaginal. Las muestras uretrales se pueden obtener mediante la estimulación por medio de un masaje suave de la uretra seguida de la recolección de la secreción o, si no se observa secreción, insertando un pequeño hisopo urogenital en la uretra y dejándolo en el lugar durante unos segundos para saturar las fibras con el exudado.

Al igual que en el caso de los hombres, la muestra de orina es satisfactoria para el diagnóstico de infección en las mujeres. A pesar de que es algo menos sensible que las muestras cervicales, es menos invasiva y puede obviarse la necesidad de un examen con espéculo. Las recomendaciones específicas varían según el fabricante.

Las secreciones vaginales pueden aspirarse o recolectarse con un hisopo. Es difícil obtener muestras del tracto superior desde abajo sin contaminar la muestra con flora vaginal. Las muestras de endometrio se obtienen mejor por medio de la inserción de un hisopo a través de un catéter perforado angosto que se introduce en el canal cervical, como se muestra en la figura 2-4. Mediante esta técnica, hay menor posibilidad de contaminación de la muestra con secreciones del orificio cervical o del conducto vaginal.¹⁷⁵ Para la obtención de muestras de las trompas de Falopio o de los ovarios, es necesaria una laparoscopia o un abordaje quirúrgico.

Recolección de muestras de úlceras genitales. Las úlceras deben limpiarse para eliminar los desechos de la superficie y las bacterias contaminantes. Para el examen de campo oscuro o la preparación de frotis, se debe utilizar una hoja de bisturí para raspar la base de la úlcera y transferir el material a un portaobjetos. Para el cultivo se puede utilizar el lavado de la base de la úlcera o un hisopo de algodón.¹⁰⁰ Si se encuentran vesículas intactas, se puede utilizar un hisopo para recolectar el líquido para las preparaciones de Tzanck o para el cultivo del virus del herpes. Los hisopos para el cultivo bacteriano pueden colocarse en los medios de transporte de Amies o de Stuart.

Infecciones óseas y de las articulaciones

Presentación clínica

Las infecciones de los huesos y de las articulaciones pueden presentarse como consecuencia de la diseminación de un patógeno microbiano a través del torrente sanguíneo, por diseminación directa a partir de una infección adyacente o por introducción desde el ambiente por un trauma. El microorganismo patógeno más común en la diseminación bacteriémica es *Staphylococcus aureus*, pero otros gérmenes pueden también alcanzar el esqueleto por esta ruta, como *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) y los agentes de micosis sistémica.

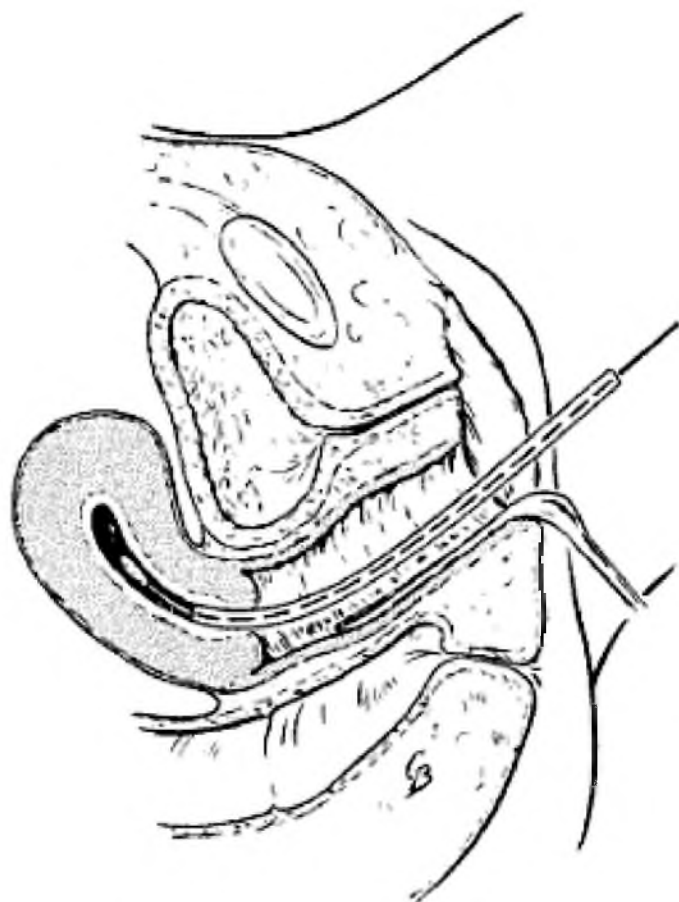


Figura 2-4 Técnica de cultivo de endometrio. A través de un espéculo, se inserta un catéter en la abertura cervical y se introduce un hisopo por el catéter dentro de la cavidad endometrial. Esto ayuda a evitar la contaminación del hisopo por contacto con la pared vaginal o la abertura cervical.

como *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis*. Las infecciones que se originan en el tejido adyacente son casi siempre polimicrobianas e incluyen bacterias anaerobias. Las lesiones traumáticas reflejan la flora del ambiente que se introdujo en el momento de la lesión.

Los síntomas de la artritis séptica son fiebre, dolor y edema de la(s) articulación(es) afectada.²⁵⁷ La osteomielitis puede asociarse con dolor local y la sensibilidad a la presión y con restricción de los movimientos.¹⁵⁷ Se pueden presentar en ambos sitios síntomas sistémicos. Si el hueso afectado pertenece a un miembro, el problema es evidente. En la osteomielitis vertebral aguda se presenta a menudo sensibilidad a la presión puntual sobre la vértebra afectada. Sin embargo, si la infección es subaguda puede haber dolor de espalda no localizado o ningún síntoma local, sobre todo en los ancianos.⁵⁷ La osteomielitis puede hacerse crónica, mientras que es menos probable que la artritis séptica llegue a la cronicidad.

Diagnóstico de las infecciones óseas y de las articulaciones

El diagnóstico de osteomielitis debe hacerse por medio de la biopsia quirúrgica del hueso afectado. Se puede aspirar el líquido de una articulación séptica para examen microscópico o para cultivo. El líquido articular coagula con facilidad; por lo tanto, se necesitan estrategias especiales. El líquido puede inocularse directamente en frascos de hemocultivo^{123,142} o dentro del sistema Isolator[®],³³¹ un método para el aislamiento de un único patógeno. En forma alternativa, puede inocularse dentro de un tubo estéril que contenga sulfonato sódico de polianetol

(SPS), el anticoagulante que suele agregarse a los frascos de hemocultivo; luego del transporte al laboratorio, el líquido sin coagular se puede procesar de la manera habitual. Si en el laboratorio se recibe un líquido articular coagulado, no se puede realizar el recuento de células, pero se puede homogeneizar el coágulo para realizar la tinción de Gram y el cultivo. Es esencial incluir agar chocolate cuando se cultiva líquido articular ya que los patógenos predominantes son las bacterias con requerimientos nutricionales especiales (*fastidious*). El hemocultivo puede ser útil para el aislamiento de patógenos en las infecciones que se piensa que se originaron por una bacteriemia.³⁷ En ocasiones, el aislamiento de *Staphylococcus aureus* de sangre en ausencia de un origen claro es el primer indicio de osteomielitis vertebral.

Infecciones del sistema nervioso central

Las infecciones más comunes del sistema nervioso central (SNC) son encefalitis (cerebro), mielitis (médula espinal), encefalomielitis y meningitis (membranas que recubren el cerebro y la médula espinal). A menudo, la meningitis y la encefalitis (meningoencefalitis) son parte del mismo proceso infeccioso. Con menor frecuencia, las infecciones de los tejidos blandos (p. ej., absceso epidural) y de los huesos (osteomielitis) adyacentes pueden afectar el sistema nervioso central. Las infecciones del sistema nervioso periférico, entre las cuales se encuentran la neuroborreliosis (una variante de la enfermedad de Lyme), la lepra y la tuberculosis, son poco frecuentes.

Meningitis

Los pacientes con meningitis aguda pueden experimentar, en un comienzo, un síndrome similar a la gripe con dolor y rigidez del cuello, dolor de cabeza, fiebre baja y letargia. La alteración inesperada del estado mental en pacientes ancianos, débiles o inmunosuprimidos puede ser el único indicio de la infección. Se pueden observar diversos grados de confusión, agitación, desorientación o coma. Los signos de irritación meníngea son el signo de Brudzinski positivo (resistencia a la flexión pasiva del cuello) y el signo de Kernig positivo (incapacidad de extender las piernas cuando el muslo se encuentran en un ángulo de 90° con respecto al tronco). La meningitis subaguda o crónica causada por tuberculosis o infecciones fúngicas puede presentarse con signos de presión intracraneana aumentada (edema papilar, náuseas y vómitos) y cambios mentales, como desorientación, confusión, cambios en la personalidad y estupor.¹⁸⁴

El líquido cefalorraquídeo normal es cristalino como el agua, presenta menos de cinco linfocitos por mililitro, con una concentración de glucosa de entre 45 y 100 mg/dL según el valor de glucemia, una concentración de proteínas entre de 14 y 45 mg/dL y es estéril. Las alteraciones clásicas atribuibles a la meningitis se resumen en el cuadro 2-7. Las infecciones bacterianas, que suelen acompañarse por un recuento alto de neutrófilos polimorfonucleares, a menudo se denominan meningitis sépticas o purulentas, mientras que las infecciones sin una respuesta pronunciada de neutrófilos (micobacterianas, virales y la mayoría de las infecciones fúngicas) se denominan meningitis asépticas.⁵³ Si bien el término común "meningitis espinal" no es inexacto, no es informativo porque es poco usual que se infecte un único segmento de las meninges; se lo utiliza a menudo para la meningitis meningocócica, pero obviamente cualquier agente puede afectar las meninges raquídeas.

Cuadro 2-7 Alteraciones del líquido cefalorraquídeo en la meningitis

PARÁMETRO	BACTERIAS	MICOBACTERIAS	HONGOS	VIRUS	EXCEPCIONES
Neutrófilos polimorfonucleares	Aumentados o muy aumentados	Aumentados	Aumentados	Al principio ausentes a elevados; más tarde casi siempre ausentes	Pueden estar ausentes en <i>Cryptococcus neoformans</i>
Monocitos	Variable	Variable	Variable	Usualmente presentes	
Glucosa	Baja	Baja	Baja	Normal	Puede ser baja en infecciones por virus del herpes simple
Proteína	Alta	Alta	Alta	Elevada	

Los agentes infecciosos pueden acceder al SNC a través del torrente sanguíneo o por diseminación directa de estructuras adyacentes. El virus del herpes y el virus de la rabia llegan al SNC por diseminación retrógrada ascendente por los nervios periféricos desde los ganglios espinales, ruta poco usual para otros agentes.

La meningitis tiene mayor prevalencia en ciertos grupos de edades o en pacientes con distintas enfermedades subyacentes. En el recién nacido suele ser el resultado de una infección adquirida intraútero o durante el parto vaginal.^{1,333} Los microorganismos aislados más a menudo son *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*; con menor frecuencia se aíslan *Listeria monocytogenes*, varios miembros de *Enterobacteriaceae*, especies de *Pseudomonas*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias anaerobias; por razones que se desconocen, *Citrobacter koseri* (*diversus*) puede causar una meningoencefalitis devastadora en el recién nacido.¹⁰⁰ El virus del herpes simple tipo 2 produce sepsis y meningitis en recién nacidos luego de su adquisición durante el parto vaginal.²⁸⁶

Neisseria meningitidis causa infecciones en todos los grupos etarios. *Haemophilus influenzae* tipo B es la causa más común de meningitis bacteriana aguda en los niños de entre 6 meses y 5 años, pero esta infección ha sido casi erradicada por una vacuna eficaz. La meningitis por *Streptococcus pneumoniae* se produce a partir de la bacteriemia o de la diseminación de la infección desde los senos adyacentes o del oído medio.

S. pneumoniae es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en los adultos. *N. meningitidis* es también común en los adultos jóvenes. En los ancianos, la meningitis sigue "las edades del hombre de Shakespeare", los patógenos del período neonatal hacen su reaparición. Además, se presenta una alta prevalencia de *E. coli* y de otros bacilos gramnegativos¹⁸⁴ y *S. agalactiae* es también un factor importante.⁷²

La causa principal de las meningitis virales en todas las edades son los enterovirus.²²³ Un gran número de virus transmitidos por medio de garrapatas y mosquitos (virus transmitidos por artrópodos o arbovirus) son causas infrecuentes de enfermedades del SNC, aunque la reciente aparición del virus del Nilo Occidental en los Estados Unidos ha despertado gran interés.²⁰¹

Cryptococcus neoformans, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* causan formas indoloras o crónicas de meningitis en individuos sanos y en aquellos con las defensas alteradas. La meningitis aséptica recurrente (meningitis de Mollaret) es causada típicamente por el virus del herpes simple,²⁸⁵ pero el diagnóstico debe realizarse mediante técnicas moleculares. *E. coli*, *K. pneumoniae* y los estafilococos se ais-

lan muy comúnmente de pacientes con meningitis postraumática o posquirúrgica. Alrededor del 50% de las meningitis agudas asociadas con derivaciones ventriculares (*shunt*) son causadas por estafilococos coagulasa-negativos.¹⁸⁴

Naegleria fowleri, una ameba de vida libre, causa meningoencefalitis necrosante sobre todo en las personas que nadan en aguas cálidas y saladas.¹⁸⁶

Encefalitis y abscesos cerebrales

Las infecciones más serias del SNC son los abscesos cerebrales y la encefalitis.^{176,224,321} La causa más común de encefalitis son los virus, aunque también la producen otros patógenos, como *Mycoplasma pneumoniae*. Se desconoce el agente etiológico de la mayoría de los síndromes encefalíticos.⁹⁰ El virus del herpes simple tipo 1 es la causa documentada más frecuente de las encefalitis esporádicas. El virus se reactiva y viaja de manera ascendente por el nervio olfatorio hasta el lóbulo temporal del cerebro, donde produce una encefalitis necrosante, distintiva por su ubicación anatómica. Es poco probable realizar el diagnóstico en ausencia de evidencia de enfermedad del lóbulo temporal o de pleocitosis (respuesta inflamatoria) en el LCR, aunque se han documentado excepciones, sobre todo en los niños.¹⁴⁵

El virus de la varicela zóster rara vez causa una encefalitis localizada, casi siempre ocurre en un paciente con zóster oftálmico (una reactivación de la infección, a menudo varios años después de la varicela). El virus viaja en forma ascendente por el quinto par craneal y causa una infección necrosante, muchas veces con vasculitis y presumiblemente con pequeños infartos vasculares.¹⁴³ Incluso, la presentación clínica puede ser similar a la de un accidente cerebrovascular no infeccioso. Otros tipos de encefalitis esporádicas o epidémicas afectan el cerebro en forma difusa; la información clínica y radiográfica no es diagnóstica de una etiología en particular, por lo cual debe realizarse mediante técnicas microbiológicas o moleculares. La rabia, por fortuna muy poco común, suele ser mortal; si se asocia con la mordedura de un animal, el diagnóstico es obvio, pero dado que no siempre el contacto con un animal es evidente es posible que el diagnóstico no pueda realizarse hasta el momento de la autopsia.²⁰⁵

Muchas veces se aíslan bacterias anaerobias de los abscesos. Las especies que se encuentran más a menudo son: estreptococos anaerobios, *Porphyromonas melaninogenica*, especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Eubacterium* y *Propionibacterium acnes*. Las bacterias aerobias que se aíslan con mayor frecuencia incluyen estreptococos α/γ -hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y

bacilos gramnegativos, *Enterobacteriaceae* y microorganismos no fermentativos. También pueden generar abscesos cerebrales las especies de *Nocardia* y el hongo dematiáceo *Cladosporium bantianum* (*Xylolypha bantiana*) (antes *Cladosporium trichoides*).²³⁰ Una encefalitis necrosante puede surgir como resultado de la extensión de hongos cigomicetos desde un seno hacia el interior del ojo o el cerebro, sobre todo en pacientes con neoplasia o inmunosupresión o en pacientes diabéticos que presentan cetoacidosis.¹⁷²

Los abscesos cerebrales pueden ser el resultado de la diseminación bacteriana, en particular en pacientes con endocarditis bacteriana (por lo general un único microorganismo),¹⁹⁹ o en forma directa desde un seno adyacente o del nido medio (a menudo polimicrobiana) infectados.²³⁴ *Streptococcus viridans* en su mayoría se aíslan como parte de una infección polimicrobiana, pero un estreptococo en particular, conocido como "*Streptococcus milleri*" o como grupo de *Streptococcus anginosus/constellatus*, causa abscesos como un patógeno único en varios órganos, incluido el cerebro.³⁴

Numerosas infecciones parasitarias pueden causar infecciones necrosantes o una lesión masiva cerebral. Estos parásitos son las especies *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre,¹⁶⁶ *Taenia solium* y otros cisticercos,²⁵⁴ y *Toxoplasma gondii*.⁸³ El "paludismo cerebral", causado por *Plasmodium falciparum*, es una complicación a menudo mortal en la cual se bloquean los capilares cerebrales.^{132,265}

Diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de SNC para cultivo incluyen el LCR (obtenido por punción subdural, aspiración ventricular o punción lumbar), los abscesos cerebrales (obtenidos por aspiración) y el tejido cerebral (obtenido por biopsia quirúrgica). En la figura 2-5 se ilustra la técnica de punción lumbar.

La muestra más común de SNC que se recibe en el laboratorio es el LCR obtenido por punción lumbar. Por lo general, se envían tres tubos separados que contienen LCR:

- Tubo 1 para el recuento de células y las tinciones diferenciales.
- Tubo 2 para la tinción de Gram y el cultivo.
- Tubo 3 para la determinación de proteínas y glucosa o para estudios especiales, como VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*, una prueba serológica para sífilis), antígeno de criptococos o citología, según la situación clínica.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE LAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Se debe implementar una estrategia ordenada para el procesamiento y el cultivo de las muestras de LCR. El examen de los frotis de sedimento de LCR teñidos y la realización de las pruebas de detección directa de antígenos pueden ser útiles para establecer un diagnóstico presuntivo y proporcionar una guía para la selección de los medios de cultivo. A menudo se pueden detectar los microorganismos en los frotis de LCR teñidos con tinción de Gram o con azul de metileno si se encuentran en concentraciones de al menos 10^4 - 10^5 /mL. La tinción con azul de metileno parece ser más sensible que la tinción de Gram, pero la observación de la reacción de Gram es importante. Por lo tanto, se recomienda la preparación en paralelo de los frotis teñidos con tinción de Gram y con azul de metileno. Muchas veces, los microorganismos gramnegativos se observan mejor en los frotis teñidos con azul de metileno porque la tinción azul intensa de las bacterias facilita su diferenciación respecto de

los desechos del fondo.⁵⁸ La safranina tiñe el fondo de rojo en la tinción de Gram, lo cual tiende a oscurecer cualquier bacteria que se tiñe de rosa. El agregado de 0,05% de fucsina al contracolorante safranina mejora la tinción de los microorganismos gramnegativos. Smalley y Bradley²⁶¹ sugirieron que la prueba de esterasa leucocitaria (EL) puede sustituir el recuento celular en los líquidos corporales en los cuales se sospecha la presencia de bacterias. En un estudio que incluyó 63 líquidos peritoneales positivos por cultivo, el 87,5% de ellos mostró una reacción EL positiva. En seis de las nueve muestras de líquidos peritoneales positivas por cultivo y negativas para la prueba EL, se aislaron sólo unas pocas colonias de estafilococos coagulasa-negativos, que resultaron aislamientos de significado clínico dudoso. DeLozier y Auerbach⁶⁴ informaron una sensibilidad global del 84,4% y una especificidad del 98,1% al utilizar la prueba de EL en tira de inmersión (tira reactiva) en muestras de LCR recolectadas de 800 pacientes con sospecha de meningitis. La sensibilidad de la prueba de EL en los casos de meningitis bacteriana con cultivo positivo fue sólo del 73%. Estos autores concluyeron que la prueba de EL es un ensayo adicional, pero que no sustituye al recuento de células ni a la determinación de parámetros químicos en el LCR en la evaluación inicial de la meningitis bacteriana.

DETECCIÓN DIRECTA DE ANTÍGENOS Y DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El entusiasmo inicial del diagnóstico rápido de la meningitis bacteriana mediante la detección de antígenos ha sido atemperado por la experiencia más reciente.²²⁹ Cuando se realizaron las pruebas de aglutinación de partículas de látex para *H. influenzae* tipo b, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis* y *S. pneumoniae* en 1 540 muestras de LCR obtenidas de pacientes con sospecha de meningitis aguda bacteriana, se detectó antígeno en sólo 27 muestras.²²² Los resultados positivos de detección antigénica son sólo de ayuda en el tratamiento de los recién nacidos con infecciones por estreptococos del grupo B. Estos autores consideraron que la prueba de látex no presentaba una relación costo-eficacia favorable. Además, los ocasionales falsos positivos de la aglutinación dan como resultado un inaceptable escaso valor predictivo de un resultado positivo. La utilización de estas pruebas disminuyó de manera notable y su uso no se recomienda.

Por el contrario, la detección directa de antígeno de criptococos en el LCR es casi tan sensible como el cultivo y ha reemplazado en la mayoría de los laboratorios a la prueba de tinta china que carece de sensibilidad. Se han creado pruebas de aglutinación de partículas de látex y equipos de enzimo-inmunoanálisis. En un estudio que analizó 218 muestras de LCR, entre las cuales se incluyeron 16 casos retrospectivos y 6 prospectivos de criptococosis conocida, se utilizaron dos equipos de aglutinación de partículas de látex con un 100% de sensibilidad en comparación con el cultivo.²³² En ocasiones se observaron pruebas falsas positivas, como consecuencia, al menos en parte, de la presencia de factores similares al factor reumatoideo en las muestras de LCR. El tratamiento de la muestra con pronasa disminuyó las reacciones inespecíficas, pero no las eliminó por completo.²³³ El tratamiento con pronasa aumenta la sensibilidad de las pruebas de aglutinación de partículas de látex en muestras de suero pero no en muestras de LCR.¹⁰⁷

Se han creado técnicas moleculares para el diagnóstico de ciertas infecciones, sobre todo las causadas por virus del herpes simple y enterovirus.^{240,296} A estas pruebas se las está empujando a considerar el procedimiento de referencia debido a su

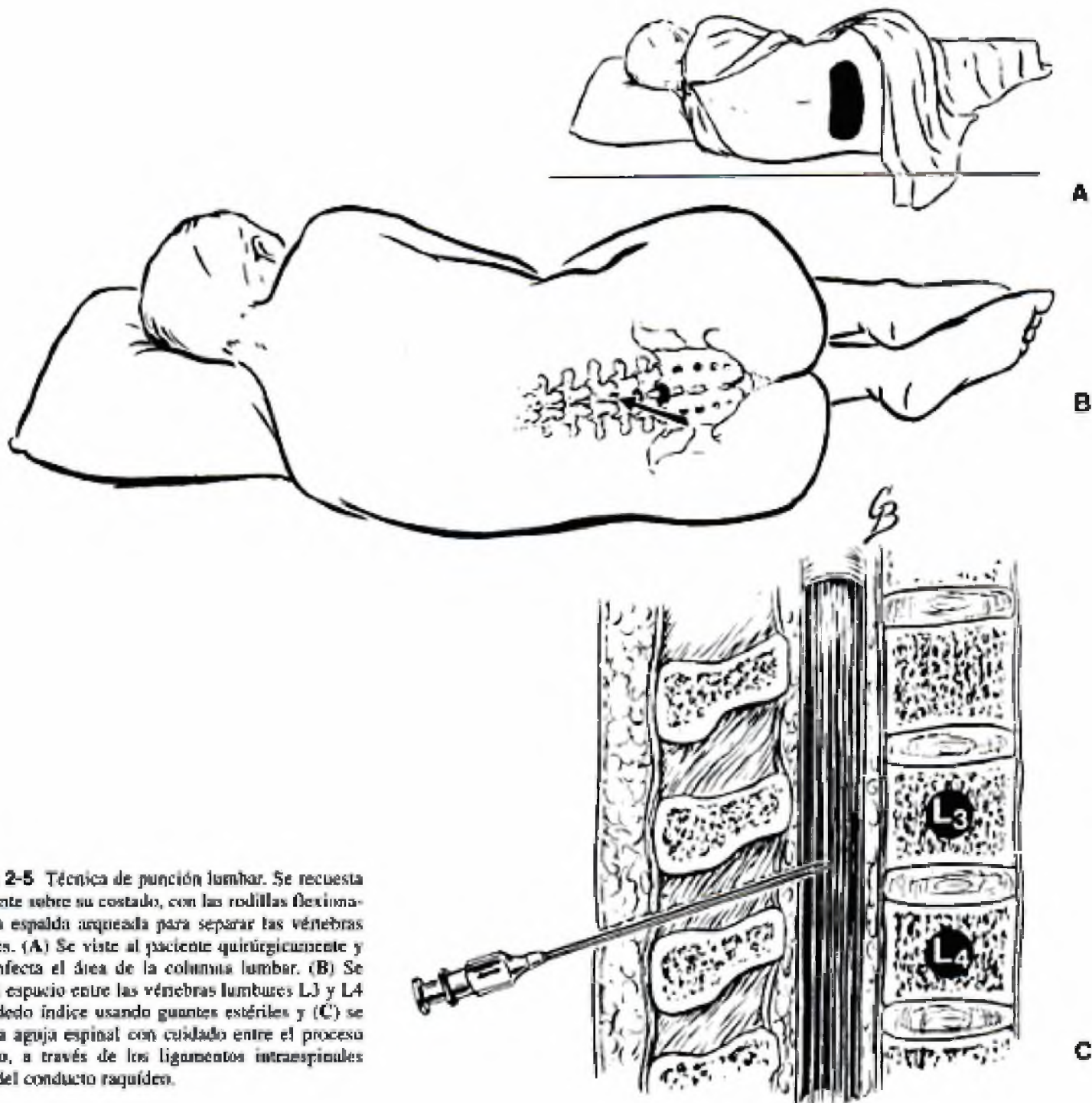


Figura 2-5 Técnica de punción lumbar. Se recuesta al paciente sobre su costado, con las rodillas flexionadas y la espalda arqueada para separar las vértebras lumbares. (A) Se viste al paciente quirúrgicamente y se desinfecta el área de la columna lumbar. (B) Se palpa el espacio entre las vértebras lumbares L3 y L4 con el dedo índice usando guantes estériles y (C) se dirige la aguja espinal con cuidado entre el proceso espinoso, a través de los ligamentos intraspinales dentro del conducto raquídeo.

mayor sensibilidad y rapidez de detección, aunque aún no son habituales en los laboratorio de diagnóstico.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La serología es una herramienta diagnóstica de utilidad para el virus del Nilo Occidental. La detección de IgM en el LCR es el método de elección en los laboratorios donde la prueba se realiza bajo estricto control.^{170,216} La serología tiene un papel secundario para otros agentes etiológicos de encefalitis viral, como otros virus transmitidos por artrópodos, que son difíciles de cultivar. Lamentablemente, carece de utilidad en las infecciones más comunes, como las causadas por virus del herpes simple, enterovirus, hongos y bacterias.

DIAGNÓSTICO POR CULTIVO

El cultivo es el procedimiento de referencia para hongos y bacterias. Sin embargo, el cultivo de virus a partir de LCR en

los casos de encefalitis se encuentra limitado por la disponibilidad restringida, el lento crecimiento de los enterovirus y la incapacidad de aislamiento del virus del herpes simple. Para los agentes virales se prefieren los métodos moleculares. La pregunta más importante en el caso de la meningitis es si se encuentra presente un agente bacteriano que podría ser tratado con antibióticos; es consecuencia, el cultivo bacteriano es esencial.

Cuando se preparan las muestras de LCR para cultivo, deben centrifugarse para concentrar las bacterias que puedan estar presentes. También se recomienda la centrifugación para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los casos en los que se sospecha meningitis tuberculosa. Se debe procesar un volumen total de al menos 6 mL (que no necesariamente debe recolectarse todo de una sola vez) para aumentar la probabilidad de aislar micobacterias.²⁰¹ Como una alternativa a la centrifugación para el aislamiento de criptococos, el LCR puede pasarse a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore®, Bedford MA) con el objeto de concentrar las levaduras. Los filtros

deben colocarse boca abajo sobre la superficie del agar y moverse a una nueva ubicación cada tres o cuatro días para permitir la detección del crecimiento de colonias.

Gray y Fedorko publicaron una excelente revisión sobre las estrategias para el diagnóstico de laboratorio de la meningitis.¹⁹¹

Heridas, abscesos y celulitis

Presentación clínica

Uno de los indicadores fundamentales de la sepsis local es la acumulación de pus dentro de un absceso o que exuda desde una fístula o de una superficie mucocutánea. También pueden encontrarse diferentes grados de enrojecimiento, dolor y tumefacción. Las infecciones de las heridas externas incluyen las asociadas con una lesión traumática o con úlceras por decúbito (escaras),¹⁶⁰ picaduras o mordeduras de animales o de personas,^{16,283} quemaduras^{13,179} o cuerpos extraños en la piel o las mucosas.

Las heridas internas y los abscesos pueden asociarse con apendicitis, colecistitis, celulitis, infecciones dentales, osteomielitis, empiema, artritis séptica, sinusitis u otras infecciones internas. Muchos de estos procesos son intrahospitalarios (adquiridos en centros de salud), contraídos luego de procedimientos invasivos, manipulaciones quirúrgicas o colocación de prótesis. Otros derivan de la diseminación sanguínea a partir de sitios primarios de infección. Por último, puede existir la diseminación directa de bacterias desde sitios adyacentes de infección o por la rotura de una víscera, en especial, el intestino grueso. Las bacterias anaerobias suelen ser un problema cuando el sitio de infección se encuentra adyacente al intestino o cuando la herida está contaminada con flora fecal.²⁰²

Ciertas bacterias se asocian con situaciones clínicas particulares. *Pasteurella multocida* se encuentra en heridas causadas por mordeduras de animales.^{36,283} *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno común cuando se produce una herida penetrante en el pie en personas que usan zapatillas.¹²⁰ *Pseudomonas aeruginosa*, las especies de *Candida* y diversos hongos filamentosos representan un problema particular en las heridas por quemaduras;¹⁶⁴ además, el virus del herpes simple también puede causar infecciones serias en estos pacientes.⁶⁰ Las bacterias grampositivas aerobias (incluidos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*), las bacterias anaerobias estrictas y los bacilos gramnegativos aerobios suelen causar infecciones en los pacientes diabéticos.¹¹⁴

Muchas heridas y abscesos son polimicrobianos, sobre todo los originados por contaminación fecal, escaras e infecciones en pacientes diabéticos. Existe una considerable controversia acerca de la identificación y la realización del antibiograma de aislamientos múltiples, incluso si la muestra es una biopsia de tejido. Los problemas inherentes a la toma de la muestra dificultan la certeza de que todas las especies patógenas se hayan aislado. Un ejemplo instructivo de este fenómeno es un estudio sobre los abscesos, en el cual se realizaron cultivos múltiples de cada muestra durante un período de 24 horas; 11 de 37 cepas anaerobias totales no se aislaron de la siembra en placa inicial.¹² Por lo tanto, se puede instaurar una terapia empírica basada en los patógenos probables esperados en una situación clínica particular.²⁸

La celulitis es una infección del tejido blando que se disemina a través de los planos del tejido conectivo en lugar de producir una lesión circunscrita, como se presenta en los abscesos. A menudo es posible observar el enrojecimiento y sentir el

calor y la tumefacción por medio de la palpación de la piel que la cubre.²⁸¹ Los principales agentes etiológicos de la celulitis son los estafilococos y los estreptococos, pero en ciertas situaciones también pueden estar involucrados bacilos gramnegativos y bacterias anaerobias.

Diagnóstico de infecciones de heridas, abscesos y celulitis

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las heridas superficiales suelen estar colonizadas por bacterias ambientales; a menudo la muestra obtenida con un hisopo no refleja la verdadera causa del proceso de infección. Los métodos de elección para la recolección del material por examinar son la biopsia de tejido, el raspado de una herida que supura o el aspirado del líquido o pus loculado de la parte profunda de la herida. El sitio del cual se tomará la muestra para cultivo debe descontaminarse primero con jabón para cirugía y etanol al 70% o isopropanol, luego de lo cual la herida se lava bien con solución fisiológica estéril y se seca. Antes, para transportar la muestra se utilizaba la jeringa con la cual se realizaba el aspirado cubriendo la aguja con el capuchón. Este procedimiento se desaconseja debido al riesgo de transmisión sanguínea de algún virus mediante un accidente con la aguja. La aguja puede eliminarse en forma segura utilizando implementos diseñados para este propósito y reemplazarla por un capuchón de jeringa que no es cortopunzante. Si por algún motivo se prevé una demora superior a los 30 minutos para el procesamiento de la muestra, ésta deberá transferirse a un recipiente de transporte (véase cap. 1). Si se obtuvo una cantidad de líquido tan pequeña que toda la muestra se encuentra dentro de la aguja, se coloca con cuidado el capuchón, se lo asegura y se transporta la jeringa con la aguja en un recipiente a prueba de pinchaduras junto con una nota que aclare que dentro del contenedor hay una aguja. En el laboratorio, la aguja puede enjuagarse con caldo de cultivo para extraer el material por cultivar.

Si no se puede obtener el material con una aguja y una jeringa, se puede tomar una muestra de la superficie.²⁸ Si bien se utilizan comúnmente hisopos también se han utilizado paños y papeles de filtro. Se debe realizar una limpieza cuidadosa del sitio, como ya se describió (a pesar de que no todos los estudios demostraron una diferencia significativa en sus resultados entre heridas lavadas y no lavadas). Puede ser necesario separar los bordes de la herida con el pulgar y el índice de una mano (utilizando guantes estériles) o realizar un pequeño corte con una hoja de bisturí en un absceso cerrado antes de introducir la punta del hisopo en el interior de la lesión con la otra mano. Se debe tener la precaución de no tocar los bordes adyacentes de piel. Se coloca entonces de inmediato el hisopo en un recipiente apropiado de transporte. Es posible, pero poco probable, que en un cultivo de material obtenido de la superficie no se aísle una bacteria patógena que se halle en lo profundo de una herida; es mucho más probable que se aislen microbios colonizantes además de los patógenos verdaderos. Sin embargo, los hongos y los virus (sobre todo en las heridas por quemaduras) pueden aislarse sólo de biopsias de tejido.

Se puede intentar la aspiración de material de un área de celulitis con la inyección previa de solución salina estéril y sin ella, pero los resultados casi nunca son satisfactorios. Si bien las biopsias por sacabocados pueden proporcionar mejores resultados, la experiencia con este método es limitada.²⁸¹ Los hemocultivos no siempre son útiles en esta situación clínica.²¹¹ En general, se define la estrategia sobre la base del conocimiento empírico de los patógenos que se espera encontrar en una situación clínica determinada.

EXAMEN MICROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS

Se debe realizar la tinción de Gram a todas las muestras (véase cap. 1). Las claves morfológicas de la etiología pueden sugerir otros procedimientos diagnósticos más allá de los requeridos por el médico (p. ej., cultivos para bacterias anaerobias u hongos). Si se recibe una biopsia de tejido, el examen histológico debe incluir las tinciones para bacterias y hongos y el examen de una tinción de hematoxilina-eosina para la búsqueda de inclusiones virales.

CULTIVOS

Se deben utilizar medios selectivos y no selectivos enriquecidos para aislar las especies bacterianas eugónicas y con requerimientos nutricionales especiales. Si se obtuvo material de aspirado o tejido es adecuado utilizar cultivo para bacterias anaerobias.

El cultivo microbiológico cuantitativo se recomienda para los cultivos de heridas con el objetivo de determinar el significado de los aislamientos, predecir la probabilidad de una sepsis en una herida por quemadura y determinar la probabilidad de que la herida cicatrice fácilmente. El cultivo cuantitativo de una biopsia de tejido es complejo, oneroso e insume mucho tiempo; el tejido se debe pesar en una balanza analítica, homogeneizar en una cantidad conocida de caldo de cultivo, hacer diluciones en serie e inocular en múltiples placas de agar. Estas maniobras son difíciles de realizar en la mayoría de los laboratorios. Está claro que la infección por *Streptococcus pyogenes* es clínicamente importante, cualquiera que sea la cantidad de bacterias presentes.²³⁰ Los investigadores no han tenido un criterio unánime en el respaldo que le han dado a esta estrategia. El problema es aún más complicado debido a la evidencia de que una biopsia única no proporcionará un cuadro exacto de la flora microbiana de las heridas crónicas.²⁴⁵

Hay datos que avalan el uso de cultivos de superficie en lugar de biopsias.²⁸ De manera similar, los cultivos semicuantitativos (que se realizan de rutina mediante la siembra seriada en estrías en cuadrantes de placas de agar) han proporcionado información de que ésta es equivalente a las estrategias cuantitativas más dificultosas.⁴⁰ Sin duda, si no se aísla ningún microorganismo, un cultivo cualitativo brinda la misma información que un cultivo cuantitativo.

Infecciones oculares

Presentación clínica

Los agentes infecciosos pueden atacar cualquier parte del ojo, tanto desde afuera como desde adentro. Las infecciones externas suelen involucrar las estructuras superficiales, la conjuntiva y la córnea, a menos que haya ocurrido una lesión penetrante que introduce microorganismos en el globo ocular.

CONJUNTIVITIS

La conjuntiva es una membrana delgada que cubre el párpado (conjuntiva palpebral) y que se repliega sobre la superficie externa del globo ocular o esclerótica (conjuntiva bulbar). La córnea central no está cubierta. La conjuntiva es la diana de muchos microbios, la mayoría de los cuales se encuentran en las vías respiratorias altas. La inflamación (conjuntivitis) produce entorpecimiento (ojos rosados), picazón y secreción, que puede ser mucosa o purulenta.^{135,262} Los exudados en las infecciones bacterianas son muy pegajosos y con incrustacio-

nes, por lo tanto, los párpados pueden pegarse entre sí. También se puede desarrollar inflamación aguda no infecciosa en pacientes con alergia estacional. La conjuntivitis es muy contagiosa; la infección puede pasar con facilidad al otro ojo o a otras personas por contacto (p. ej., refregar el ojo infectado y luego el ojo sano).

Los patógenos bacterianos más comunes son *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La conjuntivitis aguda también puede ser causada por dos patógenos de transmisión sexual, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, que pueden afectar a adultos sexualmente activos o a recién nacidos que adquieren la infección durante el parto vaginal. La etiología viral más común es adenovirus, que puede causar enfermedad epidémica con faringitis o sin ella (fiebre faringoconjuntival epidémica).

QUERATITIS

La queratitis, inflamación de la córnea, es una infección mucho más seria que la conjuntivitis. En lugar de la molestia temporal que se presenta en la conjuntivitis, la queratitis puede producir una cicatriz y llevar a la ceguera. Es causada por todas las clases de agentes infecciosos. El agente bacteriano más común es *Staphylococcus aureus*.¹⁵⁶ Los hongos filamentosos, en especial las especies de *Fusarium* y de *Aspergillus*, y las levaduras, más a menudo las especies de *Candida*, causan una lesión que puede asemejarse a la infección bacteriana, lo cual retrasa el diagnóstico y el tratamiento apropiados.¹⁴⁴ El virus del herpes simple puede causar una lesión ulcerativa denominada queratitis dendrítica, debido al patrón arborescente de las lesiones.¹⁶⁷ El virus de la varicela zóster reactivado (herpes) puede producir una queratitis similar si afecta la rama ocular del nervio trigémino (quinto par craneal).¹⁷⁷ En las personas (que utilizan lentes de contacto, las especies de *Acanthamoeba* (una ameba de vida libre) pueden producir lesiones ulcerativas muy dolorosas.¹⁶⁶

La queratitis intersticial, que ocurre cuando los vasos sanguíneos crecen dentro de la córnea desde la conjuntiva, es la causa medial más común de ceguera. El tracoma es una forma de queratoconjuntivitis crónica provocado por *C. trachomatis*.¹³³ La lesión cicatrizal que surge como resultado de la enfermedad recurrente afecta a 6 millones de personas en el mundo. La *World Trachoma Initiative* tiene como objetivo eliminar esta infección tratable para el año 2020. En ciertas regiones de África, un parásito de las filarias, *Onchocerca volvulus*, que se transmite por la mosca negra (especies de *Simulium*) produce una respuesta inflamatoria aguda cuando los gusanos que migran mueren, lo que genera la ceguera del río.¹⁰⁶ Otros agentes etiológicos de la queratitis intersticial son *Treponema pallidum* (sífilis),¹⁵³ *Mycobacterium leprae* (lepra) y *M. tuberculosis* (tuberculosis).

La queratitis (y la ceguera) también pueden ocurrir por lesiones no infecciosas, como un traumatismo, por la radiación ultravioleta (razón por la cual no hay que mirar directamente al sol, sobre todo durante un eclipse) y por condiciones que disminuyen las lágrimas que lubrican la córnea.

UVEÍTIS Y ENDOFTALMITIS

Las infecciones más graves son las que afectan el interior del ojo. Las infecciones adquiridas por vía endógena llegan al ojo por vía sanguínea. Pueden ser responsables una gran variedad de bacterias, hongos y virus. Las infecciones adquiridas por vía

exógena suelen relacionarse con traumatismos penetrantes en el ojo. Las infecciones posquirúrgicas representan una categoría especial.

Diagnóstico de las infecciones oculares

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

La conjuntivitis se diagnostica por medio de un hisopado de la conjuntiva afectada que se coloca en un medio de transporte apropiado. El oftalmólogo toma de manera adecuada las muestras correspondientes a todas las otras infecciones. La queratitis se diagnostica por medio del raspado de la lesión; si se sospecha una etiología bacteriana o fúngica, a menudo el médico inocula la muestra directamente en el medio correspondiente. Las muestras para el diagnóstico de endoftalmitis deben recolectarse en forma quirúrgica.

EXAMEN MICROSCÓPICO

Se deben realizar las tinciones de Gram, con blanco de calcoflúor o de Wright según el patógeno que se sospeche. Si se obtuvo una muestra en forma quirúrgica se deben realizar las tinciones apropiadas para los agentes infecciosos.

CULTIVOS

El medio adecuado para inocular depende de la estimación que el médico haya realizado sobre el agente etiológico más probable. Para ciertos patógenos, como los agentes de la sífilis, la lepra y la oncocerciasis, el diagnóstico debe realizarse por microscopía y serología.

Infecciones de la sangre

Presentación clínica y patogenia

BACTERIEMIA Y SEPTICEMIA

El sufijo “-emia” hace referencia al sistema circulatorio. La bacteriemia, la fungemia y la viremia son estados en los que las bacterias, los hongos y los virus, respectivamente, circulan a través del sistema vascular. Los signos y los síntomas pueden estar presentes, pero son variables. La ausencia de signos y síntomas en los pacientes define un trastorno denominado “silencioso” o “subclínico”. Por el contrario, la septicemia (sepsis) es un síndrome clínico caracterizado por fiebre, escalofríos, malestar, taquicardia, hiperventilación y toxicidad o postración. La septicemia ocurre cuando las bacterias circulantes se multiplican a una velocidad que excede su eliminación por los fagocitos. Los síntomas aparecen como consecuencia de la presencia de toxinas microbianas o citocinas producidas por las células inflamatorias.²⁰ Hoy se considera que una serie de importantes eventos inmunosupresores se producen después de la inmunestimulación de las citocinas.¹²¹ Un componente importante de la sepsis mortal es la falla multiorgánica, pero el mecanismo patogénico que lleva a la muerte aún se desconoce.

La sepsis se ha asociado tradicionalmente con las bacterias gramnegativas, que contienen endotoxinas.¹⁷⁸ Si embargo, ahora se sabe que las bacterias grampositivas también pueden causar el síndrome de sepsis.^{6,78}

TIPOS DE BACTERIEMIA

La bacteriemia puede ser transitoria, intermitente o continua, lo que refleja los diversos mecanismos por los cuales la bacteria ingresa en el torrente sanguíneo. La bacteriemia transitoria

se produce cuando los microorganismos, a menudo miembros de la flora normal, ingresan en la sangre a través de un trauma mínimo de las membranas (p. ej., cepillado de los dientes, esfuerzos durante las evacuaciones intestinales o procedimientos médicos).¹³⁴ La bacteriemia intermitente ocurre cuando las bacterias de un sitio infectado se liberan en forma periódica a la sangre desde un absceso extravascular, una celulitis diseminada o infecciones de las cavidades del cuerpo, como empiema, peritonitis o artritis séptica. La bacteriemia continua suele presentarse cuando la infección es intravascular, como en las infecciones del endotelio (endocarditis bacteriana o aneurismas) o por dispositivos infectados (fístulas arteriovenosas, catéteres intraarteriales o cánulas permanentes). Sin embargo, el origen de los microorganismos no puede determinarse en hasta un tercio de los casos.

La bacteriemia puede ser el resultado de una infección en un órgano o de un tejido (bacteriemia secundaria). No obstante, a menudo, el sitio primario no es evidente (bacteriemia primaria). En esta situación, es posible que una bacteriemia transitoria no pueda ser eliminada en forma eficiente por los mecanismos de defensa del huésped. Al menos, en el caso de *Staphylococcus aureus* la bacteria colonizante de la nariz parece ser el origen de la infección sistémica.²⁸⁹ Los factores que desencadenan la diseminación desde las narinas anteriores aún se desconocen, pero la diseminación hacia la piel y la infección ulterior de las heridas o de los dispositivos intravasculares es una posibilidad.

Cuando la infección de un órgano se disemina hacia la sangre (p. ej., neumonía bacteriémica por neumococos), la gravedad de la infección aumenta y el pronóstico para el paciente empeora.¹⁹¹ Por el contrario, la bacteriemia puede producir la diseminación de la infección en órganos distantes, fenómeno denominado “infección metastásica”.

La bacteriemia también se puede clasificar como adquirida en la comunidad o intrahospitalaria. Puede ocurrir en personas inmunocompetentes o inmunodeprimidas. El tipo de microorganismos y el pronóstico varían en gran medida, según estos factores y la edad del paciente.^{14,162,187,288}

Se pueden aislar diversas bacterias grampositivas²¹³ y gramnegativas⁶⁷ de la sangre. Durante las últimas décadas se ha observado un claro cambio en la naturaleza de la flora infecciosa. Con el tiempo ha disminuido el número de aislamientos de bacterias anaerobias, mientras que se han incrementado los aislamientos de levaduras y de estafilococos coagulasa-negativos de importancia clínica.¹¹⁹ Debido a razones aún no dilucidadas, las bacteriemias causadas por bacilos gramnegativos no fermentadores son más a menudo policlonales (más de un tipo molecular) comparadas con las bacteriemias causadas por otros bacilos gramnegativos.¹²⁰

Algunos microorganismos específicos tienen un significado clínico diferente. *Clostridium septicum* suele asociarse con enfermedad neoplásica, en particular con el carcinoma de colon,¹⁴⁶ y puede producir un absceso metastásico a distancia. De manera similar, la bacteriemia por *Streptococcus bovis* se asocia a menudo con endocarditis y con enfermedad colónica, incluido el carcinoma de colon.¹⁷ Con poca frecuencia, los episodios de bacteriemia por *Clostridium perfringens* dan como resultado una hemólisis intensa y repentina, que puede resultar rápidamente mortal;²⁹² la causa de la hemólisis son las toxinas de *Clostridium*, pero aún se desconoce por qué la hemólisis mortal se presenta sólo en una pequeña proporción de las bacteriemias por *Clostridium perfringens*.

Factores de riesgo y pronóstico. Numerosos mecanismos participan en la eliminación de los microorganismos del torrente sanguíneo. En los individuos sanos e inmunocompetentes, una

entrada repentina de bacterias se clarifica de la sangre al cabo de 30-45 minutos. El hígado y el bazo cumplen un papel principal en la eliminación de las bacterias, mientras que los neutrófilos intravasculares tienen sólo una función menor. Las bacterias encapsuladas son más difíciles de eliminar, pero existen anticuerpos específicos (opsoninas) que aumentan su eliminación.³⁴ Los pacientes débiles, inmunodeficientes o inmunodeprimidos tienen un mayor riesgo porque las bacterias pueden permanecer en la circulación durante horas.

Weinstein y cols. han investigado otros factores de riesgo.³⁵ En su estudio que incluyó 500 episodios de bacteriemia y fungemia, la mortalidad total fue del 42%, la mitad de estas muertes atribuidas directamente a la septicemia. En el cuadro 2-8 se muestran los factores de riesgo y las tasas de mortalidad relativas para cada uno. Bryan³⁷ también destaca los cultivos positivos que identifican una población de pacientes con riesgo de muerte; los pacientes con cultivos positivos tienen 12 veces más probabilidad de morir durante la hospitalización que aquellos con cultivos negativos. A partir de esta experiencia, es imperativo que el laboratorio realice los hemocultivos en forma correcta e informe los resultados exactos lo antes posible.

La detección a tiempo de la bacteriemia y de la fungemia, seguida de la identificación rápida de los patógenos y la determinación del antibiograma, pueden tener gran importancia

diagnóstica y pronóstica. La mortalidad por septicemia puede ser del 40% o mayor en ciertos grupos de pacientes hospitalizados.³⁸ A pesar de que las enfermedades subyacentes son determinantes importantes de los desenlaces fatales, cerca de la mitad de las muertes pueden atribuirse en forma directa a la infección.³⁷ Se ha demostrado que el comienzo rápido de una terapia con antibióticos adecuada es importante para evitar la morbilidad.³⁶ El tratamiento inicial se debe basar empíricamente en los patógenos más probables y en los patrones típicos de sensibilidad a los antibióticos. El laboratorio de microbiología desempeña su papel más importante cuando el patógeno real o el antibiograma son diferentes de los que el médico había indicado en forma empírica. La mortalidad de los pacientes tratados de manera apropiada es significativamente menor que la de los que recibieron antibióticos no eficaces.³⁹ La pronta corrección del curso de acción elegido de manera empírica depende de la rápida información que proporcione el laboratorio. Además, de todos los aspectos importantes relacionados con la calidad, también la velocidad en la provisión de los resultados tiene influencia en el aspecto económico.¹⁸ Cualquier acción que reduzca las complicaciones y acorte la hospitalización dará como resultado no sólo un ahorro económico para la institución sino que también mejorará la atención del paciente.

Cuadro 2-8 Tasas de mortalidad y factores de riesgo asociados con la bacteriemia³⁵

CONDICIÓN	MORTALIDAD (%)	RIESGO RELATIVO DE MUERTE
Edad del paciente		
20	13,8	1,0
21-40	32,8	2,33
41-50	42,9	3,06
> 50	49,8	3,55
Tipo de microorganismo		
No fermentadores	27,7	6,84
(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)		
<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Escherichia coli</i>	35,5	3,36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48,0	4,52
Cocos grampositivos		
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,7	3,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22,0	2,08
Enterococos	45,5	4,28
Bacteriemia unimicrobiana	37,7	
Bacteriemia polimicrobiana	63,0	3,96
Hongos	67,7	
Origen de la infección		
Catéter intravenoso	1,1	1,0
Genitourinaria	14,9	1,35
Catéter de Foley	37,8	3,38
Herida quirúrgica (y quemaduras)	42,9	3,88
Abscesos	51,2	4,65
Infecciones respiratorias	52,3	4,73
Condiciones predisponentes		
Cirugía	16,3	0,78
Trauma	27,3	1,3
Diabetes mellitus	30,0	1,43
Corticosteroides	33,3	1,59
Insuficiencia renal	37,5	1,79
Neoplasia	42,1	2,01
Cirrosis	71,5	3,4

INFECCIÓN INTRAVASCULAR

La infección intravascular más común es la endocarditis, es decir, la infección del recubrimiento endotelial del corazón.^{16,239,310} La división anterior de la enfermedad en forma aguda y subaguda ya no se considera útil. A pesar de que casi todos los microorganismos pueden alguna vez producir endocarditis, la mayoría de los microorganismos asociados son grampositivos. El más importante es *Streptococcus viridans* de la cavidad bucal y *Staphylococcus aureus*. Los pacientes de mayor riesgo son aquellos que presentan enfermedades del endocardio y los que se encuentran en tratamiento odontológico.⁷³ Hace años, el daño al endocardio solía surgir como consecuencia de la fiebre reumática. Con la desaparición virtual de esta enfermedad, las anomalías congénitas o del desarrollo, como la de la válvula bicúspide aórtica y el prolapso de la válvula mitral, han cobrado mayor importancia. Un trombo de fibrina y plaquetas sobre la superficie erosionada del endocardio sirve como sitio de anclaje para las bacterias que circulan transitoriamente en la sangre (p. ej., luego del cepillado de los dientes). Ciertos microorganismos, en particular los estreptococos y los enterococos, tienen una capacidad exacerbada de adherirse a estos trombos.³⁶ Los trombos y las bacterias asociadas forman excrecencias (vegetaciones) que pueden visualizarse por medio de una radiografía o una ecografía. Los trombos no infectados y los infectados causan endocarditis marántica e infecciosa, respectivamente.

A pesar de que las bacterias grampositivas son los agentes etiológicos más comunes de la endocarditis, algunos bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales^{33,77} y algunos hongos^{3,186} pueden causar la infección. Es muy probable que las bacterias gramnegativas del grupo HACEK (*Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*) infecten las válvulas cardíacas. Los hongos y algunos de estos bacilos gramnegativos se destacan por su propensión a formar grandes vegetaciones que se pueden romper y viajar por la circulación a sitios alejados (embolia séptica). En la mayoría de los casos, la endocarditis compromete la parte izquierda del corazón, que es el lado de alta presión del sistema. Sin embargo, si las bacterias se inyectan directamente en el sistema venoso, como ocurre con la inyección intravenosa de drogas ilegales, puede producirse una endocarditis del lado derecho, a menudo causada por *Pseudomonas aeruginosa*.³²²

En una minoría de pacientes con signos y síntomas de endocarditis es difícil o imposible el aislamiento de un agente etiológico (endocarditis con cultivo negativo). Las enfermedades que causan endocarditis marántica pueden ser responsables, pero ciertos microorganismos no se aíslan fácilmente mediante las técnicas de hemocultivo convencionales. Entre estos agentes se encuentran *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetii* (fiebre Q) y las especies de *Bartonella*,^{32,92,177,290} pero pueden asociarse con menor frecuencia otros agentes, como las especies de *Legionella*.

Los pacientes que poseen implantes recientes de dispositivos intravasculares suelen infectarse por bacterias que son propias de la piel, a menudo estafilococos coagulasa-negativos y difteroides o, más esporádicamente, alguno de los que causan infecciones de las heridas, como bacilos gramnegativos, *Staphylococcus aureus* u hongos.²¹⁵ La endocarditis de la válvula protésica se presenta en el 3-6% de los pacientes que reciben implantes mecánicos o bioprotésicos (válvulas hechas de tejido animal);³⁰⁰ la infección se puede dividir conceptualmente en la etapa temprana (< 60 días después de la cirugía) y la tardía. En la etapa temprana predominan los microorganismos de la piel

y las heridas. En la etapa tardía se encuentran los microorganismos que infectan las válvulas nativas.

Las complicaciones más serias de la endocarditis son la rotura de una válvula cardíaca con la resultante falla cardíaca y la enfermedad metastásica causada por la embolización de pequeños fragmentos de vegetación infectados. Un problema particular en la endocarditis es la descompensación cardíaca repentina causada por *Staphylococcus aureus*, que puede representar una emergencia quirúrgica. Como consecuencia de una embolia séptica renal y cerebral, se pueden presentar falla renal y accidentes cerebrovasculares, respectivamente.

BACTERIEMIA Y SEPSIS ASOCIADAS CON LOS CATÉTERES

Como resultado de los avances tecnológicos que permiten el uso seguro de catéteres vasculares permanentes surgió una clase especial de infección intravascular. Los catéteres pueden ser sólo la puerta de acceso para las bacterias que colonizan la piel adyacente al punto de entrada o pueden actuar como un cuerpo extraño que alberga microcolonias bacterianas. A partir de las infecciones asociadas con los catéteres se pueden presentar sepsis y enfermedad metastásica grave.¹²⁰ En los pacientes con enfermedad neoplásica, los catéteres pueden estar instalados en un sitio durante períodos prolongados; este grupo de pacientes, que puede tener una neutropenia grave, tiene gran probabilidad de sufrir infecciones serias potencialmente mortales.⁷⁶ Además de los efectos sobre la calidad de la atención y la calidad de vida, las infecciones asociadas con los catéteres representan una carga económica importante para las instituciones.⁴ A pesar de que los catéteres venosos centrales son los que se utilizan con mayor frecuencia y son la vía más común de infección, los catéteres intraarteriales también representan un riesgo.²⁷²

El microorganismo que se halla con mayor frecuencia en las infecciones asociadas con los catéteres es *Staphylococcus coagulasa-negativo*, una bacteria propia de la piel que tiene ciertas características, como la presencia de una biopelícula que facilita la colonización de los catéteres.¹⁷⁴ Sin embargo, las infecciones más graves son causadas por *Staphylococcus aureus* y por bacilos gramnegativos.

Recolección de hemocultivos

Los factores críticos sobre los cuales debe decidir el director del laboratorio son el tipo de recolección, la cantidad y la frecuencia de los hemocultivos, el volumen de sangre que se va a cultivar, la cantidad y la composición del medio de cultivo, cuándo y con qué frecuencia subcultivar y la interpretación de los resultados.^{226,238,319}

CONTAMINACIÓN CON FLORA DE LA PIEL

Se deben tomar todas las precauciones para reducir al mínimo la contaminación de los hemocultivos.³¹³ El aislamiento de las especies de *Corynebacterium*, de *Propionibacterium acnes* y de especies de *Bacillus* diferentes de *B. anthracis* es casi siempre contaminante. La mayoría de los aislamientos de bacilos gramnegativos, levaduras, estreptococos β -hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae*, especies de *Enterococcus* y *Staphylococcus aureus* tienen significado clínico. Los aislamientos más problemáticos son los estafilococos coagulasa-negativos, ya que cada vez más estas especies son agentes etiológicos verdaderos de la bacteriemia, pero además son flora endógena de la piel.

En todos los laboratorios de microbiología se debe realizar en forma regular el control del aseguramiento de la calidad para determinar la incidencia de muestras contaminadas. Deben estar contaminados menos del 3% de los hemocultivos. Bates y cols.¹⁵ estimaron que un hemocultivo contaminado puede llevar a un aumento del 20-30% en la facturación de la hospitalización de un paciente debido a una estadía más prolongada para el tratamiento antibiótico intravenoso y las pruebas adicionales que se deben realizar. También destacaron la necesidad de efectuar hemocultivos pareados para detectar probables contaminaciones si sólo una de las muestras resulta positiva. Si la técnica de recolección de la muestra es buena y se reduce la contaminación, el costo de los contaminantes es aceptable.³⁰⁶ Se puede desalentar el uso inadecuado de antibióticos por medio de una política de laboratorio en la que a los aislamientos únicos de estafilococos coagulasa-negativos no se les realice de rutina el antibiograma. Weinstein sugirió varias estrategias para esta determinación.³¹¹

Se han propuesto diversos enfoques para establecer si una cepa de *Staphylococcus* coagulasa-negativo representa una contaminación. Lamentablemente, ninguno funciona bien. El número de frascos positivos,¹⁹⁰ la identificación de la cepa hasta el nivel de especie,³¹⁵ el tiempo de la primera positividad,¹¹⁷ el número de otras pruebas negativas¹³⁷ no permitieron distinguir los aislamientos clínicamente significativos de los que carecen de significado clínico. Las especies de estafilococos coagulasa-negativos diferentes de *S. epidermidis*, *S. capitis* y *S. haemolyticus* carecen casi siempre de significado clínico, pero estas tres especies representan el 98% de las cepas significativas y el 89% de las cepas sin significado clínico.³¹³ La única forma de determinar con certeza si dos o más especies representan la misma cepa es realizar una tipificación molecular, una técnica que no está disponible en la mayoría de los laboratorios. Se ha propuesto la utilización de los datos clínicos en forma combinada con el antibiograma de las cepas¹¹⁷ o una combinación del antibiograma con el patrón bioquímico (contrapuesto a la identificación)³¹³ como una forma de determinar si los aislamientos múltiples representan múltiples contaminantes o una cepa única que infecta.

Para reducir la probabilidad de introducir microorganismos contaminantes desde la piel, el sitio donde se realizará la venopunción debe prepararse de manera ideal según se describe: 1) lavar con jabón, 2) enjuagar con agua estéril, 3) aplicar tintura de yodo al 1-2% o yodopovidona y dejar secar durante 1-2 minutos (yodopovidona) o 30 segundos (tintura de yodo) y 4) eliminar la tintura de yodo por lavado con alcohol al 70%. En la práctica casi siempre se omite el lavado con jabón; sin embargo, el uso combinado de compuestos de yodo y alcohol para desinfectar el sitio de venopunción es esencial. Si se debe palpar nuevamente el sitio, luego de la preparación con yodo y alcohol, se debe desinfectar el dedo o utilizar un guante estéril. Si se utiliza yodopovidona, se debe omitir el paso 4. Sin embargo, se debe verificar que la solución alcohol-povidona esté seca antes de realizar la venopunción. El equipo comercial para la preparación de la piel opera de manera similar a los apósitos individuales impregnados en iodóforos y alcohol.¹³⁴ El personal sanitario casi siempre está apurado, por lo tanto, tiene la fuerte tentación de no permitir el contacto prolongado que se requiere con la solución de yodopovidona. La tintura de yodo, que es eficaz luego de 30 segundos de contacto con la piel, presenta una ventaja obvia y se describió que es más eficaz que la solución de yodopovidona,¹³⁹ pero es menos aceptada por el personal. Se han sugerido otros desinfectantes para la preparación del sitio de venopunción,³¹³ pero tampoco fueron muy aceptados.



Figura 2-6 Técnica de venopunción para hemocultivo utilizando una aguja y una jeringa estéril. Se aplica un torniquete en el antebrazo, por encima del sitio donde se va a realizar la venopunción, para distender las venas antecubitales. El sitio fue previamente preparado con tintura de yodo y alcohol. Se extrae la sangre con jeringa y aguja y se inyecta dentro de un frasco de hemocultivo apropiado. Se deben utilizar guantes de látex durante el procedimiento.

Los hemocultivos pueden obtenerse utilizando una aguja y una jeringa (fig. 2-6) o mediante un sistema cerrado, que consiste en un frasco al vacío y un tubo de recolección con doble aguja. Se desaconseja la obtención de muestras para hemocultivo de catéteres intravenosos o intraarteriales permanentes. A pesar de que algunos autores han observado una buena correlación entre los cultivos tomados a través de catéteres o mediante venopunción, la mayoría de los investigadores han encontrado un riesgo significativamente mayor de aislar microorganismos de la piel si se recolecta la muestra de un catéter intravascular.^{39,82} El fin de recolectar la muestra de un catéter intravascular es evitarle al paciente las molestias producidas por una venopunción; sin embargo, el aislamiento de un estafilococo coagulasa negativo puede realmente ocasionarle una molestia mayor como consecuencia de las venopunciones adicionales que deberá padecer para que se determine la significación de este aislamiento controvertido.³¹³ Si se utiliza un catéter intravascular, se deberá recolectar por venopunción una segunda muestra de hemocultivo para comparación.

La práctica de cambiar las agujas luego de realizada la venopunción y antes de inyectar la sangre en los frascos de cultivo ha sido remplazada por la inyección directa con la aguja original de flebotomía, debido a las infecciones por HIV o hepatitis que se pueden adquirir como consecuencia de los accidentes por punción con agujas. La mayoría de los investigadores que han estudiado este tema concluyeron que no existe una diferencia significativa en las tasas de contaminación de los hemocultivos entre las muestras de pacientes en jeringas a las cuales se les cambió la aguja para su inyección en los frascos de cultivo y aquellas a las que no se les cambió.^{49,148,262} En un metaanálisis sobre este tema se evidenció una mayor frecuencia de contaminación cuando las agujas no fueron cambiadas, pero el riesgo de adquirir una infección viral de transmisión sanguínea es más importante que los beneficios obtenidos con el cambio de agujas.

Un factor importante en la calidad de la recolección del hemocultivo, a menudo subestimado, es el entrenamiento de los extraccionistas. Muchos investigadores han demostrado que un equipo de extraccionistas entrenado puede obtener hemo-

cultivos con menor contaminación que la esperable por azar, sin importar su nivel de educación.^{312,313}

CANTIDAD Y OPORTUNIDAD DE LOS CULTIVOS

El número de muestras que se recolecta tiene menor importancia que el volumen total del hemocultivo. Muchos estudios han documentado la importancia del volumen: la mayoría está de acuerdo con el hallazgo de un incremento en el rendimiento cuando se utilizan aproximadamente 30 mL de sangre en adultos.³¹⁸ Si se envía un grupo de dos frascos con 10 mL de sangre cada uno, se necesitarán dos grupos para satisfacer el criterio de volumen. Si los frascos contienen cada uno 5 mL o si el médico no inoculó el suplemento completo de sangre, se deberá utilizar una cantidad mayor de frascos para satisfacer los requerimientos de volumen. Una excepción puede ser la neumonía adquirida en la comunidad en niños sanos, en la cual puede ser suficiente un único cultivo aerobio.³⁰⁷

En un estudio hospitalario sobre prácticas de cultivo, Schiffman y cols.²⁴¹ describieron que la incidencia de hemocultivos aislados tenía un rango de 1% a 99% con una mediana de 26%. Estimaron que se podían pasar por alto alrededor de 18 000 episodios de bacteriemia debido a la recolección de un volumen inadecuado de sangre. Además, hallaron que entre el 20% y el 30% de los hemocultivos aislados no estaban clínicamente indicados y que la mayoría de los restantes estaban indicados por médicos que desconocían que un cultivo aislado no era suficiente. La intervención dirigida y la educación global redujeron los hemocultivos aislados del 40% al 24% en un hospital y las tomas de muestras innecesarias del 38% al 12,5% en otra institución. Lamentablemente, las mejoras en el desempeño como consecuencia de la educación duraron poco; se requiere un control constante (p. ej., como parte de un programa de aseguramiento de la calidad en curso). Como ya se describió, los hemocultivos aislados presentan el problema adicional de que los aislamientos únicos de estafilococos coagulasa-negativos son difíciles de interpretar.

Las muestras para los hemocultivos se deben obtener, si es posible, antes de la utilización sistémica de antibióticos. Si el tratamiento ya ha comenzado, las muestras aún deben obtenerse, pero los resultados negativos deben interpretarse con cuidado.

Los lineamientos tradicionales indican que si se sospecha una infección intravascular y una bacteriemia continua, se deben tomar múltiples muestras en diferentes tiempos. En la actualidad, muchos especialistas creen que no es muy ventajoso espaciar los cultivos en el tiempo. La fiebre es a menudo una respuesta retrasada respecto del ingreso de las bacterias en el torrente sanguíneo; por lo tanto, tiene sentido recolectar las muestras lo antes posible tras la aparición de la fiebre. Se deben realizar al menos dos venopunciones, pero se pueden recolectar de una sola vez todas las muestras necesarias (usualmente dos o tres grupos, cada uno con dos frascos).³⁵⁰

Después de recolectar un volumen de sangre adecuado e iniciar el tratamiento con antibióticos, no se gana nada recolectando más muestras hasta que se conozcan los resultados del cultivo inicial.⁹⁹ La práctica de indicar cultivos diarios no debe aceptarse. La mayoría de los aislamientos bacterianos se obtienen por medio de los sistemas de monitorización continua dentro de las 72 horas; por lo tanto, es razonable esperar al menos tres días antes de recolectar nuevas muestras. Una buena regla sostiene que es preferible considerar otra posible causa en lugar de repetir a ciegas un enfoque diagnóstico no productivo. Sin embargo, si cambia la condición clínica está indicada la reco-

lección de más muestras. La "bacteriemia intercurrente" (cultivos positivos y síntomas nuevos o persistentes en presencia del tratamiento antibiótico) sugiere la posibilidad de una resistencia a los antibióticos y es un signo de peor pronóstico.³¹⁷ Sin embargo, cabe recordar que la utilización de los medios para hemocultivo más recientes que contienen resinas para eliminar los antibióticos puede dar como resultado la aparente persistencia de los patógenos; el estado sintomático del paciente es de importancia crucial.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados en los hemocultivos son polivalentes y enriquecidos nutricionalmente. Suelen emplearse hidrolizado de soja o tripticasa soja, peptona suplementada, infusión de cerebro y corazón, agar Columbia CNA y los caldos *Brucella*. Todos se comercializan; sin embargo, las variaciones en la composición de un mismo tipo de medio entre los diferentes fabricantes dificultan establecer comparaciones y sacar conclusiones acerca del rendimiento comparativo para el crecimiento bacteriano de cada uno.

La mayoría de los medios de hemocultivo que se venden contienen polianetolsulfonato sódico (SPS) como anticoagulante en concentraciones que varían entre 0,025% y 0,05%. Además de sus propiedades anticoagulantes (la anticoagulación es el efecto deseado debido a que ciertas bacterias no crecen bien dentro de un coágulo, donde la fagocitosis de los neutrófilos y de los macrófagos permanece activa), el SPS inactiva a los neutrófilos y ciertos antibióticos, como estreptomycin, kanamicina, gentamicina y polimixina, y precipita al fibrinógeno, β -lipoproteínas, β 1-C globulinas y otros componentes del complemento sérico. También puede inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, como *Peptostreptococcus anaerobius*, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. El efecto inhibitorio del SPS puede neutralizarse con el agregado de gelatina al medio en una concentración final de 1%.

Muchos frascos de hemocultivo incorporan resinas sintéticas que eliminan antibióticos. El aislamiento de los patógenos (pero también de los contaminantes de la piel) mejora con el agregado de estas resinas.³¹³ En un estudio que incluyó 6 839 hemocultivos pareados,³³⁶ la utilización de medios con resina mejoró significativamente el aislamiento de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, especies de *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans*.

Clásicamente, los sistemas de hemocultivo consistían en un frasco diseñado para el aislamiento de bacterias aerobias y uno para bacterias anaerobias. En verdad, todos los tipos de bacterias se aislaban siempre en ambos frascos; una vez más "los microbios se olvidaron de leer el manual". El cambio en el patrón de las bacteriemias a lo largo del tiempo, como ya se mencionó, ha llevado a algunos investigadores a sugerir que un frasco "anaerobio" estaba limitado a aquellas situaciones en las cuales se podrían esperar bacterias anaerobias (p. ej., en pacientes con procesos de enfermedad abdominal).¹⁰³ Se comparó la tasa de aislamiento a partir de tres sistemas de pares de frascos: 1) un frasco para aerobios y una para anaerobios (5 mL de sangre en cada uno), 2) dos frascos para aerobios (5 mL de sangre cada uno) y 3) dos frascos para aerobios más un frasco extra para anaerobios cuando se sospecha clínicamente una infección por estas últimas. La tercera estrategia tuvo el mayor rendimiento de aislamientos. A partir de estos datos, los investigadores concluyeron que la utilización de dos frascos para aerobios con un cultivo selectivo para anaerobios incrementaría el número de aislamientos clínicamente importantes al me-

nos un 6%.¹⁹³ La política de sustituir el segundo frasco para aerobios por uno para anaerobios no ha sido tenida en cuenta, debido tal vez en parte a la dificultad de decidir qué pacientes se beneficiarían con esta práctica y a la imposibilidad de dejar esta decisión en manos de los médicos. Se ha destacado que muchas bacterias anaerobias facultativas (la mayoría de los patógenos humanos) crecen bien en el frasco para anaerobios.⁵² Cabe destacar que el plan de acción en una institución, en la que también se había documentado una incidencia decreciente de bacteriemias anaerobias,⁷⁰ incluyó dos componentes aerobios además del frasco "no ventilado" para anaerobios.

Los hemocultivos para micobacterias y hongos deben considerarse en ciertas situaciones clínicas, por ejemplo, en los pacientes infectados por HIV en quienes frecuentemente se investiga la presencia de estos patógenos. Los hongos dimórficos y los filamentosos requieren especial atención.¹⁶³ Sin embargo, en estudios recientes, la mayoría de las especies de *Candida* se aislaron en forma eficaz en sistemas diseñados para bacterias.¹⁹²

En el recuadro 2-3 se resumen las recomendaciones para la recolección de muestras para hemocultivo.

Sistemas de procesamiento de hemocultivos²⁶⁶

SISTEMAS MANUALES DE HEMOCULTIVO

Dos de los sistemas comerciales manuales son variaciones de los clásicos frascos con combinación de agar-caldo, conocidos como frascos de Castañeda. Éstos representan una elección razonable para los laboratorios que carecen de recursos para la implementación de un sistema automatizado que controla el crecimiento bacteriano.

Recuadro 2-3 Guía para la obtención de hemocultivos*

Idealmente un grupo de extraccionistas entrenados debe recolectar todos los hemocultivos de acuerdo con los protocolos establecidos. Se debe controlar la frecuencia de probables contaminantes en los cultivos recolectados por cada miembro del grupo de manera que puedan mejorar su desempeño.

Los hemocultivos están indicados en presencia de una enfermedad febril seria que podría requerir tratamiento con antibióticos o cuando una infección en tal sistema de órganos podría dilucidarse por medio del aislamiento del patógeno a partir de la sangre (p. ej., meningitis o septicemia).

Comparar el nombre escrito en la solicitud de análisis con la identidad del paciente. Establecer el sitio(s) para la venopunción, limpiarlo con una solución yodada y luego con alcohol (si es posible, lavar antes con agua y jabón quirúrgico).

Recolectar un número suficiente de muestras de modo que puedan inocularse al menos 30 mL en los frascos elegidos. Deben existir al menos dos sitios de venopunción, pero todas las muestras así obtenidas deben recolectarse en una única sesión.

Usar todos los dispositivos de seguridad disponibles, como agujas con características de seguridad, un dispositivo de transferencia para la inoculación de la sangre dentro de los frascos que sea seguro y un tubo adaptador para sostener el tubo cuando se utiliza un dispositivo de recolección con alas. Descartar todos los objetos cortopunzantes en un recipiente con protección.

No forzar el ingreso de la sangre en los frascos.

Enviar los frascos inoculados al laboratorio lo antes posible.

*Adaptado de la referencia²⁶⁶.

Sistema Signal® de Oxoid. El Sistema Signal® de Oxoid (Ogdenburg, NY) es un sistema de hemocultivo de frasco único que utiliza la producción de CO₂ para detectar el crecimiento bacteriano temprano. El frasco de hemocultivo principal es similar a los utilizados en otros sistemas con caldo; sin embargo, el sistema emplea una segunda cámara de plástico, conocida como cámara de señal, con una aguja larga que llega hasta el fondo del frasco. Luego de inocular la muestra de sangre que se va a cultivar dentro del frasco principal, se conecta la cámara de señal por medio de la inserción de la aguja a través del tapón de goma y se la ubica por debajo de la superficie del medio de cultivo. Las bacterias producen CO₂ cuando crecen y metabolizan. El aumento de presión resultante empuja el líquido dentro de la cámara de señal, que puede visualizarse directamente y, además, utilizarse para preparar una tinción de Gram y un subcultivo. Este sistema ha sido evaluado de manera favorable.^{197,247} Sin embargo, sigue siendo un problema el mayor número de resultados falsos positivos y el menor aislamiento de bacterias anaerobias respecto de lo normal. Weinstein y cols.³¹⁴ encontraron un mejor rendimiento en el aislamiento de microorganismos con frascos recién diseñados que tienen un mayor espacio superior para el gas y que se agitan.

Sistema de hemocultivo BBL Septic-Chek®. El sistema de agar bifásico en portaobjetos Septic-Chek® (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) también utilizado ampliamente, consta de un frasco de cultivo estándar que contiene caldo con infusión de cerebro y corazón o caldo tripticasa soja. El frasco está diseñado para conectarse a una segunda cámara de plástico que contiene una paleta con la superficie recubierta de agar. Después de inocular el primer frasco con la muestra de sangre por cultivar, se enroscala el "portaobjetos" contenido en la cámara plástica; este portaobjetos tiene una paleta de tres superficies recubiertas con tiras de agar chocolate, MacConkey y Malta. El primer subcultivo se realiza luego de 4 a 6 horas de incubación a 35 °C invirtiendo el frasco, lo cual permite el ingreso del medio en la cámara que contiene al portaobjetos y, por lo tanto, moja las superficies recubiertas con agar. El frasco se pone entonces nuevamente en posición vertical y se continúa con la incubación. El frasco se puede invertir a intervalos regulares para reinocular las superficies de la paleta con agar.

SISTEMA DE HEMOCULTIVO POR LISIS Y CENTRIFUGACIÓN

Wampole Isostat/Isolator Microbial System®. El sistema Isolator®, ampliamente aceptado como método alternativo de hemocultivo, es muy útil para el aislamiento de los microorganismos con requerimientos nutricionales especiales y de crecimiento lento. Es el método de elección para aislar hongos filamentosos (mohos), hongos dimórficos, *Malassezia furfur* y especies de *Legionella*.²⁴ Se ha observado una reducción en el tiempo promedio de aislamiento de levaduras de 4,9 días cuando se utiliza un sistema bifásico caldo-agar convencional a 2,12 días con el Isolator®. El tiempo promedio de aislamiento de *Histoplasma capsulatum* utilizando este sistema es de 8 días contra 24,14 días requeridos con el sistema bifásico convencional. Se ha documentado un incremento global del 36,6% en la tasa de aislamiento de hongos a partir de hemocultivos cuando se utiliza el sistema Isolator®. Este método debe tenerse en cuenta cuando se sospecha la presencia de otros microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, como *Bartonella henselae*.^{163,260} sobre todo si los sistemas convencionales dieron resultados negativos. El Isolator Microbial System® (Wampole Laboratories, Princeton, NJ) es un tubo especial que contiene

saponina, una sustancia química que lisa los eritrocitos y los leucocitos. Se agregan de 7,5 a 10 mL de sangre en el tubo; éste se mezcla varias veces por inversión, de modo de completar la reacción de lisis. Luego se coloca el tubo en una centrifuga con rotor de ángulo fijo y se centrifuga a 300 rpm durante 15 minutos para concentrar cualquier microorganismo que pueda estar presente. Después de la centrifugación se aspira el sedimento y se subcultiva en el medio apropiado. Existe una versión pequeña que no requiere centrifugación, utilizada para recién nacidos y niños pequeños; se debe desalentar o prohibir la utilización de la versión pediátrica en adultos ya que se cultiva un volumen insuficiente de sangre.

El sistema Isolator® es también el método de elección cuando se requieren hemocultivos cuantitativos. Las CFU/mL pueden calcularse a partir del volumen de sangre procesado y el número de colonias presentes en la superficie del agar.¹³⁰

El principal problema en la utilización del sistema Isolator® es un incremento de dos a ocho veces de la contaminación en relación con los sistemas convencionales. Se ha sugerido que la contaminación puede reducirse por medio del uso de placas de agar secas, la desinfección del área de trabajo y el procesamiento de las muestras en una cabina de flujo laminar vertical.¹³⁸

Examen de los sistemas manuales. Los frascos de hemocultivo se deben incubar a 35 °C y examinar visualmente para observar el crecimiento (hemólisis, producción de gas o turbidez) durante las primeras 6 a 18 horas posteriores a la recolección de las muestras. Para los sistemas que utilizan caldos convencionales, se deben examinar los frascos contra tubos de luz fluorescente o con luz transmitida incandescente. La superficie de la capa de sangre sedimentada debe examinarse debido a que pueden detectarse colonias separadas. Se deben realizar subcultivos a ciegas en agar chocolate de todos los frascos de hemocultivo (se excluyen los de agar-caldo y los de sistemas de monitorización continua) dentro de las 12 a 24 horas de la recolección de la muestra, a partir de cual las placas se incuban en forma aerobia en una atmósfera de 5-10% de CO₂ a 35 °C. En la mayoría de los laboratorios no suelen realizarse subcultivos para anaerobios a ciegas. Sin embargo, en general se acepta que se deben realizar los cultivos aerobios y anaerobios de todos los frascos de hemocultivo que fueron visiblemente positivos. En un estudio que incluyó 20 155 frascos de hemocultivo (caldo tripticosa soja y caldo tiol),¹³⁶ sólo 32 frascos de tripticosa soja y 10 frascos de tiol resultaron positivos luego de 7 días de incubación. Quince de las 32 cepas que se desarrollaron en caldo tripticosa soja y todas las de caldo tiol fueron aisladas en otros tipos de cultivos o considerados no clínicamente significativos, lo cual indicó la inutilidad de mantener los hemocultivos manuales durante más de 7 días.

Es probable que el examen microscópico de rutina de los frascos de hemocultivo macroscópicamente negativos luego de 24 horas de incubación no esté indicado, ya que el número de microorganismos que se puede detectar en una tinción de Gram (alrededor de 10³ UFC) no es mucho menor que las 10⁶ a 10⁷ UFC requeridas para producir una turbidez visible en el caldo de cultivo.²³⁸ La tinción con naranja de acridina es más sensible: detecta 10³ a 10⁴ UFC/mL. Tierney y cols. describieron un incremento del 16,8% en la detección temprana de septicemia mediante la tinción con naranja de acridina de muestras de caldos de hemocultivo macroscópicamente negativos.²⁸⁹

SISTEMAS DE HEMOCULTIVO AUTOMATIZADOS E INFORMATIZADOS

La introducción de los sistemas de hemocultivo de lectura continua, automatizados e informatizados representa un impor-

tante avance en la práctica de la microbiología clínica. Tres de los sistemas más utilizados en los Estados Unidos son: BacT/Alert® (Organon Teknika, Durham NC), BACTEC 9240/9120® (BD Diagnostic Systems) y TREK ESP Culture System II® (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Cada uno de estos sistemas le alerta al microbiólogo que un cultivo es positivo, luego de lo cual se pueden retirar los frascos de interés para realizar una tinción de Gram y un subcultivo. El medio que se selecciona para el subcultivo puede elegirse sobre la base de la reacción de Gram y de la morfología de los gérmenes. Si no se visualizan microorganismos, se debe realizar un subcultivo a ciegas y retornar el frasco al sistema para que continúe su incubación. Numerosos estudios han demostrado que se necesita incubar los frascos sólo durante 5 días cuando se utilizan los sistemas de monitorización continua. Tal vez en un futuro sea posible reducir aún más el tiempo de incubación.³⁵

Sistema de hemocultivo BacT/Alert®. El sistema BacT/Alert® se ha implementado en muchos laboratorios clínicos ya que fue el primer sistema de monitorización continua de hemocultivos que se creó y que se puso en práctica en los Estados Unidos. Cada frasco de hemocultivo tiene capacidad para 10 mL de sangre. Dado que los microorganismos crecen en una mezcla de sangre y caldo de cultivo, se libera CO₂. Un sensor químico sensible al CO₂, separado de la mezcla de sangre-caldo de cultivo por medio de una membrana unidireccional permeable al CO₂, está unido al fondo de cada frasco. En presencia de CO₂, el color del sensor vira del verde al amarillo, a pesar de que el detector sensible a la luz que se encuentra dentro del instrumento reacciona antes de que se evidencie el cambio de color.

Cada frasco que se coloca con el fondo hacia abajo dentro de un pocillo receptor en la unidad de procesamiento está identificado por un código de barras grabado en su etiqueta, el cual es examinado por el ordenador para realizar la correlación con los datos de identificación del paciente. Cada unidad de procesamiento es una cabina del tamaño de un pequeño refrigerador que cumple en sí misma la función de incubador, agitador y dispositivo de detección, con una capacidad de 240 o 120 frascos, según el modelo. Se pueden conectar hasta cinco módulos bajo el control de un mismo ordenador, lo que da como resultado un total de 1 440 frascos que pueden controlarse en forma conjunta. Los pocillos están organizados en dos filas dentro de un estante horizontal que se agita suavemente hacia adelante y hacia atrás cuando la puerta de la unidad está cerrada. Como cada estante contiene 20 frascos, una unidad para 240 frascos contiene 12 estantes. A intervalos de 10 minutos, los diodos (uno para cada pocillo) emiten un haz de luz que se proyecta a través de un filtro de excitación y se refleja en el sensor sensible al CO₂ en el fondo de cada frasco. La luz reflejada se dirige a través de un filtro de emisión hacia un detector fotosensible que, a su vez, está conectado a un compilador del ordenador. Tan pronto como se acumula suficiente CO₂ en el frasco como para alterar el sensor, se genera un "alerta" visible o audible y el ordenador marca de inmediato la posición del frasco positivo. Los frascos positivos se pueden retirar enseguida y continuar con su procesamiento. Se puede obtener, en cualquier momento, un gráfico en la pantalla del ordenador para monitorizar el progreso en la producción de CO₂.

Sistema de hemocultivo BACTEC 9240/9120®. El sistema BACTEC® está compuesto por una unidad formada por una estufa de incubación, un agitador y un dispositivo de detección, de apariencia similar al sistema BacT/Alert®. Existe en dos tamaños: el modelo 9240, que tiene capacidad para 240 frascos, y el 9120, con capacidad para 120 frascos. Se pueden conectar hasta

cinco módulos al mismo ordenador que controla la unidad de procesamiento. De manera similar al sistema BacT/Alert®, cada frasco tiene un disco sensor unido a la superficie interna del fondo del frasco. La única diferencia operativa entre el sistema BacT/Alert® y el BACTEC® es que este último utiliza fluorescencia en lugar de luz espectral para detectar los cambios en la concentración de CO_2 en la mezcla de sangre-caldo de cultivo. Como el CO_2 se produce en cada frasco, su sensor emite una luz fluorescente que pasa a través de un filtro de emisión en dirección hacia un diodo sensible a la luz. Los frascos se ubican con el fondo hacia abajo dentro de los pocillos receptores que son monitorizados una vez cada 10 minutos. La lectura actual del voltaje del diodo se compara con la lectura previa. Si el cambio del voltaje excede un valor de variación preestablecido, el microordenador marca el frasco como positivo. En la pantalla del ordenador se indica la posición del frasco positivo de modo tal que se lo pueda retirar para su procesamiento posterior. Se puede obtener un gráfico que ilustra el progreso de la producción de CO_2 en cualquier momento durante la incubación.

Sistema de cultivo TREK ESP II®. El sistema de hemocultivo ESP® (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) difiere de los sistemas BacT/Alert® y BACTEC 9240/9120® en los siguientes aspectos: 1) la producción de CO_2 se monitoriza en forma manométrica, 2) se monitoriza el consumo y la producción de gas y 3) se detectan los cambios en la concentración de H_2 y O_2 , además de CO_2 .

El sistema ESP está también compuesto por una unidad de procesamiento formada por una estufa, un agitador y un dispositivo de detección. Actualmente existen sistemas para 128 o 384 frascos, aunque se puede unir más de un módulo a un ordenador central. Después de la inoculación de hasta 10 mL de sangre venosa, cada frasco se ajusta a un adaptador descartable, que incluye una aguja que atraviesa el tapón del frasco de cultivo. A continuación, se coloca cada frasco en una posición definida sobre una bandeja, de modo que el adaptador se una directamente a una sonda sensor ubicada en la parte superior de cada posición. Una vez alineado el frasco adecuadamente, la presión del gas presente en la parte superior se monitoriza en forma continua. Se toma una lectura cada 12 minutos. Cuando el cambio en la lectura excede un valor de variación preestablecido, se enciende una luz que indica la posición de todo frasco positivo.

La lectura puede suceder durante la fase de consumo de H_2 y O_2 . El consumo de O_2 se acelera en el momento en que los microorganismos que se están replicando ingresan en la fase log de crecimiento. Por lo tanto, se puede obtener una lectura temprana durante el período de incubación, antes de que se produzca una cantidad detectable de CO_2 . La determinación de varios gases es una ventaja teórica del sistema ESP, sobre todo para la detección de los microorganismos asacarolíticos que pueden producir una cantidad insuficiente de CO_2 como para ser detectado por el indicador. Sin embargo, el rendimiento del medio que se encuentra disponible en cada sistema es, al menos, tan importante como el sistema de detección.

Estudios comparativos

El rendimiento comparativo de estos sistemas de hemocultivo se ha estudiado ampliamente. De acuerdo con el diseño del estudio, el espectro de microorganismos que se aíslan a partir de las muestras clínicas, el volumen de sangre que se cultiva y el tipo exacto de frascos y la formulación de los medios que se comparan, un sistema puede resultar superior o inferior que

otro. Como las mejoras en la formulación de los medios, en la sensibilidad de los detectores y en el diseño de los instrumentos son continuas, los resultados de un estudio realizado hace unos meses no siempre refleja las técnicas actuales. Por lo tanto, cuando el director y el supervisor del laboratorio deben decidir si se implementará un nuevo sistema, deben evaluar los comentarios publicados y orales de otros colegas que han utilizado el sistema y las necesidades de su laboratorio.

Las ventajas de la monitorización continua de los sistemas de hemocultivo son la disminución de la carga de trabajo del laboratorio, la disminución de resultados falsos positivos y de pseudobacteriemias (debido a la menor manipulación y muestreo de los frascos) y el aumento significativo de la velocidad de detección y de la tasa de aislamiento microbiano. Las desventajas incluyen una base de datos limitada para algunos sistemas, la selección reducida de medios, el gran tamaño de los equipos (para los laboratorios en los cuales el espacio físico representa un problema) y, por último, pero no menos importante, el costo. La disminución de la carga del trabajo del laboratorio se debe principalmente a que el tiempo del personal técnico puede dedicarse al procesamiento sólo de los cultivos positivos en lugar de a la carga y descarga de los aparatos o al subcultivo y observación de muestras, en su mayoría negativas. Se debe realizar un ajuste en los horarios del personal ya que los cultivos pueden volverse positivos en cualquier momento del día. El director de cada laboratorio debe decidir las horas en las cuales el instrumento requiere atención.

Consideraciones especiales

MICROORGANISMOS CON REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES Y ENDOCARDITIS

A pesar de que la mayoría de los patógenos se detectan en pocos días, algunos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales crecen lentamente. Algunos de ellos producen endocarditis. En consecuencia, es conveniente prolongar el tiempo de incubación más allá del período de rutina cuando el médico lo solicita. Un problema adicional es que algunos patógenos no generan suficiente cantidad de CO_2 para accionar el detector. Una maniobra útil en cualquiera de estas situaciones es realizar una tinción con naranja de acridina a ciegas de muestras de los frascos de cultivo luego de una incubación de 7 días o del período total de incubación. Se prefiere la tinción de naranja de acridina a la tinción de Gram porque es más sensible y el frotis se puede examinar más rápidamente.

BACTERIEMIA Y SEPSIS ASOCIADAS CON LOS CATÉTERES

Se han adoptado dos estrategias básicas para el diagnóstico de las bacteriemias asociadas con los catéteres: una requiere la eliminación del catéter y la otra, no.¹⁶⁷

La sugerencia inicial para el diagnóstico, y probablemente el enfoque más común aún hoy, fue un procedimiento semicuantitativo.¹⁶⁹ En esta técnica, se hace rodar la punta del catéter por la superficie de una placa de agar y se realiza el recuento de las colonias resultantes luego de la incubación de la placa durante toda la noche. Se estableció una asociación estadísticamente significativa entre un recuento > 15 UFC con la sepsis asociada con los catéteres, confirmada luego por otros investigadores. Se describieron variaciones a este procedimiento que incluyen el cultivo de varios segmentos del catéter, la sonicación de la punta y el lavado del interior,²¹⁶ pero la simplicidad del procedimiento original atrajo a la mayoría de los microbiólogos.

La segunda estrategia es la realización de hemocultivos cuantitativos, recolectados en forma simultánea a través del catéter y por venopunción.^{88,218} La teoría es que si el catéter se infectó en forma secundaria por una bacteriemia de otra fuente, se detectará una menor cantidad de UFC en la sangre obtenida a través del catéter que la recolectada por venopunción. Si el catéter es el origen de la bacteriemia, el resultado es inverso. El método más simple para realizar los cultivos cuantitativos es el sistema de hemocultivo Isolator[®].⁸⁸

La ventaja de la técnica de cultivo cuantitativa es que si el catéter no es la causa de la bacteriemia se lo puede dejar colocado. Sin embargo, cabe destacar que es posible cambiar un catéter sobre una guía de alambre, de modo que no es necesario realizar un nuevo procedimiento para mantener el acceso vascular; en ese caso se puede decidir la eliminación del nuevo catéter luego de conocer los resultados del cultivo del primer catéter.¹⁸⁷ De cualquier modo, un catéter intravascular permanece colocado en su lugar si no es el causante de la sepsis.

TEJIDOS Y BIOPSIAS

Las muestras de tejido para cultivo deben enviarse al laboratorio rápidamente en un recipiente adecuado, estéril y tapado. Si la muestra es demasiado pequeña, puede colocarse sobre un pedazo de papel de filtro húmedo y estéril. Algunas veces se utiliza una gasa, pero puede resultar muy dificultosa la recuperación de la muestra de los intersticios de ésta. Las muestras colocadas en formol no son aptas para el cultivo, aunque es posible salvar esta situación si el tiempo de exposición ha sido breve y si se puede realizar un cultivo de la porción central del tejido que no ha estado expuesta al formol.

Los cultivos de médula ósea pueden ser útiles para establecer el diagnóstico de enfermedades granulomatosas, como brucelosis, histoplasmosis y tuberculosis. La utilización del sistema Isolator[®] para el procesamiento de muestras de médula ósea puede mejorar el aislamiento de las bacterias, en particular si las infecciones están causadas por microorganismos intracelulares.

REFERENCIAS

1. Travelers' diarrhea. NIH Consensus Development Conference. JAMA 1985;253:2700-2704.
2. Alfageme I, et al. Empyema of the thorax in adults. Etiology, microbiologic findings, and management. Chest 1993;103:839-843.
3. Allen BW, Darrell JH. Contamination of specimen container surfaces during sputum collection. J Clin Microbiol 1983;36:479-481.
4. Arrow PM, et al. Consequences of intravascular catheter sepsis. Clin Infect Dis 1993;16:778-784.
5. Atkinson JB, et al. Cardiac fungal infections: review of autopsy findings in 60 patients. Hum Pathol 1984;15:935-942.
6. Aube H, et al. Risk factors for septic shock in the early management of bacteremia. Am J Med 1992;93:283-288.
7. Bale JF Jr, Murph JR. Infections of the central nervous system in the newborn. Clin Perinatol 1997;24:787-806.
8. Bartlett JG. Anaerobic bacterial infections of the lung and pleural space. Clin Infect Dis 1993;16:Suppl 4:S248-S155.
9. Bartlett JG. Bacteriologic diagnosis in anaerobic pleuropulmonary infection. Clin Infect Dis 1993;16:Suppl 4:S443-S445.
10. Bartlett JG, et al. Should fiberoptic bronchoscopy aspirates be cultured? Am Rev Respir Dis 1976;114:73-78.
11. Bartlett JG, et al. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management: The Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 1998;26:811-838.
12. Bartlett JG, et al. Anaerobes survive in clinical specimens despite delayed processing. J Clin Microbiol 1976;3:133-136.
13. Bartlett RC, et al. Quality assurance of gram-stained direct smears. Am J Clin Pathol 1979;72:984-990.
14. Bassa AG, et al. Granuloma inguinale (donovanosis) in women. An analysis of 61 cases from Durban, South Africa. Sex Transm Dis 1993;20:164-167.
15. Bates DW, et al. Contaminant blood cultures and resource utilization (The true consequences of false-positive results). JAMA 1991;265:365-369.
16. Bayer AS. Infective endocarditis. Clin Infect Dis 1993;17:313-320.
17. Beeching NJ, et al. Streptococcus bovis bacteraemia requires rigorous exclusion of colonic neoplasia and endocarditis. Q J Med 1985;56:439-450.
18. Beekmann SE, et al. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. J Clin Microbiol 2003;41:3119-3125.
19. Benedetti JK, et al. Clinical reactivation of genital herpes simplex virus infection decreases in frequency over time. Ann Intern Med 1999;131:14-20.
20. Benin AL, et al. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin Infect Dis 2002;35:1039-1046.
21. Benjamin DR. Granulomatous lymphadenitis in children. Arch Pathol Lab Med 1987;111:750-753.
22. Bergmans DC, et al. Reproducibility of quantitative cultures of endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. J Clin Microbiol 1997;35:796-798.
23. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. Am J Med 1997;102:9-15.
24. Bille J, et al. Clinical evaluation of the lysis-centrifugation blood culture system for the detection of fungemia and comparison with a conventional biphasic broth blood culture system. J Clin Microbiol 1984;19:126-128.
25. Bisno AL. Acute pharyngitis. N Engl J Med 2001;344:205-211.
26. Bisno AL, et al. Practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2002;35:113-125.
27. Bisno AL, et al. Diagnosis of strep throat in adults: are clinical criteria really good enough? Clin Infect Dis 2002;35:126-129.
28. Bowler PG, et al. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 2001;14:244-269.
29. Bradbury SM. Collection of urine specimens in general practice: to clean or not to clean? J R Coll Gen Pract 1988;38:363-365.
30. Briselden AM, et al. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. J Clin Microbiol 1992;30:663-666.
31. Brooksaler E, Nelson JD. Pertussis: a reappraisal and report of 190 confirmed cases. Am J Dis Child 1967;114:389-396.
32. Brouqui P, et al. Chronic Bartonella quintana bacteremia in homeless patients. N Engl J Med 1999;340:184-189.
33. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001;14:177-207.
34. Brown EJ, et al. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. Rev Infect Dis 1983;5(Suppl 4):S797-S805.
35. Brown JR. Human actinomycosis: a study of 181 subjects. Hum Pathol 1973;4:319-330.
36. Brunham RC, et al. Mucopurulent cervicitis: the ignored counterpart in women of urethritis in men. N Engl J Med 1984;311:1-6.
37. Bryan CS. Clinical implications of positive blood culture. Clin Microbiol Rev 1989;2:329-353.
38. Bryan CS, Reynolds KL. Bacteremic nosocomial pneumonia: analysis of 172 episodes from a single metropolitan area. Am Rev Respir Dis 1984;129:668-671.
39. Bryant JK, Strand CL. Reliability of blood cultures collected from intravascular catheter versus venipuncture. Am J Clin Pathol 1987;88:113-116.
40. Buchanan K, et al. Comparison of quantitative and semiquantitative culture techniques for burn biopsy. J Clin Microbiol 1986;23:258-261.
41. Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. Clin Microbiol Rev 1994;7:89-116.
42. Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. J Clin Microbiol 2002;40:3115-3120.
43. Carroll KC, et al. Laboratory evaluation of urinary tract infections in an ambulatory clinic. Am J Clin Pathol 1994;101:100-103.
44. Casey BM, Cox SM. Chorioamnionitis and endometritis. Infect Dis Clin North Am 1997;11:203-222.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendation for the prevention and management of Chlamydia trachomatis infections, 1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993;42:1-39.
46. Centers for Disease Control and Prevention. 1998 guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998;47:1-111.
47. Centers for Disease Control and Prevention. Primary and secondary syphilis United States, 2000-2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:971-973.
48. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of foodborne illnesses: a primer for physicians and other health care professionals. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004;53(RR-4):1-29.
49. Chapnick EK, et al. Technique for drawing blood for cultures: is changing needles truly necessary? South Med J 1991;84:1197-1198.
50. Chastre J, et al. Diagnosis of nosocomial bacterial pneumonia in intubated patients undergoing ventilation: comparison of the usefulness of bronchoalveolar lavage and the protected specimen brush. Am J Med 1988;85:499-506.
51. Claridge JE III, et al. Streptococcus intermedius, Streptococcus constellatus, and Streptococcus anginosus ("Streptococcus milleri group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. Clin Infect Dis 2001;32:1511-1515.
52. Cockerill FR III, et al. Analysis of 281,797 consecutive blood cultures performed over an eight-year period: trends in microorganisms isolated and the value of anaerobic culture of blood. Clin Infect Dis 1997;24:403-418.
53. Connolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. Infect Dis Clin North Am 1990;4:599-622.

54. Cook RL, et al. Clinical, microbiological and biochemical factors in recurrent bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:870-877.
55. Cornish N, et al. Reassessment of the incubation time in a controlled clinical comparison of the BacT/Alert aerobic FAN bottle and standard anaerobic bottle used aerobically for the detection of bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:1-7.
56. Crawford J, Russell C. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with sub-acute bacterial endocarditis to fibrinplatelets clots in vitro. *J Appl Bacteriol* 1986;60:127-133.
57. Cunha BA. Osteomyelitis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2001;33:287-293.
58. Daly JA, et al. Evaluation of the Wayson variation of a methylene blue staining procedure for the detection of microorganisms in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1985;21:919-921.
59. Dangor Y, et al. A simple medium for the primary isolation of *Haemophilus ducreyi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:930-934.
60. Dangor Y, et al. Transport media for *Haemophilus ducreyi*. *Sex Transm Dis* 1993;20:5-9.
61. De Boer AL, et al. Cytologic identification of Donovan bodies in granuloma inguinale. *Acta Cytol* 1984;28:126-128.
62. de Wit MA, et al. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2000;33:280-288.
63. Deitch EA, Desforages JP. The management of burns. *N Engl J Med* 1990;323:1249-1253.
64. DeLorier JS, Asenbach PS. The leukocyte esterase test for detection of cerebrospinal fluid leukocytosis and bacterial meningitis. *Ann Emerg Med* 1989;18:1191-1198.
65. Denay FW, et al. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatric* 1983;71:871-876.
66. DeShazo RD, et al. Fungal sinusitis. *N Engl J Med* 1997;337:254-259.
67. Dickens DL, et al. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis* 1999;29:595-607.
68. Domingue GJ Sr, Hellstrom WJ. Prostatitis. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:604-613.
69. Donowitz GR, Mandell GL. Acute pneumonia. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:540-555.
70. Dozcher CW, et al. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over a 15 year period. *Rev Infect Dis* 1991;13:633-636.
71. Duguid H, et al. *Actinomyces* and intracranial devices. *JAMA* 1982;248:1579-1580.
72. Duane DW, Quagliarello V. Group B streptococcal meningitis in adults. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:1-10.
73. Durack DT, et al. Apparent failures of endocarditis prophylaxis. Analysis of 52 cases submitted to a national registry. *JAMA* 1983;250:2318-2322.
74. Eschenbach DA, et al. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:819-828.
75. El Sahly HM, et al. Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with "Common Cold" virus infections. *Clin Infect Dis* 2000;31:96-100.
76. Elishov H, et al. Nosocomial colonization, septicemia, and Hickman/Broviac catheter-related infections in bone marrow transplant recipients: a 5-year prospective study. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:83-101.
77. Ellner JJ, et al. Infective endocarditis caused by slow-growing fastidious gram-negative bacteria. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:145-158.
78. Elting LS, et al. Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1992;14:1201-1207.
79. Erss DJ. Counting blood culture contamination rates. *Med Lab Observ* 2004;36:14-18.
80. Eschenbach DA, Wager GP. Perineal infections. *Clin Obstet Gynecol* 1980;23:1003-1037.
81. Evans FO, et al. Sinusitis of the maxillary antrum. *N Engl J Med* 1975;293:735-739.
82. Events RJ, et al. Contamination of catheter-drawn blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001;39:3393-3394.
83. Falagoutis MF, et al. Histopathology of cerebral toxoplasmosis in human immunodeficiency virus infection: a comparison between patients with early-onset and late-onset acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 1994;25:1093-1097.
84. Fein AM. Pneumonia in the elderly: overview of diagnostic and therapeutic approaches. *Clin Infect Dis* 1999;28:726-729.
85. Finegold SM, et al. Bacteriologic findings associated with chronic bacterial maxillary sinusitis in adults. *Clin Infect Dis* 2002;35:428-433.
86. Fleisher GR. The management of bite wounds. *N Engl J Med* 1999;340:138-140.
87. Flensing DT, et al. Reopen simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med* 1997;337:1103-1111.
88. Flynn PM, et al. Differential quantitation with a commercial blood culture tube for diagnosis of catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1045-1048.
89. Foley FD, et al. Herpesvirus infection in burned patients. *N Engl J Med* 1970;282:652-656.
90. Fraser RS. Pulmonary aspergillosis: pathologic and pathogenetic features. *Pathol Annu* 1993;28:231-277.
91. Fraylu H, et al. Nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates equally effective for the diagnosis of viral respiratory disease in hospitalized children. *J Clin Microbiol* 1989;27:1387-1389.
92. Gdonra R, et al. Culture-negative endocarditis due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:718-720.
93. Getter WB. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *J Thorac Imaging* 1992;7:56-74.
94. Gihot S, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med* 2004;350:451-458.
95. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:33-51.
96. Glaser CA, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2003;36:731-742.
97. Glickman R, et al. Sputum gram stain assessment community-acquired bacteremic pneumonia. *J Clin Microbiol* 1988;26:846-849.
98. Golden TM, Patterson R. Pulmonary allergic aspergillosis. *Ann Intern Med* 1970;72:393-403.
99. Grace CJ, et al. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32:1631-1635.
100. Graham DR, Bond JD. *Citrobacter diversus* brain abscess and meningitis in neonates. *JAMA* 1981;245:1923-1925.
101. Gray LD, Federico DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:130-145.
102. Grodzinsky M. Retropharyngeal and lateral pharyngeal abscesses: an anatomic and clinical study. *Ann Surg* 1939;110:177-199.
103. Guerrant RL. Gastrointestinal infection and food poisoning: principles and definition of syndrome. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:839.
104. Guerrant R, Steiner TS. Principle and syndrome of enteric infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:1076-1093.
105. Gwaltney JM Jr, et al. The microbial etiology and antimicrobial therapy of adults with acute community-acquired sinusitis: a fifteen-year experience at the University of Virginia and review of other selected studies. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90 (Pt 2):457-461.
106. Hall LR, Peatman F. Pathogenesis of onchocercal keratitis (river blindness). *Clin Microbiol Rev* 1999;12:445-453.
107. Hamilton JR, et al. Performance of *Cryptococcus* antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after praziquantel treatment. *J Clin Microbiol* 1991;29:313-319.
108. Hammerschlag MR, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992;14:178-182.
109. Harshboud GW, et al. Comparison of specimen collection and laboratory techniques for isolation of *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol* 1978;7:39-43.
110. Handsfield HL. Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med* 1997;102:16-20.
111. Harnisch JP, et al. Diphtheria among alcoholic urban adults: a decade of experience in Seattle. *Ann Intern Med* 1989;111:71-82.
112. Hearn J, et al. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 2000;68:5364-5376.
113. Henderson FW, et al. The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J Pediatr* 1979;95:183-190.
114. Herpaly JO. Otitis media. *N Engl J Med* 2002;347:1169-1174.
115. Hernesky TW, et al. Survey of physician diagnostic practices for patients with acute diarrhea: clinical and public health implications. *Clin Infect Dis* 2004;38(Suppl 3):S203-S211.
116. Herwaldt BL, Ackers ML. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *N Engl J Med* 1997;336:1548-1556.
117. Holmes KK, et al. Salpingitis: overview of etiology and epidemiology. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:893-900.
118. Hols E, et al. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcomes. *J Clin Microbiol* 1994;32:176-186.
119. Hoogkamp-Korstanje JA, et al. Analysis of bacterial infections in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 1982;3:275-284.
120. Hoppe JE. Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:616-620.
121. Hothkiss RS, Karl JE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
122. Hubbard WA, et al. Comparison of the B-D urine culture kit with a standard culture method and with MS-2. *J Clin Microbiol* 1983;17:327-331.
123. Hughes JG, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *J Clin Microbiol* 2001;39:4468-4474.
124. Ishak MA, et al. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 1985;22:1025-1029.
125. Ito F, et al. Specific immunofluorescence staining of *Treponema pallidum* in smears and tissues. *J Clin Microbiol* 1991;29:444-448.
126. Jacobs RE, et al. *Pseudomonas* osteochondritis complicating puncture wounds of the foot in children: a 10-year evaluation. *J Infect Dis* 1989;160:657-661.
127. Jay V. Ignaz Semmelweis and the conquest of puerperal sepsis. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:561-562.
128. Jewkes FE, et al. Home collection of urine specimens-beric acid bottles of Depslide? *Arch Dis Child* 1990;65:286-289.
129. Johnson WG Jr, et al. Chugging pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med* 1969;281:1137-1140.
130. Jones RE, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002. *MMWR Recomm Rep* 2002;51(RR-13):1-38.
131. Jones C, et al. Inability of the Chemstrip LN compound with quantitative urine culture to predict significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1986;23:160-162.

132. Jones JL, et al. Survey of clinical laboratory practices for parasitic disease. *Clin Infect Dis* 2004;38(Suppl 3):S198-S202.
133. Jones RB, Battinger RE. *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:1989-2004.
134. Jodis N, et al. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341:1906-1912.
135. Kaye E. Antibacterial activity of human urine. *J Clin Invest* 1968;42:2374-2390.
136. Kelly MT, et al. Clinical comparison of Isolator and BACTEC 660 resin media for blood culture. *J Clin Microbiol* 1990;28:1925-1927.
137. Klenh R, et al. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. *J Clin Microbiol* 1995;33:816-820.
138. Klein TE, Camasta R. Comparative recoveries of *Mycobacterium avium*/*Mycobacterium intracellulare* from isolator lysis-centrifugation and BACTEC 13A blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1988;26:760-761.
139. Kierkegaard H, et al. Falsely negative urinary leucocyte counts due to delayed examination. *Scand J Clin Lab Invest* 1980;40:259-261.
140. Kinball MW, Kree S. Gonococcal proctitis in a male. The Fitz-Hugh-Curtis syndrome. *N Engl J Med* 1970;282:1082-1084.
141. Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:1-13.
142. Kimberlin DW, Rowe DL. Genital herpes. *N Engl J Med* 2004;350:1970-1977.
143. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. Varicella-zoster virus infections of the nervous system: clinical and pathologic correlates. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:770-780.
144. Klotz SA, et al. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:662-683.
145. Kohl S. Herpes simplex virus encephalitis in children. *Pediatr Clin North Am* 1986;35:465-483.
146. Koransky JR, et al. *Clostridium septicum* bacteremia: its clinical significance. *Am J Med* 1979;66:63-66.
147. Kosekangas P, et al. Synovial fluid culture and blood culture in acute arthritis: a multi-case report of 90 patients. *Scand J Rheumatol* 1995;24:44-47.
148. Krumholz HM, et al. Blood culture phlebotomy: switching needles does not prevent contamination. *Ann Intern Med* 1990;113:290-292.
149. Kusumi RK, et al. Rapid detection of pyuria by leukocyte esterase activity. *JAMA* 1981;245:1653-1655.
150. Lamy B, et al. What is the relevance of obtaining multiple blood samples for culture? A comprehensive model to optimize the strategy for diagnosing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002;35:842-850.
151. Larsen SA, et al. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
152. Lee A, Hazell SL. *Campylobacter pylori* in health and disease: and ecological perspective. *Microbiol Ecol Health Dis* 1988;1:1-16.
153. Lee ME, Lindquist TD. Syphilitic interstitial keratitis. *JAMA* 262:2921-2921, 1939.
154. Lefrick JL, et al. Transient bacteremia associated with sigmoidoscopy. *N Engl J Med* 1973;289:467-469.
155. Leibowitz HM. The red eye. *N Engl J Med* 2000;343:345-351.
156. Lemmo JR, Lucks DA. Nonvalue of sputum culture in the management of lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1988;25:758-762.
157. Lew DE, Wadgymar FA. Osteomyelitis. *N Engl J Med* 1977;336:999-1007.
158. Liesegang TJ. Bacterial keratitis. *Infect Dis Clin North Am* 1992;6:815-829.
159. Little JR, et al. A randomized trial of povidone-iodine compared with iodine tincture for venipuncture site disinfection: effects on rates of blood culture contamination. *Am J Med* 1999;107:119-125.
160. Livesey NJ, Chow AW. Infected pressure ulcers in elderly individuals. *Clin Infect Dis* 2002;35:1390-1396.
161. Lodge TP, et al. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003;36:1418-1423.
162. Loch M. Pneumonia in older persons. *Clin Infect Dis* 2003;37:1333-1339.
163. Lacey D, et al. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* 1992;14:683-688.
164. Luneman A, et al. Infections in burn patients. *Am J Med* 1986;81:45-52.
165. Lyon R, Woods G. Comparison of the BacTAlert and Isolator blood culture systems for recovery of fungi. *Am J Clin Pathol* 1995;103:660-662.
166. Ma P, et al. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: a review. *Rev Infect Dis* 1990;12:490-513.
167. Mader FH, Snalling RE. Viral keratitis. *Infect Dis Clin North Am* 1992;6:831-849.
168. Mahony JB, Pinesky MA. Effect of swab type and storage temperature in the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 1985;22:865-867.
169. Mahi DG, et al. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305-1309.
170. Malan AK, et al. Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 2004;42:727-733.
171. Mandell LA, et al. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2000;31:383-421.
172. Marchevsky ASL, et al. The changing spectrum of disease, etiology, and diagnosis of mucormycosis. *Hum Pathol* 1980;11:457-464.
173. Marquez-Davila G, Martinez-Barrera CE. Predictive value of the "blue cells" investigation and the amine volatilization test in vaginal infections caused by *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1985;22:686-687.
174. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;i:1311-1315.
175. Martens MG, et al. Comparison of two endometrial sampling devices. Cotton-tipped swab and double-lumen catheter with a brush. *J Reprod Med* 1989;34:875-879.
176. Mathisen GE, Johnson JP. Brain abscess. *Clin Infect Dis* 1993;25:763-779.
177. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:518-553.
178. Maury E, et al. Circulating endotoxin during initial antibiotic treatment of severe gram-negative bacteremic infections. *J Infect Dis* 1998;178:270-273.
179. Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections: then and now. *Clin Infect Dis* 2003;37:543-550.
180. Mayo-Smith MF, et al. Acute epiglottitis in adults: an eight-year experience in the state of Rhode Island. *N Engl J Med* 1986;314:1133-1139.
181. Matzulli T, et al. Reproducibility of interpretation of Gram-stained vaginal ear for the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:1506-1508.
182. McDonald LC, et al. Controlled comparison of BacT/ALERT FAN aerobic medium and BACTEC fungal blood culture medium for detection of fungemia. *J Clin Microbiol* 2001;39:623-624.
183. McFarland LV, et al. Rectal swab cultures for *Clostridium difficile* surveillance studies. *J Clin Microbiol* 1987;25:2241-2242.
184. McGee ZA, Dainger JR. Acute meningitis. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3rd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:741-755.
185. Melnick K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 2002;346:429-437.
186. Melgar GR, et al. Fungal prosthetic valve endocarditis in 16 patients: an 11-year experience in a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:94-103.
187. Mermel LA, et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 2001;33:1209-1272.
188. Mertz RJ, et al. Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. *J Infect Dis* 1998;178:1795-1798.
189. Mertz RJ, et al. An investigation of genital ulcers in Jackson, Mississippi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: high prevalence of chancroid and human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1998;178:1060-1066.
190. Muret S, et al. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001;39:3279-3281.
191. Monte-Verde D, Nisenzuck JS. The sensitivity and specificity of nitrite testing for bacteriuria. *Lab Med* 1981;12:755-757.
192. Morales DM. Death of a president. *N Engl J Med* 1999;341:1845-1849.
193. Moens AJ, et al. Rationale for selective use of anaerobic blood cultures. *J Clin Microbiol* 1993;31:2110-2113.
194. Nelson MA. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infect Disease*. 4th Ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:Chapter 178.
195. Murdoch DR, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3495-3498.
196. Murray PR. Determination of the optimum incubation period of blood culture broths for the detection of clinically significant septicemia. *J Clin Microbiol* 1985;85:481-485.
197. Murray PR, et al. Comparative evaluation of the Quid signal and Roche septicheck blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1988;26:2526-2530.
198. Mushar DM, et al. Bacteremic and nonbacteremic pneumococcal pneumonia: a prospective study. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:210-221.
199. Mylonakis E, Calderwood SR. Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* 2001;345:1318-1330.
200. Mylotte JM. Nursing home-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002;35:1205-1211.
201. Nash D, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001;344:1807-1814.
202. Nichols RL, Smith IW. Wound and intraabdominal infections: microbiological considerations and approaches to treatment. *Clin Infect Dis* 1993;16(Suppl 4):S266-S272.
203. Nicolle LE. Asymptomatic bacteriuria: important or not? *N Engl J Med* 2000;343:1037-1039.
204. Nicolle LE, et al. Urine specimen collection with external devices for diagnosis of bacteriuria in elderly incontinent men. *J Clin Microbiol* 1988;26:1115-1119.
205. Noah DH, et al. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Ann Intern Med* 1998;128:922-930.
206. O'Hara CM, Weinstein MP, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:185-207.
207. Paisley JW, Lauer BA. Pediatric blood cultures. *Clin Lab Med* 1994;14:17-30.
208. Paramassian CN, et al. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle* 1983;64:119-121.
209. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;328:1471-1477.
210. Petri RL, Silberman R. Effects of overnight refrigeration on the microscopic evaluation of sputum. *J Clin Microbiol* 1984;19:164-163.
211. Peil B, et al. Cost-effectiveness of blood cultures for adult patients with cellulitis. *Clin Infect Dis* 1999;29:1483-1488.

212. Pelo MT, et al. Detection of bacteremia and pyuria by URISCREEN a rapid enzymatic screening test. *J Clin Microbiol* 1992;30:680-684.
213. Pfaffer MA, et al. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:283-297.
214. Pfaffer MA, Kloos EE. Laboratory evaluation of leukocyte esterase and nitrite tests for the detection of bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1985;21:840-842.
215. Piper C, et al. Prosthetic valve endocarditis. *Heart* 2001;85:590-593.
216. Prince HE, et al. Utility of the Focus Technologies West Nile virus immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for testing cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2004;42:12-15.
217. Prober CG. Arvin AM. Perinatal viral infections. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:245-261.
218. Quilici N, et al. Differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis in intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1997;25:1066-1070.
219. Quinn TC, et al. *Chlamydia trachomatis* proctitis. *N Engl J Med* 1981;305:195-200.
220. Rand H, Ikley GP. Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin Infect Dis* 1992;15:197-208.
221. Rajan R, et al. Systemic douryososis. *Br J Venet Dis* 1954;30:73-80.
222. Rathore MH, et al. Latex particle agglutination tests on the cerebrospinal fluid: a reappraisal. *J Fla Med Assoc* 1995;82:21-23.
223. Razan KR. Viral meningitis. *Med Clin North Am* 1985;69:399-413.
224. Ramonen I, et al. Prognostic factors in childhood acute encephalitis. *Pediatr Infect Dis J* 1993;10:441-446.
225. Reimer LG, Carroll KC. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 1998;26:742-748.
226. Reimer LG, et al. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:444-465.
227. Stein ME, Mandell GL. Bacterial killing by bactericidal saline solutions: potential for diagnostic error. *N Engl J Med* 1973;289:794-795.
228. Reller LB, et al. *Canniths* IA. Blood Cultures II. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
229. Ringelmann R, et al. Role of immunological tests in diagnosis of bacterial meningitis. *Antibiot Chemother* 1992;45:68-78.
230. Robson MC, et al. Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg* 1990;17:485-492.
231. Ronald AR, Plummer FA. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*. *Ann Intern Med* 1985;102:805-807.
232. Ronald AR, Plummer FA. Chancroid and granuloma inguinale. *Clin Lab Med* 1989;9:535-543.
233. Rosen T, et al. Granuloma inguinale. *J Am Acad Dermatol* 1984;11:433-437.
234. Rosemund EA, Rowley AH. Infectious intracranial complications of sinusitis, other than meningitis, in children: 12-year review. *Clin Infect Dis* 1994;18:750-754.
235. Rosen B, et al. Prospective study of the usefulness of sputum gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis* 2000;31:869-874.
236. Rummens JL, et al. Isolation of *Cryptosporidium* species with a new selective medium. *J Clin Microbiol* 1985;22:375-378.
237. Sachs MK, et al. Failure of dihydrothreitol and primase to reveal a false-positive cryptococcal antigen determination in cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 1991;96:381-384.
238. Sandberg T, et al. Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factor in women with symptomatic urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 1998;26:1471-1476.
239. Sandlin RM, Shufman SD. Infective endocarditis: review of 115 case over 9 years. *Clin Infect Dis* 1996;22:276-286.
240. Sauerbrel A, Wutler P. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* 2002;25:Suppl 51.
241. Schaeff VM, et al. The limited value of symptom and signs in the diagnosis of vaginal infections. *Arch Intern Med* 1998;158:1929-1935.
242. Schacker T, et al. Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men. *JAMA* 1998;280:61-66.
243. Schacker T, et al. Frequency of symptomatic and asymptomatic herpes simplex virus type 2 reactivations among human immunodeficiency virus-infected men. *J Infect Dis* 1998;178:1616-1622.
244. Schifman RR, et al. Solitary blood cultures as a quality assurance indicator. *Qual Assur Util Rev* 1991;6:132-137.
245. Schneider M, et al. Quantitative assessment of bacterial invasion of chronic ulcers. Statistical analysis. *Am J Surg* 1983;145:260-262.
246. Schullie JM, et al. Chancroid in the United States, 1981-1990: evidence for underreporting of cases. *MMWR CDC Surveill Summ* 1992;41:57-61.
247. Schwabe LJ, et al. A comparison of Oxoid Signif with nonradiometric BACTEC NR-660 for detection of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:3-8.
248. Schwartz R, et al. The nasopharyngeal culture in acute otitis media: a reappraisal of its usefulness. *JAMA* 1979;241:2170-2173.
249. Schöen C, et al. *Lymphogranuloma venereum*: 27 cases in Paris. *J Infect Dis* 1989;160:662-668.
250. Seaworth JB, et al. Brain abscess caused by a variety of *Clostridium trichosporum*. *Am J Clin Pathol* 1983;79:747-752.
251. Schrid VN, Sharna HK. Pseudolephthariasis of the penis following douryososis. *J Dermatol* 1990;17:130-131.
252. Senciler LD, et al. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 2001;32:1691-1697.
253. Sepkowitz KA. Opportunistic infection in patients with and without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2002;34:1098-1107.
254. Shandra WX, et al. Neurocysticercosis in Houston, Texas: a report of 112 cases. *Medicine (Baltimore)* 1994;73:37-52.
255. Shelness D, et al. High levels of *Gardovella vaginalis* detected with an oligonucleotide probe combined with elevated pH as a diagnostic indicator of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:642-648.
256. Shenoy RJ, et al. Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of toll plate, sonication, and flushing methodologies. *J Clin Microbiol* 1997;35:641-646.
257. Shintoff ME, Mader JE. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:527-544.
258. Siegman-Igra Y, et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002;34:1431-1439.
259. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical epidemiologic, and some biologic features. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:187-209.
260. Slater LN, et al. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* 1990;323:1587-1593.
261. Smailley DL, Bradley ME. Correlation of leukocyte esterase activity and bacterial infection from body fluids. *J Clin Microbiol* 1984;20:1186-1188.
262. Smart D, et al. Effect of needle clamping and intravenous cannula collection on blood culture contamination rates. *Ann Emerg Med* 1993;22:1164-1168.
263. Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types and 1: a global review. *J Infect Dis* 2002;186:Suppl 28.
264. Smith TJ, et al. Isolation of viruses from single throat swabs processed for diagnosis of group A beta-hemolytic streptococci by fluorescent antibody technique. *Am J Clin Pathol* 1973;60:707-710.
265. Snow RW, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet* 1997;349:1650-1654.
266. Sobel JD. Vaginitis. *N Engl J Med* 1997;337:1896-1903.
267. Solomon AR. New diagnostic tests for herpes simplex and varicella zoster infection. *J Am Acad Dermatol* 1988;18:214-221.
268. Spach EL, et al. Proposal of an easy method to improve routine sputum bacteriology. *Respiration* 1989;56:137-146.
269. Speich R, et al. Low specificity of the bacterial index for the diagnosis of bacterial pneumonia by bronchoalveolar lavage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:78-84.
270. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:483-502.
271. Stamm WE. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. *Am J Med* 1991;91:655-715.
272. Stamm WE, et al. Indwelling urethral catheters as a source of nosocomial bacteremia: an outbreak caused by *Flavobacterium* species. *N Engl J Med* 1975;292:1099-1102.
273. Stamm WE, Hooton TM. Management of urinary tract infection- in adult. *N Engl J Med* 1993;329:1328-1334.
274. Stamm WE, et al. Treatment of the acute urethral syndrome. *N Engl J Med* 1981;304:956-958.
275. Stamm WE, et al. Causes of the acute urethral syndrome in women. *N Engl J Med* 1980;303:409-415.
276. Stanculescu L, et al. Role of fibronectin in attachment of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* to human cell lines and isolated oral epithelial cells. *Infect Immun* 1985;18:257-259.
277. Starr CE, Paxan-Langston D. Varicella-zoster virus: mechanisms of pathogenicity and control disease. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15:7-15.
278. Stein BL, et al. Sexual activity contraceptive use, and other risk factors for symptomatic and asymptomatic bacteremia. A case-control study. *Ann Intern Med* 1987;107:816-823.
279. Sult TL, UPama B. Epidemiology and natural history of urinary tract infections in children. *Med Clin North Am* 1991;75:287-297.
280. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-1186.
281. Swartz MN. Cellulitis. *N Engl J Med* 2004;350:904-912.
282. Syed NA, Hyndak RA. Infectious conjunctivitis. *Infect Dis Clin North Am* 1992;6:789-805.
283. Tiao DA, et al. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N Engl J Med* 1999;340:85-92.
284. Taylor DE, et al. Isolation and characterization of *Campylobacter pyloridis* from gastric biopsies. *Am J Clin Pathol* 1987;87:49-54.
285. Tedder DG, et al. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocyte meningitis. *Ann Intern Med* 1994;121:534-539.
286. Temi M, et al. Aseptic meningitis in association with herpes proceritidis. *N Engl J Med* 1971;285:503-504.
287. Thielman NM, Glennon RL. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med* 2004;350:38-47.
288. Thwaites GE, et al. Improving the bacteriologic diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2004;42:378-379.
289. Tierney BM, et al. Early detection of positive blood cultures by the acidine orange staining technique. *J Clin Microbiol* 1983;18:830-833.
290. Torres A, Ewig S. Diagnosing ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med* 2004;350:433-435.
291. Torres A, et al. Diagnostic value of nonfluoroscopic percutaneous lungneedle aspiration in patients with pneumonia. *Chest* 1990;98:840-844.
292. Tsai IK, et al. *Clostridium perfringens* septicemia with massive hemolysis. *Scand J Infect Dis* 1989;21:467-471.
293. Tunkel AR. Evaluation of culture-negative endocarditis. *Thesp Pract* 1993;28:59-66.

294. Uehling DE, Hasham AJ. Significance of catheter tip cultures. *Invest Urol* 1977;15:57-58.
295. Valenstein PN. Semiquantitation of bacteria in sputum gram stains. *J Clin Microbiol* 1988;26:1791-1794.
296. van Vliet KE, et al. Multicenter evaluation of the AmpliCor Enterovirus PCR test with cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2652-2657.
297. Versaovic J. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *Am J Clin Pathol* 2003;119:403-412.
298. Voetsch AC, et al. Laboratory practices for stool specimen culture for bacterial pathogens, including *Escherichia coli* O157:H7, in the FoodNet sites, 1995-2000. *Clin Infect Dis* 2004;38(Suppl 3):S190-S197.
299. von Eiff C, et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 2001;344:11-16.
300. Wongpanasiri W, et al. Prosthetic heart valves. *N Engl J Med* 1996;335:407-416.
301. Waisman Y, et al. The validity of the uriscree test for early detection of urinary tract infection in children. *Pediatrics* 1999;104:e41.
302. Wald A, et al. Genital shedding of herpes simplex virus among men. *J Infect Dis* 2002;186(Suppl 9).
303. Wald A, et al. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 2000;342:844-850.
304. Wald ER. Sinusitis in children. *N Engl J Med* 1992;326:319-323.
305. Walker FG, Koop RK. Urine sampling in ambulatory women: midstream clean-catch versus catheterization. *Ann Emerg Med* 1989;18:166-172.
306. Waltzman ML, Harper M. Financial and clinical impact of false-positive blood culture results. *Clin Infect Dis* 2001;33:296-299.
307. Warren JW, et al. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* 1999;29:745-758.
308. Warren SS, Allen SD. Clinical pathogenic and laboratory features of *Coprocaryophaga* infections. *Am J Clin Pathol* 1986;86:513-518.
309. Washington JA II, et al. Detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. *Lab Med* 1981;12:294-296.
310. Watanakunakorn G, Burkett T. Infective endocarditis at a large community teaching hospital, 1980-1990: a review of 230 episodes. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:90-102.
311. Weese WC, Smith IM. A study of 57 cases of actinomycosis over a 36-year period: a diagnostic "failure" with good prognosis after treatment. *Arch Intern Med* 1975;135:1562-1568.
312. Weinstein FL, et al. Doing it right the first time: quality improvement and the contaminant blood culture. *J Clin Microbiol* 1997;35:563-565.
313. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problem and partial progress. *J Clin Microbiol* 2003;41:2275-2278.
314. Weinstein MP, et al. The effect of altered headspace atmosphere on yield and speed of detection of the Oxoid Signif blood culture system versus BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1990;28:795-797.
315. Weinstein MP, et al. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood culture: evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive panel versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol* 1998;36:2089-2092.
316. Weinstein MP, et al. The clinical significance of positive blood culture: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:54-70.
317. Weinstein MP, Reller LB. Clinical importance of "breakthrough" bacteremia. *Am J Med* 1984;76:175-180.
318. Weinstein MP, et al. The clinical significance of positive blood culture: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis* 1983;5:35-53.
319. Weinstein MP, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997;24:584-602.
320. Wendt C, Grunwald WJ. Polyclonal bacteremia due to gram-negative rods. *Clin Infect Dis* 2001;31:460-463.
321. Whitley RJ, Kimberlin DW. Viral encephalitis. *Pediatr Rev* 1999;20:192-198.
322. Wieland M, et al. Left-sided endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*: a report of 10 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1986;65:180-189.
323. Wilson ML, Galdo L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 2004;38:1150-1158.
324. Wilson ML, et al. Comparison of iodophor and alcohol pledgets with the mediflex blood culture prep kit II for preventing contamination of blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;38:4665-4667.
325. Wild ME, Chernick V. State of the art: bronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:729-781.
326. Wolner-Hansen P, et al. Isolation of *Citromyxa murchisonii* from the liver capsule in Fitz-Hugh-Curtis syndrome. *N Engl J Med* 1982;306:113-113.
327. Woods DE, et al. Role of flumequin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *J Infect Dis* 1981;143:784-790.
328. Wu TC, Kuo SY. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1983;18:1120-1127.
329. Xu F, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simple virus type 1 and type 2 in the United State, 1988-1994. *J Infect Dis* 2002;185:1019-1024.
330. Yagupsky P, Nole FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:269-279.
331. Yagupsky P, Press J. Use of the isolator 1.5 microbial tube for culture of synovial fluid from patients with septic arthritis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2419-2412.
332. Yuen KY, Seto WH, Ong SG, et al. The significance of *Branhamella catarrhalis* in bronchopulmonary infection—a case-control study. *J Infect* 1989;19:2511-2516.
333. Ziai M, Haggerty RJ. Neonatal meningitis. *N Engl J Med* 1958;259:314-320.

El diagnóstico de laboratorio por métodos inmunológicos

Antígenos y anticuerpos: definiciones básicas

Anticuerpos monoclonales

Tipos de reacciones antígeno-anticuerpo utilizadas en el diagnóstico serológico

Reacciones de precipitación

Fijación del complemento e inhibición de la hemaglutinación

Reacciones de aglutinación

Métodos de inmunoanálisis en fase sólida

Enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos

Métodos enzimoimmunológicos de captura de anticuerpos para la detección de IgM

Enzimoimmunoanálisis para la detección de antígenos

Técnicas de inmunofluorescencia

Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de antígenos

Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos

En los laboratorios de microbiología clínica, el cultivo de microorganismos a partir de muestras clínicas es aún el principal método de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Durante las décadas de 1940 y 1950 las técnicas serológicas, como la inmunodifusión de Oudin y de Ouchterlony, creadas en el ámbito de la investigación, fueron implementadas en esos laboratorios. Más tarde, se pusieron en práctica otros métodos basados en conceptos inmunológicos básicos, como la fijación del complemento para documentar en forma retrospectiva la respuesta inmunitaria del huésped a la infección. La aparición del radioimmunoanálisis, el enzimoimmunoanálisis y la tecnología de los híbridos ha modificado por completo el papel de la serología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Mediante el esfuerzo de muchos científicos y personal de laboratorio, los métodos creados originalmente para la detección de anticuerpos han sido rediseñados para lograr la detección directa de antígenos microbianos en muestras de pacientes. Las técnicas inmunoserológicas nuevas han expandido el papel del laboratorio en la atención del paciente y han logrado constituirse como herramientas diagnósticas ampliamente aceptadas por bioquímicos y médicos. Sin embargo, estas técnicas tienen su fundamento en ciertos conceptos inmunológicos básicos. Luego de un breve repaso de estos conceptos, estudiaremos las aplicaciones más recientes de la inmunoserología en la atención del paciente.

Antígenos y anticuerpos: definiciones básicas

Un **antígeno** es una sustancia que induce la formación de anticuerpos en un animal que se inmuniza contra ella en particular. Casi siempre, el antígeno es inmunogénico, es decir, puede estimular la formación de anticuerpos y unirse de manera específica con los anticuerpos que se formaron contra él. No todas las estructuras moleculares que componen un antígeno son igualmente inmunogénicas; las que lo son y son reconocidas por los anticuerpos se denominan **determinantes antigénicos inmunodominantes o epítopos**. Las características únicas de cada antígeno dependen de los tipos y de las secuencias de aminoácidos de una proteína, de la composición química y estructural de los polisacáridos, glucoproteínas y ácidos nucleicos y de sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. Diferentes tipos de moléculas pueden compartir determinantes antigénicos y ser reconocidas por anticuerpos dirigidos contra esos determinantes. Por ejemplo, la porción C1 de la cadena liviana de varias clases de inmunoglobulinas (se analizan más adelante) contiene determinantes antigénicos comunes que permiten que sean reconocidos por los mismos anticuerpos. Estas combinaciones antígeno-anticuerpo se denominan "reactividad cruzada". Las reacciones cruzadas de los anticuerpos con antígenos comunes o muy relacionados pueden ser de importancia clínica en algunas enfermedades. Por ejemplo, se considera que la lesión cardíaca que ocurre por la enfermedad cardíaca reumática puede estar relacionada con la reactividad cruzada de los antígenos de superficie de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A y varias porciones antigénicas del tejido del miocardio, el endocardio y las válvulas cardíacas, del sarcolema del miocardio y del músculo esquelético (véase cap. 12).^{136,150} En este modelo, los anticuerpos que se desarrollan durante una faringitis estreptocócica aguda pueden luego unirse a estos epítopos del tejido cardíaco con reactividad cruzada. Esta unión activa la cascada del complemento, lo que da como resultado un daño al músculo cardíaco y a los tejidos adyacentes mediado por el sistema inmunitario. Se considera que un mecanismo similar conduce a la glomerulonefritis posestreptocócica. Los anticuerpos producidos contra los estreptococos del grupo A "nefritogénicos" pueden reaccionar contra el tejido renal y causar daño glomerular; de hecho se describieron muchas similitudes entre los estreptococos del grupo A y el tejido renal humano.^{8,29} Además, los anticuerpos monoclonales producidos contra el tejido glomerular humano también reaccionan en forma cruzada con algunas proteínas M de los estreptococos del grupo A, lo cual sugiere que los mecanismos de patogenia de estas secuelas posestreptocócicas son similares.²¹

Los anticuerpos pertenecen a un grupo de moléculas de glucoproteínas relacionadas estructuralmente que se hallan en la sangre y en los líquidos extracelulares conocidas en su conjunto como **inmunoglobulinas (Ig)**. Estas moléculas son producidas por los linfocitos B que expresan Ig de una única especificidad unidas a su superficie. Cuando los receptores antigénicos de estas células encuentran el ligando apropiado, los linfocitos B proliferan y comienzan a secretar anticuerpos solubles contra el antígeno diana. Las células plasmáticas producen, en forma individual, grandes cantidades de moléculas únicas de anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión al antígeno. Además, algunos linfocitos B funcionan como células procesadoras de antígenos, que presentan luego los antígenos a los linfocitos T, estimulan así la producción adicional de anticuerpos e inducen la respuesta inmunitaria celular.³⁶ La génesis

de la respuesta inmunitaria humoral y celular y las interacciones que derivan en la producción de anticuerpos específicos están más allá del alcance de este libro y pueden encontrarse en otras fuentes abocadas a la inmunología y la inmunogenética.³⁶

Las inmunoglobulinas (Ig) pueden dividirse en cinco clases basándose en su estructura: **IgG, IgM, IgA, IgD e IgE** (fig. 3-1). Las moléculas de IgG tienen un peso molecular de alrededor de 150 kilodaltons (kDa), están formadas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas y tienen dos sitios para la unión del antígeno específico (sitios Fab). La región de la molécula que no se une al antígeno, compuesta por porciones de las dos cadenas pesadas, se denomina región Fc. Las moléculas de clase IgG son transportadas a través de la placenta en forma activa y proporcionan un mecanismo de inmunidad pasiva al recién nacido en un momento en el cual sus mecanismos inmunitarios están aún en desarrollo. Las IgG se dividen en cuatro subclases: **IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄**.³⁶ La IgG₁ es la principal inmunoglobulina del suero y puede fijar y, en consecuencia, activar complemento. IgG₂ e IgG₄ son las principales inmunoglobulinas que se producen en respuesta a los antígenos polisacáridos y, por consiguiente, a las bacterias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b. La IgG₃ se produce en mayor cantidad durante la respuesta inmunitaria secundaria y es muy importante en la neutralización viral. Las moléculas de IgM tienen un peso molecular aproximado de 950 kDa y están formadas por cinco monómeros, cada uno de los cuales se asemeja a una molécula única de IgG. Las cinco estructuras monoméricas se encuentran unidas unas con otras a través de puentes disulfuro en la región Fc de cada monómero, y por una molécula de 15 kDa llamada cadena J, necesaria para la agregación de la estructura pentamérica.¹³⁵ La IgM es la primera clase de inmunoglobulina producida por el feto y la primera en aparecer en la circulación luego de una inmunización o infección.¹⁵ Esta especie de anticuerpo también tiene la capacidad de fijar complemento. La aparición de IgM en suero es transitoria y su presencia suele indicar infección reciente. Sin embargo, las respuestas de IgM pueden observarse durante la reactivación de infecciones virales latentes y durante los fenómenos de reinfección con el mismo agente o con aquellos estrechamente relacionados.³⁵ Además, los anticuerpos IgM pueden persistir durante semanas y meses, según la capacidad inmunogénica del agente y la inmunocompetencia del huésped. A diferencia de la IgG, la IgM no atraviesa la placenta, de manera que la presencia de IgM contra un agente infeccioso (p. ej., rubéola) en la sangre fetal o de cordón indica una infección adquirida en forma congénita o perinatal. La IgG aparece en suero a las 4 a 6 semanas de la infección y suele persistir toda la vida. Los anticuerpos IgA se pueden encontrar como monómeros (160 kDa) o dímeros (400 kDa) y representan alrededor del 15% del total de las inmunoglobulinas séricas. La IgA es la principal clase de anticuerpos que se encuentra en las superficies mucosas y en las secreciones extracelulares (p. ej., calostro, saliva, lágrimas, mucina y secreciones de los aparatos intestinal, respiratorio y genital). La IgD presenta una estructura similar a la IgG, con un peso molecular de 175 kDa y comprende sólo alrededor del 0.2% del total de las inmunoglobulinas séricas. Esta clase de anticuerpos se encuentra principalmente en la superficie de los linfocitos B inmaduros y actúan como receptores celulares de antígenos. La IgE es una inmunoglobulina de 190 kDa y en el suero sólo se encuentran restos de ella. La IgE se une a los mastocitos y basófilos de manera no covalente a través de su región Fc. La unión del antígeno a la IgE activa la desgranulación de esas células y conduce a la síntesis de mediadores peptídicos de

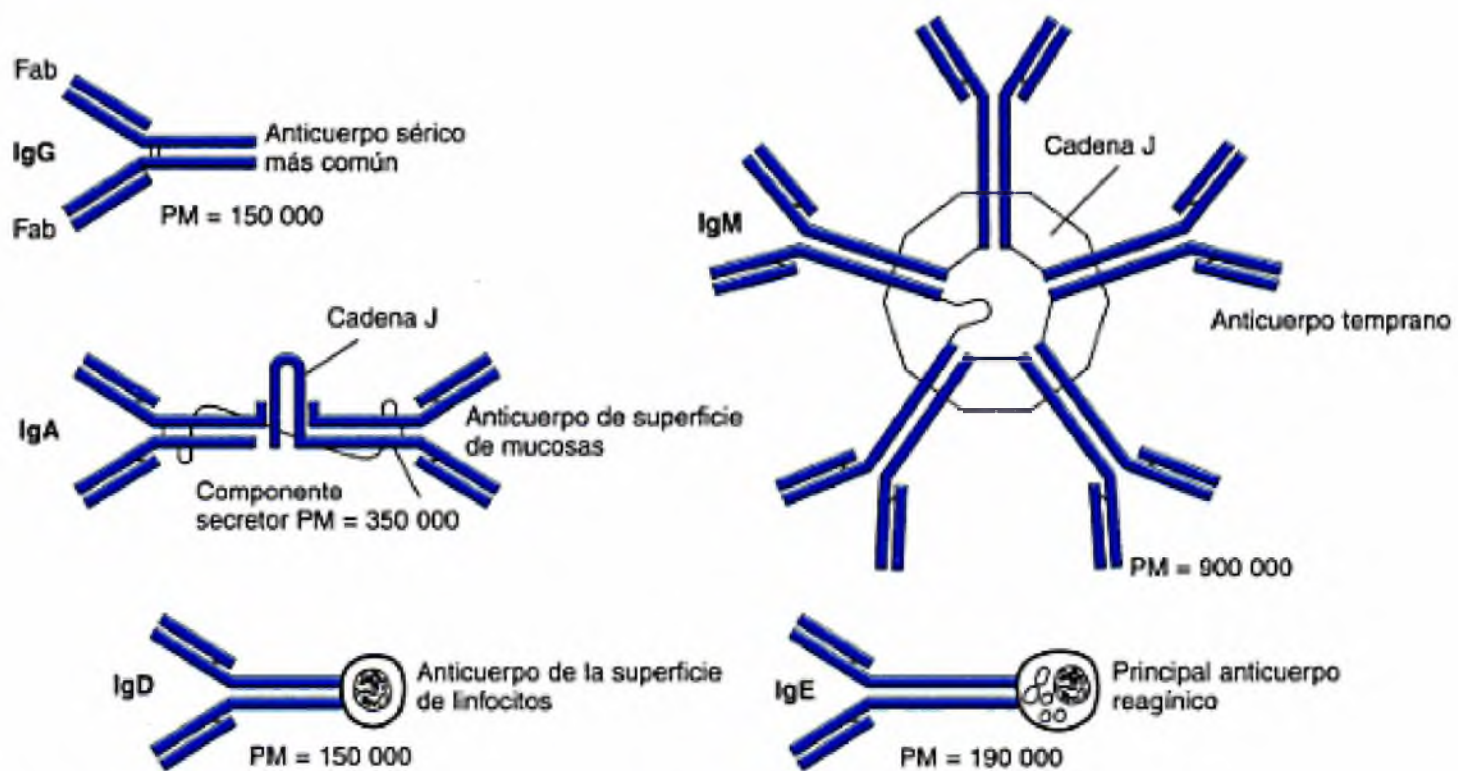


Figura 3-1 Clases de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos pertenecen a cinco clases estructurales y funcionales, denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La unidad estructural básica de los miembros de cada clase consiste en dos pares de polipéptidos (dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas) unidas por puentes disulfuro, y cada unidad presenta dos sitios de unión al antígeno. Algunos tipos de Ig tienen otros componentes estructurales (cadena J en IgM, pieza o componente secretor en IgA).

hipersensibilidad. En consecuencia, los anticuerpos IgE cumplen un papel principal en las reacciones alérgicas (p. ej., anafilaxia). Estos anticuerpos también pueden estar elevados en el suero de manera transitoria o persistente durante ciertas infecciones intestinales por helmintos.⁶⁵

En el laboratorio clínico, el diagnóstico serológico de las infecciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos se logra a través de la detección de anticuerpos específicos en las muestras de suero obtenidas de los pacientes. Como ya se mencionó, la IgM es la primera clase de anticuerpos que aparece luego de una infección y, en consecuencia, el diagnóstico serológico de una infección reciente puede lograrse mediante la realización de una prueba específica para IgM sobre una muestra única de suero obtenida durante la fase temprana del curso clínico de la enfermedad. El diagnóstico de las infecciones recientes también puede realizarse mediante la detección de anticuerpos de tipo IgG en muestras pareadas. La primera muestra debe obtenerse dentro de los 5 a 7 días desde la aparición de los síntomas, mientras que la segunda muestra se toma durante la convalecencia dentro de las 2 a 4 semanas posteriores. Un aumento del título de anticuerpos de cuatro veces o mayor entre la muestra del período agudo y la de convalecencia sugiere infección reciente o intercurrente. El título de anticuerpos se define como la inversa de la dilución del suero que aún da un resultado positivo que indica la presencia de anticuerpos. Por ejemplo, si la dilución reactiva más alta de una muestra obtenida durante la fase aguda es de 1 en 8 (título de 8) y la muestra de la convalecencia es reactiva hasta una dilución de 1 en 64 (título de 64), la segunda muestra presenta un título de más de cuatro veces el de la primera ($8 \times 4 = 32$, y $64 > 32$). Este aumento sugiere que la infección ocurrió en el pasado reciente. La utilización de un aumento del título de cuatro veces para señalar infección reciente se basa en la variación normal de la prueba y se manifiesta cuando se analizan las

muestras de la fase aguda y de la convalecencia con el mismo ensayo al mismo tiempo. Se pueden analizar muestras únicas de suero para determinar el estado inmunitario de un individuo frente a ciertos agentes (p. ej., rubéola, varicela zóster); en estos casos, la realización de la prueba puede incluir no solo los controles positivos y negativos sino, además, otros sueros de reactividad conocida que sirvan como calibradores para la interpretación de los resultados.

El diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas es distintivamente retrospectivo, dado que debe haber transcurrido algún tiempo entre la infección con el agente y la presencia de una respuesta inmunitaria detectable. Sin embargo, las pruebas serológicas han ampliado su alcance al incluir no sólo la detección de anticuerpos en suero, sino también la detección de antígenos en diversos tipos de muestra. En el resto del capítulo abordaremos en términos generales los métodos de detección serológica de anticuerpos y de antígenos. Las aplicaciones específicas de estos métodos se analizarán en los capítulos siguientes.

Anticuerpos monoclonales

Los antígenos constituyen un "mosaico" de determinantes antigénicos dada su naturaleza de macromoléculas con estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Una consecuencia natural de los principios y técnicas de la serología básica ha sido el intento de "purificar" antígenos para reducir la heterogeneidad de los anticuerpos que se desarrollan contra ellos. Rara vez se encuentran moléculas de antígenos con un único epítopo; por el contrario, pueden existir cientos o incluso miles de posibles determinantes antigénicos sobre la superficie de una célula o dentro de una mezcla de otras sustancias. Cuando estas mezclas de antígenos se inyectan en un animal se

estimula un número equivalente de clones de linfocitos. A pesar de que cada clon produce un anticuerpo específico, el resultado es una mezcla muy heterogénea de moléculas de anticuerpos, cuya especificidad y afinidad a menudo se desconocen y es difícil de controlar entre los diferentes lotes. Cuando estos **antisueros policlonales** se utilizan en los sistemas de ensayos inmunológicos concernientes a agentes infecciosos, se puede observar reactividad cruzada porque los determinantes antigénicos son compartidos por diferentes especies o las mutaciones pueden haber llevado a la evolución de epítopos lo suficientemente relacionados en especificidad para producir reacciones cruzadas detectables. Los intentos para producir anticuerpos puros a través de la absorción con antígenos que generan reacciones cruzadas o de preparar antisueros "clonales" a partir de antisueros "policlonales" por medio de técnicas como la cromatografía de afinidad en columna, han tenido éxito sólo parcial.

A medida que la ciencia de las pruebas serológicas fue evolucionando, se vislumbró que la disponibilidad de un anticuerpo con alto grado de homogeneidad molecular y con especificidad para un único epítopo antigénico sin reactividad cruzada resolvería muchos de los problemas encontrados en la utilización de los anticuerpos policlonales. Los **anticuerpos monoclonales**, el producto de un único clon de linfocitos, surgieron gradualmente como un subproducto de las investigaciones sobre fusión celular y de las técnicas de producción de hibridomas desarrolladas por Kohler y Milstein.⁷⁴ Gracias a su descubrimiento, hoy es posible aislar líneas clonadas de linfocitos individuales que producen moléculas de anticuerpos únicas y mono-específicas. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales hacen referencia a especies moleculares de inmunoglobulinas uniformes y homogéneas en lugar de a una serie heterogénea de inmunoglobulinas, como la que se produce durante la respuesta inmunitaria. La característica principal de esta técnica no se basa en que se puede realizar el aislamiento de una línea única de células que producen anticuerpos monoclonales, sino que estos linfocitos de ratón pueden "fusionarse" con células de mieloma de ratón para producir células híbridas con dos propiedades inherentes: 1) la capacidad de producir anticuerpos mono-específicos (adquirida de los linfocitos parentales) y 2) la capacidad de crecer en forma permanente en cultivo (la característica de "inmortalidad" adquirida de las células de mieloma). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales individuales pueden ahora producirse en forma continua y casi inagotable. La producción de anticuerpos monoclonales involucra los siete pasos que se enumeran más adelante. En el recuadro 3-1 se encuentra la información adicional y los detalles con relación a estos pasos:

1. Selección del antígeno (no es necesario que esté puro).
2. Inmunización del animal.
3. Fusión de los linfocitos esplénicos del animal con las células de mieloma.
4. Formación de los híbridos productores de anticuerpos.
5. Clonación de los hibridomas aislados descados.
6. Cribado de anticuerpos mediante la utilización de técnicas de selección.
7. Producción en masa de anticuerpos monoclonales.

Se han producido anticuerpos monoclonales contra muchos antígenos clínicamente relevantes, pero las aplicaciones actuales de estos anticuerpos son demasiado numerosas para detallarlas aquí.¹⁰¹ Los microbiólogos deben estar al día con las publicaciones actualizadas para determinar qué avances en esta

área pueden ser útiles para aplicar en sus laboratorios. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales para una amplia variedad de virus, bacterias, parásitos y hongos, que se utilizan hoy para preparar reactivos y conjugados que forman parte de muchos equipos de pruebas de inmunofluorescencia y enzimo-inmunoanálisis comerciales. Además de la detección directa de las estructuras antigénicas microbianas (p. ej., polisacáridos capsulares, antígenos de proteínas de membrana externa), los anticuerpos monoclonales han sido también desarrollados para la detección de los factores de virulencia producidos por los microorganismos, como las toxinas generadas por las especies de *Shigella*, las fimbrias que median la adherencia de *Escherichia coli* uropatógena, las enterotoxinas producidas por algunos serotipos de *E. coli* y las toxinas A y B producidas por *Clostridium difficile*, entre otros.^{31,34,39,28,121} Esta estrategia introduce una manera totalmente novedosa de mirar la relación entre los microorganismos y las enfermedades infecciosas. En lugar del enfoque convencional de la detección e identificación de los microorganismos, estos reactivos permiten la detección específica de factores de virulencia que pueden estar compartidos por varias especies bacterianas asociadas con un conjunto de síntomas determinados. Por ejemplo, puede ser más importante conocer que una toxina entérica es la causa de la diarrea hiperosmótica que recibir la información de que el paciente está infectado por especies de *Shigella* o por una cepa de *E. coli* enterotoxigénica.

Tipos de reacciones de antígeno-anticuerpo utilizadas en el diagnóstico serológico

Reacciones de precipitación

El tipo básico de reacción antígeno-anticuerpo es la reacción de precipitación. Esta reacción se presenta en los sistemas de ensayos que permiten que la libre difusión del antígeno y del anticuerpo enfrente a uno con el otro. En un punto crítico de interfaz, en que las concentraciones son óptimas, se forma un precipitado visible compuesto por antígenos y anticuerpos combinados. En un sistema de **difusión simple**, el anticuerpo se incorpora en un gel de agar dentro del cual se difunde el antígeno. En el método de inmunodifusión en tubo (Oudin), el antígeno se siembra sobre el agar que contiene el anticuerpo y se forman una o más líneas de precipitación en las zonas de equivalencia.¹⁰³ En la **inmunodifusión radial**, se incorpora el anticuerpo en un agar que forma una capa sobre un portaobjetos. Luego se coloca el material que contiene el antígeno dentro de un pocillo circular cortado en el agar. Durante la incubación el antígeno se difunde dentro del agar y forma un anillo de precipitación. El cuadrado del radio del anillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en el material de estudio. Utilizando una dilución seriada del antisuero es posible determinar de manera semicuantitativa las concentraciones de antígeno comparando los diámetros de la reacción de precipitación producidos por una solución de antígeno de concentración conocida con el diámetro del anillo producido por la solución en estudio.^{92,107} El procedimiento de inmunodifusión convencional utilizado con mayor frecuencia es la **doble difusión**. En esta técnica el antígeno y el anticuerpo se colocan en pocillos adyacentes y se difunden uno hacia el otro. Luego, se forma una línea de precipitación entre los pocillos cuando se alcanzan las concentraciones de equivalencia. La doble difusión puede requerir una incubación de hasta 48 horas antes de obtener un resultado interpretable. La **contraelectroforesis** (CIE) utiliza la técnica de la doble difusión, pero apli-

Recuadro 3-1 Procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales**1. Selección del antígeno**

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse contra cualquier sustancia reconocida como un antígeno por el sistema inmunitario del animal que será inyectado. Es ideal la utilización de un antígeno puro. En realidad, ciertos antígenos, como los fármacos purificados químicamente utilizados para los ensayos (p. ej., digoxina), pueden ser homogéneos. De todas maneras, nunca se puede garantizar que un determinante antigénico esté formado por un único epítipo. El hecho de que se puedan utilizar antígenos impuros en la producción de anticuerpos monoclonales constituye una importante ventaja sobre los métodos convencionales para la producción de anticuerpos policlonales.

2. Inmunización de animales

Los principales objetivos de los procedimientos de inmunización son estimular el sistema inmunitario del animal para el rápido reconocimiento de todos los antígenos inyectados, lograr la máxima estimulación de los clones de linfocitos B y hacer que las células del bazo se multipliquen a gran velocidad. La cepa de ratones BALB/cj es la más utilizada en la producción de anticuerpos monoclonales. El antígeno se inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal, con la inyección simultánea de adyuvante de Freund. Las inyecciones se repiten a intervalos semanales y se da una inyección final de refuerzo por vía intravenosa aproximadamente 3 días antes de la obtención de las células del bazo. En el final del esquema de inyecciones, el animal es sacrificado y se le extrae el bazo en forma aséptica.

3. Fusión de linfocitos esplénicos y células de mieloma

Se coloca el bazo del animal en un medio de cultivo con antibióticos. Se disgrega el tejido esplénico para liberar las células y formar una suspensión. Este material se pasa a través de una malla para obtener células aisladas. Se agrega Ficoll® y la suspensión se centrifuga para eliminar los eritrocitos. Se le agrega polietilenglicol (PEG) a la suspensión para reducir la tensión superficial célula-célula; esto posibilita que las células se encuentren muy próximas entre sí y que sus membranas se fusionen. Se adiciona dimetilsulfóxido (DMSO) a la mezcla de fusión para maximizar, más aún, el contacto entre las células. Por último, las células se acomodan por centrifugación suave durante 5 minutos en pequeñas partículas. Así, al final de estos pasos, la preparación está formada por células de mieloma no fusionadas, linfocitos no fusionados y algunas células híbridas fusionadas linfocito-células de mieloma (debe tenerse en cuenta que los linfocitos esplénicos y las células de mieloma se fusionan con una frecuencia de sólo 1 por cada 10^5 o 10^6 células).

4. Selección de los híbridos linfocitos-células de mieloma

Las células de mieloma no fusionadas sobrepasan rápidamente en su crecimiento a los híbridos y deben ser eliminadas de alguna manera. Las células de mieloma utilizadas para la fusión crecen en presencia de 8-azoguanina, un fármaco que produce la inhibición permanente de la producción de hipoxantina fosforibosiltransferasa (HRPT), una enzima necesaria para el crecimiento continuo. Si las células HRPT negativas son suspendidas en un medio con hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sólo las células del hibridoma podrán crecer con éxito. Estas células heredan HRPT de los linfocitos esplénicos con los cuales se han fusionado y pueden sobrevivir. La aminopterina presente en el medio selectivo HAT mata las células de mieloma no fusionadas, incapaces de sintetizar DNA como consecuencia de la deficiencia en la producción de HRPT. También se debe recordar que los linfocitos esplénicos no fusionados no sobreviven más de algunos días en medio de cultivo; por consiguiente, en el medio HAT sólo sobrevive el híbrido fusionado linfocito-célula de mieloma.

5. Clonación de células del hibridoma

Las células híbridas individuales que producen el anticuerpo deseado se deben aislar y crecen como un clon. Para este propósito, se pueden utilizar dos técnicas: 1) dilución límite y 2) crecimiento en un medio con gel de agar. En la técnica de dilución límite o doble dilución, la suspensión de híbridos (luego de máximo crecimiento) se diluye y se distribuye dentro de una serie de pocillos estériles de una microplaca. Las diluciones se calculan de forma tal que cada pocillo contenga un promedio de sólo una célula que pueda entonces producir un único clon productor de anticuerpos. En el método alternativo, utilizando gel de agarosa suplementado con suero, aminoácidos y antibióticos, las células híbridas en división forman pequeños agrupamientos de forma esférica. Estas esferas pueden tomarse con una pipeta Pasteur y transferirse a microtubos para su posterior cultivo y finalmente determinar cuál de los anticuerpos deseados se está produciendo.

6. Cribado de los anticuerpos deseados

En el paso de fusión del procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales se pueden haber fusionado muchos otros linfocitos, además de los que producen los anticuerpos monoclonales deseados. De hecho, menos del 5% de las células híbridas seleccionadas producen realmente los anticuerpos específicos deseados. Por consiguiente, se requieren análisis que determinen si el anticuerpo deseado está siendo producido por las líneas celulares seleccionadas. Para esta fase del procedimiento se puede utilizar radioinmunoanálisis, inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), técnicas de precipitación y técnicas de transferencia.

7. Producción en masa de anticuerpos monoclonales

Una vez seleccionado el clon de células híbridas deseado, el próximo paso es la producción de grandes cantidades del anticuerpo monoclonal. Para el crecimiento del clon seleccionado de células híbridas puede utilizarse la cavidad peritoneal de ratones, preferentemente de la misma cepa utilizada para el paso inicial de inmunización. Primero, se inyecta en la cavidad peritoneal un irritante orgánico, por ejemplo pristano, para producir una peritonitis química. Luego, se inyectan las células híbridas de la línea seleccionada dentro de la cavidad peritoneal. En el transcurso de los días se desarrolla un tumor conocido como hibridoma. Este tumor produce grandes cantidades de anticuerpos monoclonales que pueden obtenerse por aspiración del líquido ascítico a partir de la cavidad peritoneal del ratón. Un ratón que tiene el tumor puede sobrevivir entre 4 y 6 semanas, durante las cuales se pueden recolectar grandes cantidades de anticuerpos. Los hibridomas también pueden crecer en cultivo de tejido a partir de los cuales se producen anticuerpos altamente purificados, sin la potencial contaminación del suero, la interferencia no específica de proteínas de la ascitis o la reactividad cruzada de anticuerpos de histocompatibilidad derivados de los tejidos del ratón.

ca una corriente eléctrica que pasa a través de la matriz de soporte de agarosa para acelerar la migración del antígeno y del anticuerpo uno hacia el otro. Estos métodos pueden utilizarse tanto para la detección de anticuerpos como de antígenos presentes en los líquidos corporales.

Una precaución para tener en cuenta durante la realización de los procedimientos de precipitación es reconocer la posibilidad de reacciones falsas negativas debidas a los fenómenos de prozona o postzona. Si el anticuerpo se encuentra en exceso (es decir, en una concentración demasiado elevada en relación con el antígeno disponible) tiene lugar una reacción falsa negativa (prozona) porque no se establecen los entramados moleculares que forman el precipitado visible. Por el contrario, las reacciones de postzona ocurren cuando el antígeno se encuentra en exceso y se saturan los sitios de unión del anticuerpo con antígeno, de manera que no se forma el entramado molecular característico de la reacción de precipitación. Cuando se prevén altas concentraciones de antígeno o anticuerpo, se pueden evitar los falsos negativos debidos a los fenómenos de prozona y postzona, respectivamente, realizando pruebas repetidas con diluciones seriadas de las muestras. La zona de equivalencia se define como el rango de la relación de reactivos que da como resultado la máxima precipitación de los antígenos y los anticuerpos.

Todos los métodos descritos anteriormente fueron utilizados para la detección de antígenos bacterianos en líquidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo (LCR); sin embargo, la CIE fue el único método aceptado en la práctica clínica debido a la relativa rapidez de la prueba (30-60 minutos). No obstante, aun este método ha sido reemplazado por los procedimientos de prueba rápida de aglutinación y de coaglutinación (véase más adelante). Los métodos de doble difusión se utilizan todavía como ayuda para el diagnóstico de infecciones fúngicas sistémicas, como aspergilosis, blastomycosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis (p. ej., pruebas de inmunodifusión para hongos).^{57,61} En la inmunodifusión para hongos, se hacen reaccionar los antígenos purificados a partir de los patógenos fúngicos sistémicos con los sueros del paciente y de los controles que contienen anticuerpos en una prueba de doble difusión. El desarrollo de líneas de precipitación de identidad con los sueros de los controles positivos y con el suero del paciente indican la presencia de anticuerpos antifúngicos. La presencia o la ausencia de ciertas bandas de precipitación (p. ej., bandas H y M observadas en la infección por *Histoplasma capsulatum*, bandas antiantígeno A en la infección por *Blastomyces dermatitidis*) pueden tener significado diagnóstico y pronóstico para el tratamiento.^{57,61,62} Si bien estas pruebas tienen alta especificidad, presentan una sensibilidad inadecuada y su utilización ha sido eclipsada por nuevos métodos serológicos (p. ej., detección de antígenos, radioinmunoanálisis, aglutinación de partículas de látex, enzimoimmunoanálisis) y moleculares (amplificación de genes).^{23,45,78,95,141,142}

La inmunodifusión también es la base de la prueba de exo-antígenos para la identificación de patógenos fúngicos sistémicos. En este método, se aplica una mezcla de agua y Merthiolate® durante algunas horas sobre el agar en pico de flauta. El extracto acuoso obtenido se concentra y se hace reaccionar en una prueba de doble difusión con antisueros contra *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* y especies de *Aspergillus* junto con los controles de antígenos adecuados. Tras 24 horas de incubación se examina la placa de inmunodifusión para detectar las líneas de identidad entre el extracto micelial, los antisueros fúngicos y los antígenos control para cada microorganismo.⁷⁰ A pesar de que este método aún se utiliza para la identificación de patógenos fúngicos sistémicos, la disponibili-

dad de sondas de ácidos nucleicos para estos agentes proporciona ciertas ventajas, como la utilización de colonias más nuevas y menos maduras, resultados con un valor de corte más claros, un tiempo total de respuesta del laboratorio más rápido y una identificación específica.^{104,105,130}

Fijación del complemento e inhibición de la hemaglutinación

Durante las últimas tres décadas, los métodos serológicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas han cambiado en forma significativa. Los métodos más antiguos incluyen la **fijación del complemento (FC)** y la **inhibición de la hemaglutinación (IHA)**.^{120,136} Ambas pueden utilizarse para la identificación de antígenos virales (en general, para la identificación de virus en cultivos de tejidos) o para detectar anticuerpos en el suero de los pacientes y en otros tipos de muestras (p. ej., LCR).

El principio de la prueba de FC es bastante sencillo (fig. 3-2). Para detectar los anticuerpos en el suero del paciente, primero se calientan las muestras a 56 °C durante 30 minutos con el fin de inactivar el complemento endógeno y se coloca una alícuota en un pocillo de una microplaca. Luego, se le agrega al pocillo una cantidad titulada de complemento y de antígeno (específico para el anticuerpos por detectar), se mezcla y incuba durante toda la noche. Si el anticuerpo presente en la muestra de suero del paciente "reconoce" al antígeno, las dos moléculas se combinan y el complemento se "fija" a este complejo antígeno-anticuerpo. Si no se encuentran anticuerpos específicos contra ese antígeno, no se forman los inmunocomplejos y el complemento permanece libre o "no fijado". En un paso próximo se le agregan al pocillo eritrocitos (por lo general, ovinos) que se encuentran "sensibilizados" con anticuerpos anti-eritrocíticos. Si durante el primer paso los inmunocomplejos unieron complemento, éste no se encuentra disponible para unirse a los eritrocitos recubiertos con anticuerpos y, en consecuencia, los eritrocitos sensibilizados no pueden ser lisados, sedimentan en el fondo y forman un "botón". Por otro lado, si no se formaron inmunocomplejos durante el primer paso, el complemento permanece libre para unirse a los eritrocitos recubiertos con anticuerpos, lo que da como resultado la lisis de los eritrocitos. La lisis de las células produce dentro del pocillo un cambio en el color de los reactivos a un rojizo difuso. A pesar de que la FC es aún valiosa para el diagnóstico de ciertas infecciones (por virus influenza y parainfluenza, meningitis por *C. immitis*), el procedimiento ha sido suplantado en gran medida por los enzimoimmunoanálisis y por la inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos.^{69,143,151} La FC también puede utilizarse para la identificación de los virus que crecen en cultivo; sin embargo, los inmunoanálisis de fluorescencia directa o indirecta son más rápidos y han reemplazado esencialmente a la FC para este propósito. El procedimiento de la FC se describe en el protocolo 3-1.

Los eritrocitos también han sido utilizados como transportadores de antígenos para la detección de anticuerpos virales. Ciertos virus (p. ej., rubéola, virus influenza y parainfluenza, virus sincitial respiratorio, del sarampión, de las paperas) tienen antígenos de superficie que son hemaglutininas; es decir, se unen a los hematíes y forman entrecruzamientos que dan como resultado una aglutinación macroscópica. Los anticuerpos dirigidos contra virus específicos pueden inhibir la aglutinación macroscópica de los eritrocitos "sensibilizados" con antígenos virales. Esta reacción es la base del ensayo de la IHA (fig. 3-3).¹²⁹ Las infecciones causadas por los virus hemaglutinantes pueden ser diagnosticarse de manera retrospectiva

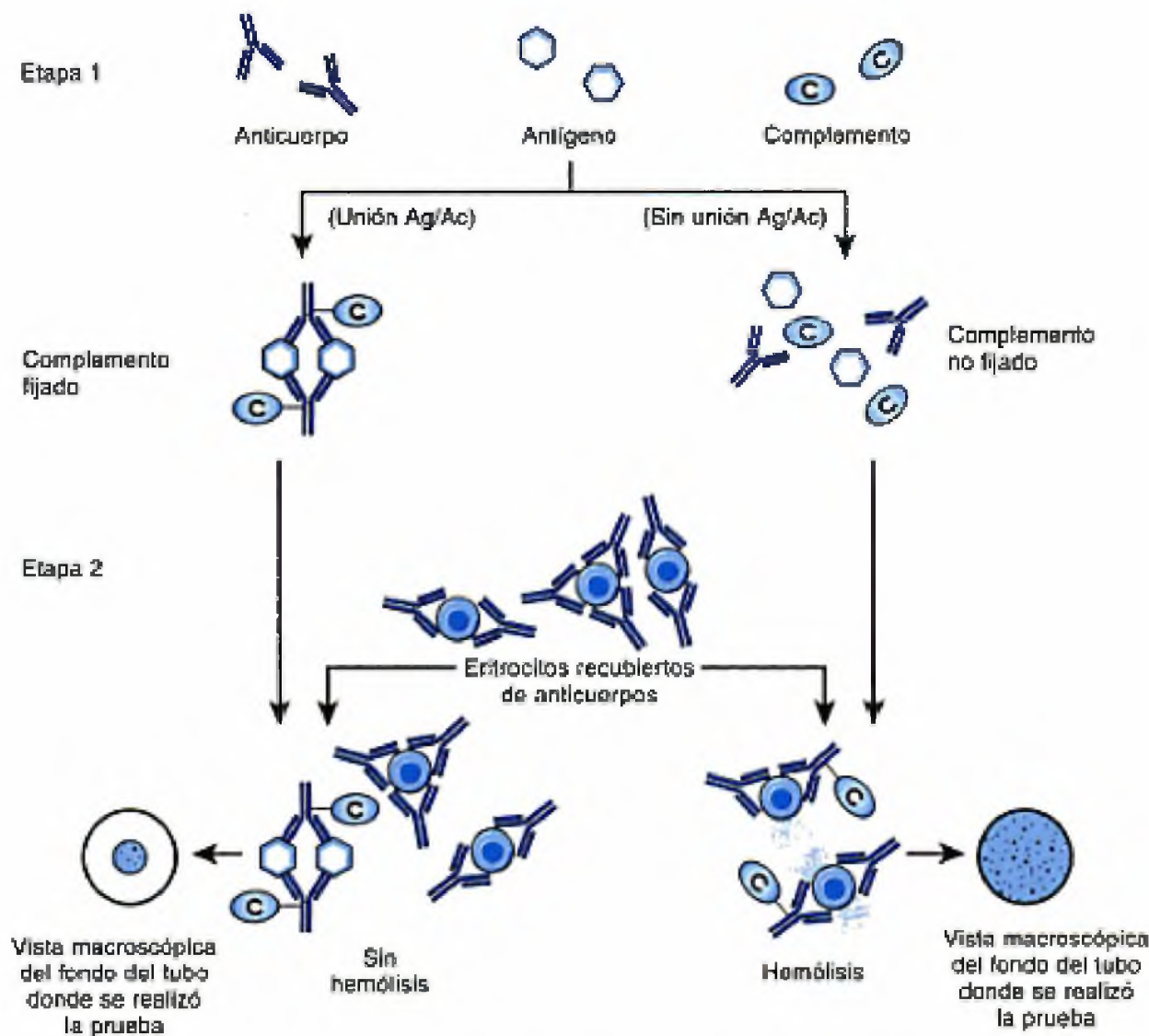


Figura 3-2 Prueba de fijación del complemento. En la etapa uno se mezclan antígeno, anticuerpo y complemento. Si el antígeno y el anticuerpo se unen, el complemento se fija y será incapaz de actuar sobre los eritrocitos recubiertos de anticuerpos adicionales en la etapa dos. La reacción final aparece como la ausencia de hemólisis. Si el antígeno y el anticuerpo no se unen en la etapa uno, el complemento no se fija y permanece libre para actuar sobre los eritrocitos recubiertos de anticuerpos adicionales en la etapa dos. El resultado final aparece como la hemólisis de los eritrocitos. Las células no hemolizadas sedimentan formando un botón en el centro del fondo del tubo, mientras que las células hemolizadas producen una coloración rojiza del líquido con muy pocas o ninguna célula sedimentada en el centro del fondo del tubo. Ag/Ac: antígeno-anticuerpo. Redibujado de Leland DS. Clinical Virology. Filadelfia: Saunders, 1996.

mediante la determinación de un aumento de cuatro veces o más del título de anticuerpos que inhibe la capacidad del virus de aglutinar a los eritrocitos. A pesar de que la detección de anticuerpos antirrubéola y otros agentes virales se realiza ahora por medio de aglutinación de partículas de látex, ensayo inmunoenzimático o inmunofluorescencia indirecta en la mayoría de los hospitales, la IHA aún se utiliza en algunos laboratorios de salud pública y de referencia para vigilancia y diagnóstico (p. ej., serología para *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, alfavirus).¹²⁴ El procedimiento de la IHA se describe en el protocolo 3-2.

Reacciones de aglutinación

Las reacciones de aglutinación se pueden definir como la agregación inmunológica específica de partículas (eritrocitos, partículas de látex, estafilococos) recubiertas con antígenos o con anticuerpos que pueden utilizarse para detectar anticuerpos o antígenos solubles, respectivamente. Los antígenos o anticuerpos están unidos a estas partículas por fuerzas eléctricas intramoleculares o por medio de uniones covalentes. La aglutinación de estas partículas portadoras opera como un indicador de las interacciones antígeno-anticuerpo que tienen lugar

sobre la superficie de estos portadores. En un principio se utilizaban los eritrocitos como portadores. Estas células tenían que ser tratadas con ácido tánico u otros agentes para estabilizar sus membranas y luego formalizadas para aumentar la absorción no específica de péptidos, proteínas y polisacáridos. Por ejemplo, en la prueba de hemaglutinación pasiva (PHA) para la detección de anticuerpos de rubéola, los eritrocitos son tratados con formaldehído-piruvato aldehído para que el virus de la rubéola pueda ser adsorbido sobre la superficie de la membrana. Para algunas proteínas, se utilizaban agentes de acoplamiento químico con el fin de unir en forma covalente la proteína y los eritrocitos; estos agentes funcionaban para algunas proteínas pero no para otras. En 1955 se “descubrió” que las esferas de látex de poliestireno de tamaño uniforme (0,81 nm de diámetro) eran portadoras ideales para las moléculas de anticuerpos, dado que las superficies hidrófobas de las esferas unían en forma específica e irreversible la región Fc de las moléculas de IgG. Los antígenos, como los polisacáridos complejos y las proteínas, podían también unirse a las esferas de látex a través de los grupos sulfato que están presentes en su superficie como resultado del proceso de fabricación. En la actualidad, las esferas de látex son las portadoras más utiliza-

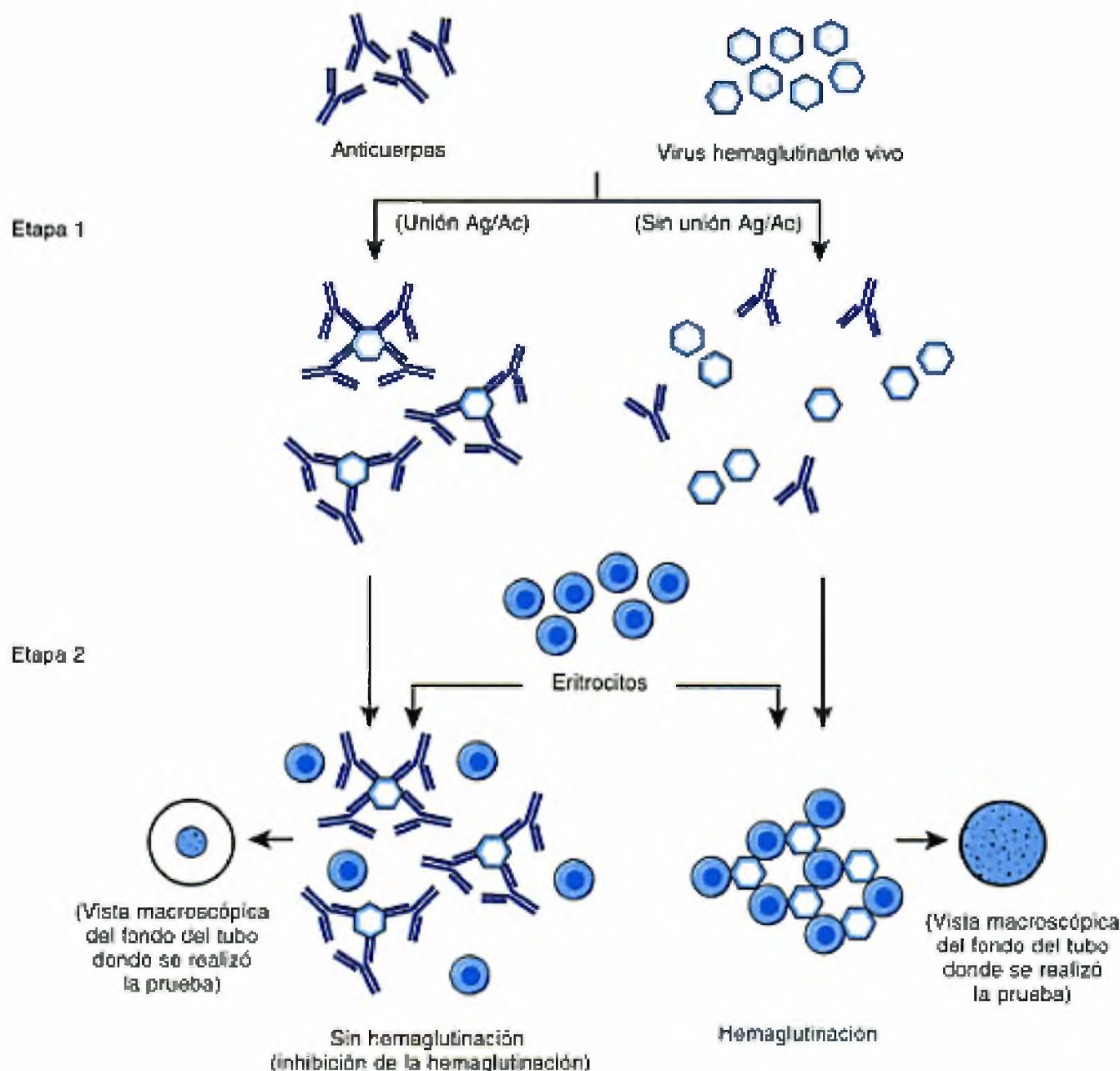


Figura 3-3 La prueba de inhibición de la hemaglutinación se realiza en dos etapas. En la etapa uno, se mezclan virus hemaglutinantes y anticuerpos. En la etapa dos, se agregan los eritrocitos. Si en la etapa uno los anticuerpos se unen a los virus, éstos son inhibidos y no pueden producir la hemaglutinación de los eritrocitos. Si en la etapa uno los anticuerpos no se unen a los virus, éstos permanecen activos y aglutinan los eritrocitos en la etapa dos. La hemaglutinación aparece como una capa o "cubierta" de pequeños agregados en el fondo del tubo. Las células no aglutinadas sedimentan formando un botón en el centro del fondo del tubo. Redibujado de Letland DS. Clinical Virology. Filadelfia: Saunders, 1996.

das en los ensayos de aglutinación. Las pruebas de aglutinación de partículas de látex suelen realizarse sobre portaobjetos o tarjetas de cartón recubiertas con plástico. Las esferas de látex recubiertas con anticuerpos específicos son la base de las pruebas de aglutinación de partículas de látex para el antígeno de criptococos (CALAS[®], Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH; Crypto LA[®] International Biological Labs, Cranbury, NJ; Pastorex Cryptococcus[®], Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francia), los ensayos de aglutinación de partículas para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopado faríngeo, productos comerciales para el agrupamiento serológico de los estreptococos β -hemolíticos (p. ej., Streptex[®], Abbott-Murex, Abbott Park, IL) y equipos utilizados para la detección de antígenos capsulares de bacterias en muestras de LCR y suero.^{22,23,26,44,62,111,125} Las partículas de látex también pueden conjugarse con antígenos y, por lo tanto, permiten utilizar su aglutinación para la detección cualitativa de anticuerpos. Se comercializan equipos de aglutinación de partícu-

las de látex para la detección de anticuerpos contra diversos agentes, entre otros rubéola, citomegalovirus y virus de la varicela zóster.^{6,41,50,61,94,96,110,127,128} Estas pruebas son convenientes, rápidas, fáciles de realizar, detectan anticuerpos de tipos IgG e IgM y son bastante comparables en sensibilidad y especificidad con otros métodos de detección de anticuerpos. Las pruebas de aglutinación de partículas de látex se utilizan principalmente para determinar el estado inmunitario, aunque pueden tener menor validez en las muestras de suero que presentan títulos cercanos al valor de corte que suele separar el estado "inmune" del "no inmune".^{124,127}

Los estafilococos también pueden utilizarse como agentes portadores. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (p. ej., ATCC 12498) tienen alto contenido de proteína A en la pared celular. Esta proteína puede unir en forma específica la región Fc de la IgG y dejar a las regiones Fab disponibles para unir al antígeno.⁴⁷ Debido a la naturaleza de la proteína A y a su interacción con las moléculas de IgG como un portador funcional, la coa-

glutinación de estafilococos se utiliza sobre todo para la detección de antígenos y es el método empleado en algunos equipos comerciales para el agrupamiento serológico de los estreptococos β -hemolíticos.⁵³ Después de realizar la extracción de antígenos desde los organismos por métodos químicos o físicos, se mezclan los estafilococos recubiertos con anticuerpos con dicho extracto. La aglutinación visible de los estafilococos indica una prueba positiva.⁵⁵ Las pruebas comerciales de coaglutinación se encuentran también disponibles para la confirmación de los cultivos de *Neisseria gonorrhoeae* (Phadebact GC Monoclonal Antibody test[®], Karo Bio Diagnostics AB, Huddinge, Suecia; Gonogen I[®], New Horizons Diagnostics, Columbia, MD).⁵⁴

Las reacciones de aglutinación son más sensibles que las de precipitación debido a la naturaleza directa de la interacción antígeno-transportador-anticuerpo. Dadas la sensibilidad y la capacidad de producirse en diluciones muy elevadas, permiten la realización de mediciones semicuantitativas de antígenos y anticuerpos. En el caso de los anticuerpos, los resultados semicuantitativos se pueden obtener determinando la mayor dilución del suero que produce una reacción de aglutinación visible. Los cambios en los títulos de aglutinación en las muestras obtenidas durante la fase aguda y de convalecencia pueden proporcionar un diagnóstico serológico retrospectivo de manera similar a los métodos de FC o IHA.^{54,56} Para los ensayos de determinación semicuantitativa de la concentración de antígenos, se puede comparar el título final en una muestra de un paciente (p. ej., LCR) con el título de aglutinación final obtenido para diluciones seriadas de una preparación de un antígeno de concentración conocida. Los títulos de muestras seriadas pueden tener una influencia directa sobre la atención del paciente y su manejo clínico. Por ejemplo, en la meningitis por *Cryptococcus neoformans*, los títulos decrecientes de antígenos polisacáridos capsulares en LCR están directamente relacionados con la respuesta terapéutica.⁵² Por el contrario, el aumento o la persistencia elevada de títulos de antígenos son un marcador de peor pronóstico que indica infección persistente, recurrente o recaída.

Otro tipo de reacción de aglutinación es la base de una técnica denominada **microscopía electrónica inmunitaria (MEI)**, que se utiliza para detectar en forma visual agentes virales que no se pueden cultivar, como el virus de la hepatitis A y algunos de los nuevos agentes de hepatitis en muestras de filtrados de heces.^{49,60} Se utilizan anticuerpos antivirales específicos para producir la agregación de los virus; estos agregados se observan por medio del microscopio electrónico más fácilmente que los viriones dispersos individuales. La agregación inmunoespecífica de las partículas virales aumenta la detección por microscopía electrónica de los agentes virales 100 a 1 000 veces y permite en consecuencia la detección de títulos tan bajos como 10^3 a 10^6 partículas/mL de filtrado de heces.

Métodos de inmunoanálisis en fase sólida

Enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos

El "inmunoanálisis en fase sólida" hace referencia a la unión del antígeno o del anticuerpo a una variedad de materiales sólidos, como pocillos de microtubos de poliestireno o esferas de plástico. Por ejemplo, los inmunoanálisis en fase sólida diseñados para la detección de anticuerpos en una muestra desconocida tienen los antígenos unidos a la fase sólida (fig. 3-4). La reacción inicial ocurre cuando la muestra que se va a estudiar

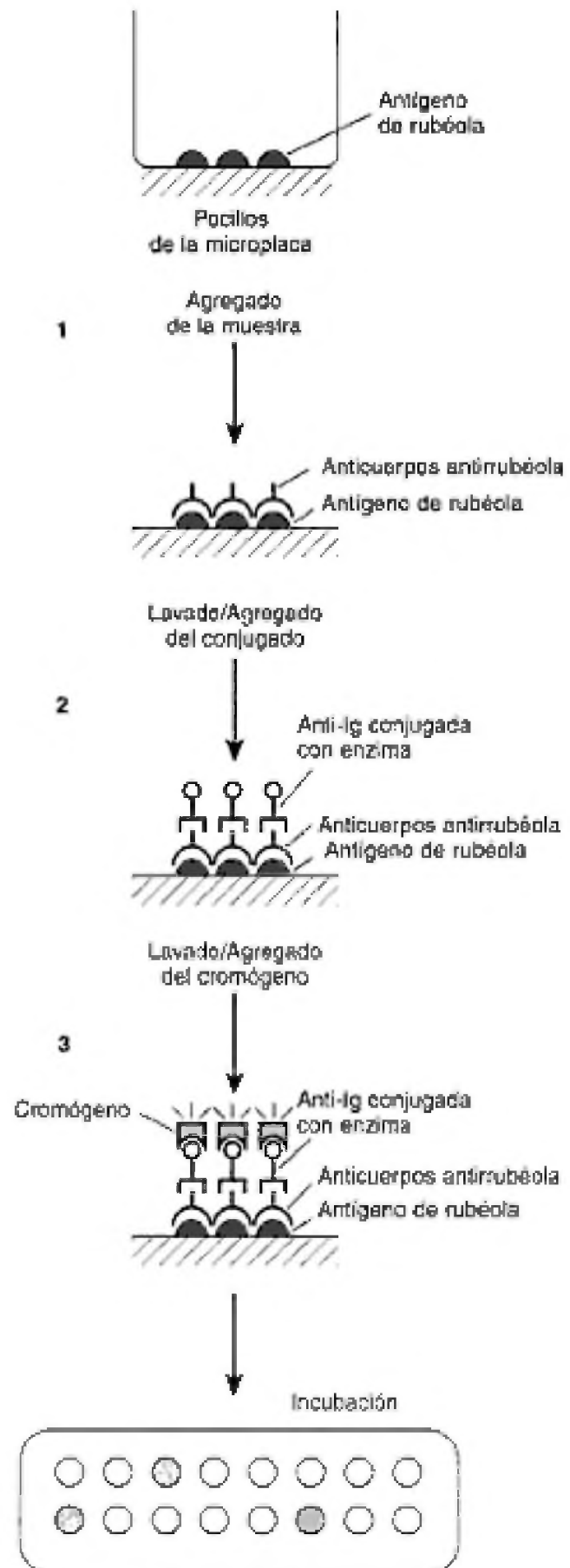


Figura 3-4 Principios del enzimoimmunoanálisis (EIA). Esta figura muestra el procedimiento de un EIA para la detección de anticuerpos contra el virus de la rubéola. Los antígenos purificados del virus de rubéola se absorben a los pocillos de una microplaca. En el paso 1, se agrega el suero y se incuba. Si están presentes los anticuerpos antirrubéola se unen al antígeno. Luego del paso de lavado, se adicionan inmunoglobulinas antihumanas conjugadas con una enzima (paso 2). Después de un segundo lavado, se adiciona un sustrato enzimático cromogénico. Se realiza la lectura espectrofotométrica de la absorbancia de cada pocillo individual y se interpretan los resultados de la prueba por comparación con los controles positivos y negativos utilizados en el mismo ensayo.

se incubaba en contacto con la fase sólida durante un tiempo determinado. Los anticuerpos específicos se unen al antígeno inmovilizado. Luego, la mezcla de reacción se lava para eliminar cualquier material extraño, se agrega una antiglobulina conjugada con una "marca" y se incubaba en el tubo de reacción. En los procedimientos de **radioinmunoanálisis (RIA)**, la marca es un isótopo radiactivo (p. ej., ^{32}P o ^{125}I), mientras que en los métodos de **enzaimmunoanálisis (EIA)**, la marca es una enzima. En los sistemas de EIA que se comercializan para la detección de anticuerpos humanos, el conjugado suele ser una inmunoglobulina antihumana de cabra marcada con fosfatasa alcalina o con peroxidasa del rábano picante. Si se ha producido la reacción inicial antígeno-anticuerpo, la antiglobulina (con su marca radiactiva o enzimática) se une al anticuerpo. El paso final de estos ensayos es la detección de la actividad radiactiva o enzimática. Esto se realiza, respectivamente, con un contador de centelleo que detecta emisiones β o γ y por medio del agregado de un sustrato enzimático, que suele producir un producto final coloreado que se detecta en forma visual o por espectrofotometría. Una reacción positiva indica que el anticuerpo estaba presente en la muestra original y la intensidad de la reacción es proporcional a la concentración del anticuerpo de esa muestra. En la figura 3-4 se observa un diagrama de un EIA para la detección de anticuerpos antirrubéola.

Los anticuerpos conjugados utilizados en las técnicas de EIA no actúan sólo por interacciones antígeno-anticuerpo, como se demuestra con el uso de avidina, estreptavidina y biotina. La avidina y la estreptavidina son glucoproteínas purificadas a partir de clara de huevo y de *Streptomyces avidinii*, respectivamente. La biotina es un componente del complejo B (vitamina B7). Las moléculas de avidina pueden unir estequiométricamente los residuos de biotina, de manera similar a una interacción anticuerpo-antígeno. En los EIA, se puede utilizar como conjugado una globulina antihumana producida en cabra que tiene unida moléculas de biotina para detectar anticuerpos humanos que se encuentran unidos a un antígeno fijado a la fase sólida. Luego de un paso de lavado, se agrega la avidina (o estreptavidina) marcada con la enzima. Después de la incubación y el lavado, el agregado del sustrato enzimático genera un producto final coloreado. De manera alternativa, la antiglobulina biotinilada puede detectarse por medio del agregado de avidina sin marcar y luego de un paso de lavado, por el agregado de la enzima biotinilada. Ésta se une a la avidina y después de un lavado, el agregado del sustrato enzimático genera un producto final coloreado.

La mayoría de los RIA utilizan un sistema de ensayo tipo competitivo. En la prueba cuantitativa para anticuerpos, el sistema en fase sólida se estandariza primero utilizando un antígeno no marcado unido y una concentración estándar de anticuerpo marcado con un radiactivo. La muestra desconocida que contiene el anticuerpo (no marcado) que se quiere detectar se agrega al sistema de ensayo. La cantidad de anticuerpo marcado que se desplaza de su unión al antígeno es proporcional a la cantidad de anticuerpo no marcado presente en la muestra desconocida. Las concentraciones de anticuerpo en las muestras desconocidas se establecen por comparación con una curva estándar que se efectúa determinando el grado de inhibición de la unión del anticuerpo marcado mezclado con diluciones de anticuerpos cuantificados no marcados. Cuando se detectan antígenos por este método se aplica una estrategia similar, excepto que se utiliza un antígeno marcado para cuantificar el antígeno libre en la muestra. El RIA ha alcanzado amplio uso en las áreas de química clínica, endocrinología clínica y toxi-

cología, pero no se le ha encontrado una aplicación significativa en el área de la microbiología clínica. A pesar de que tiene una sensibilidad y una especificidad excepcionales, el desarrollo de las técnicas de RIA en los laboratorios de los servicios de patología clínica moderna se encuentra limitado debido al problema inherente a la eliminación de los desechos radiactivos y a la inestabilidad de ciertos radionúclidos. En los últimos 10 años, los equipos comerciales de pruebas de EIA para la detección de anticuerpos en suero se han vuelto más accesibles y, en muchos casos, han suplantado a procedimientos más laboriosos y prolongados, como la FC y la IHA para la serología viral.^{5,12,30,41,281,32,33,34,36,319} Los métodos de EIA son los diseños recomendados para las pruebas serológicas más nuevas, como las pruebas de cribado para la detección de anticuerpos anti-HIV-1 y anti-HIV-2.⁴⁹

Los procedimientos serológicos para la detección de anticuerpos basados en la tecnología de EIA también han sido modificados con el objeto de incrementar su utilidad como herramientas de diagnóstico específico o métodos de pruebas confirmatorias. Un ejemplo de este tipo de modificación es el procedimiento de transferencia de Western (*Western blot*) para anticuerpos anti-HIV-1 (fig. 3-5).^{49,317} En el procedimiento original de transferencia Western para HIV-1, se purifica parcialmente HIV-1 a partir de un cultivo de tejidos y se solubiliza por medio de un tratamiento con detergente. Las proteínas del HIV-1 se separan según su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en que las proteínas de bajo peso molecular migran más lejos que aquellas de alto peso molecular y que las glucoproteínas. Se coloca luego una membrana de nitrocelulosa sobre el gel y las proteínas del HIV-1 son transferidas por electroforesis sobre esa membrana. Finalizada la transferencia, la membrana se corta en tiras que se utilizan como la "fase sólida" del ensayo. Un suero que da reactivo de manera repetida en la prueba de cribado de EIA para HIV-1 se incubaba con la tira de nitrocelulosa. Si los anticuerpos anti-HIV-1 están presentes se unirán a los antígenos virales específicos que se encuentran sobre la tira. Después del lavado, las tiras se incuban con anticuerpos antihumano producidos en cabra que se encuentran conjugados con peroxidasa del rábano picante o fosfatasa alcalina. Tras otro paso de lavado, se agrega el sustrato enzimático a la tira. En este momento aparecerán bandas coloreadas sobre la tira en aquellas áreas donde inicialmente ha ocurrido la reacción antígeno-anticuerpo. La posición de estas bandas y la comparación con los patrones de muestras de control positivas permiten establecer la reactividad de una muestra determinada con los antígenos virales específicos y realizar la interpretación.⁴⁹

Las técnicas de inmunotransferencia también pueden utilizarse para evaluar la especificidad de los anticuerpos contra otros agentes infecciosos. Por ejemplo, los EIA que se utilizan para detectar anticuerpos contra el virus del herpes simple (HSV) no pueden diferenciar los anticuerpos específicos anti-HSV-1 o anti-HSV-2 (p. ej., Vidas®, BioMérieux-Vitek, Hazelwood, MO; Bio Whittaker, Walkersville, MD).³ Los métodos de inmunotransferencia pueden utilizarse para diferenciar infecciones previas con HSV tipo 1 o tipo 2 analizando la reacción del suero de pacientes contra membranas preparadas con antígenos de HSV-1 o HSV-2 y buscando las reacciones positivas con aquellos antígenos que son específicos del virus.⁴ Los métodos de inmunotransferencia también se han utilizado para detectar anticuerpos específicos antivirales de rubéola en casos con sospecha de rubéola congénita.¹⁵² La tecnología de inmunotransferencia también fue evaluada como una prueba de diseño para el diagnóstico de sífilis.¹⁶ Utilizando este ensayo, la presencia de anti-

cuerpos dirigidos contra antígenos inmunodeterminantes de *Treponema pallidum* con peso molecular de 15,5; 17; 44,5 y 47 kDa es diagnóstica de sífilis adquirida cuando se utiliza un conjugado anti-IgG.¹¹⁰ Cuando se utiliza un conjugado anti-IgM para revelar los complejos antígeno-anticuerpo unidos a la membrana, el procedimiento de inmunotransferencia resulta un ensayo sensible y específico para el diagnóstico de sífilis congénita.¹¹⁶ Dada la relativa baja sensibilidad del EIA y de las técnicas de inmunofluorescencia, el procedimiento de transferencia Western también ha surgido como el método más sensible y específico para el serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi*, y se ha establecido el criterio diagnóstico basado en el patrón de bandas observado en la membrana de inmunotransferencia.^{118,119}

A causa de la gravedad de la enfermedad por HIV-1 y de la necesidad de realizar un diagnóstico específico, tanto los sistemas de EIA como la prueba de inmunotransferencia para la detección de anticuerpos anti-HIV-1 han sufrido varias modificaciones desde su implementación en 1984.¹¹⁷ En un principio, los fabricantes de los equipos de pruebas diagnósticas utilizaban lisados preparados de cultivos de líneas celulares de linfocitos T infectados con HIV-1 como fuente de antígeno para los EIA de primera generación y para los procedimientos de inmunotransferencia. Se observaron reacciones biológicas falsas positivas debido a la reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de HLA (antígeno leucocitario humano) que expresaban las líneas celulares linfoides utilizadas para el crecimiento del virus.^{119,121} Más tarde, se obtuvieron antígenos recombinantes a través de la clonación de genes virales en sistemas de expresión que utilizaban plásmidos como vectores, en bacterias o levaduras. La utilización de estos antígenos dio como resultado el desarrollo de pruebas con aún mayor especificidad que los ensayos de primera generación, es decir, EIA de segunda generación. Sin embargo, en estos ensayos, las reacciones cruzadas con antígenos bacterianos o de levaduras contaminantes podían ser la causa de reacciones falsas positivas. La purificación y la secuenciación de aminoácidos de los antígenos retrovirales condujeron a la utilización de péptidos sintéticos como antígenos en el procedimiento de EIA (ensayos de tercera generación). Estos antígenos se pueden producir en grandes cantidades y muestran escasa variabilidad entre lotes. Como consecuencia de su pureza, las reacciones indeterminadas o atípicas debidas a los componentes contaminantes presentes en las pruebas basadas en lisados o antígenos recombinantes se encuentran reducidas. No obstante, se demostró que las que utilizan antígenos de envoltura sintéticos pueden no detectar los anticuerpos anti-HIV-1 en pacientes infectados por cepas virales muy divergentes, como HIV-1 del grupo O.^{28,91,118} Mientras que los ensayos de primera y segunda generación detectaban principalmente IgG, los de tercera generación detectan todas las clases de anticuerpos (IgG, IgM e IgA) anti-HIV-1 presentes en el suero o la saliva. Los EIA de tercera generación para HIV-1 también difieren ligeramente de los ensayos anteriores en su metodología; los antígenos virales sintéticos fijados a la fase sólida "capturan" primero los anticuerpos anti-HIV-1 y luego éstos son detectados por medio del agregado de antígeno de HIV-1 marcado con enzima en lugar de una antiglobulina marcada con enzima.²² Debido a su alta especificidad, los ensayos basados en antígenos sintéticos pueden diferenciar fácilmente los anticuerpos anti-HIV-1 de los anti-HIV-2.

La disponibilidad de antígenos recombinantes y sintéticos que producen reacciones sensibles y específicas también condujo al desarrollo de nuevas pruebas de cribado y suplementa-

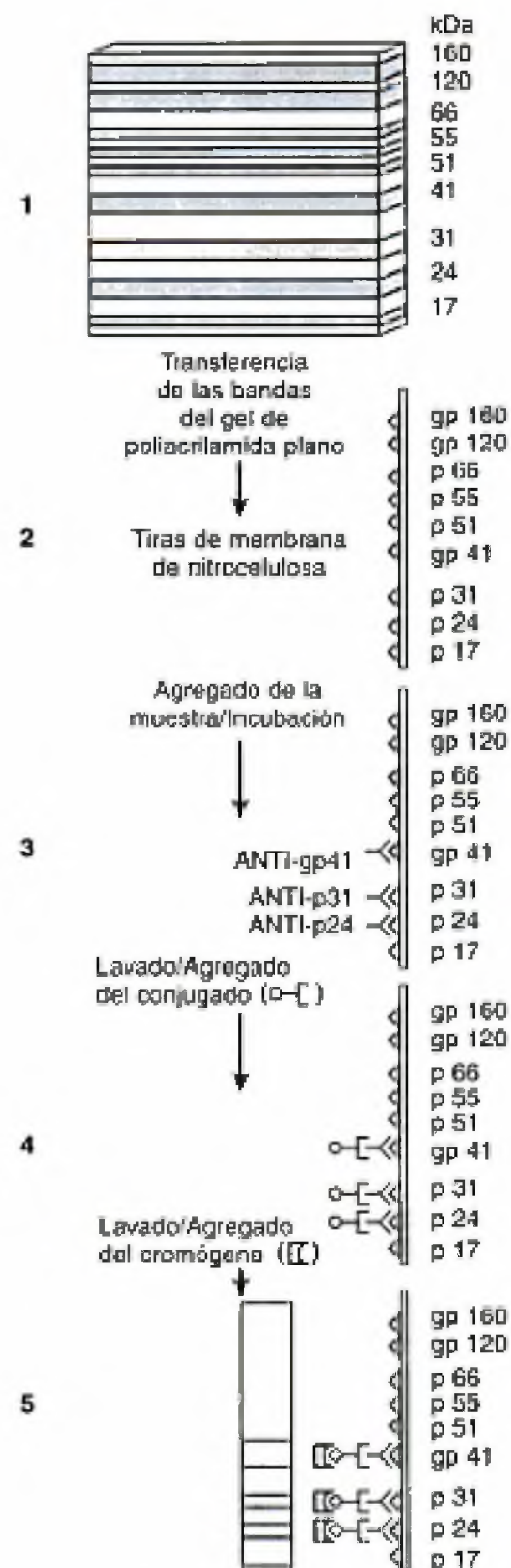


Figura 3-5 Técnica de transferencia Western (Western blot) para la detección de anticuerpos anti-HIV-1. En el paso 1, los virus crecidos en cultivo se solubilizan, se purifican parcialmente y se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida plano. Se separan así las proteínas y glicoproteínas virales por peso molecular. En el paso 2, los antígenos presentes en el gel son "transferidos" por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa, la cual, luego, se corta en tiras. Las tiras son entonces incubadas (paso 3) con las muestras por estudiar (suero). Tras el lavado para eliminar el material no unido, se adiciona un conjugado marcado con enzima (paso 4). El conjugado se une a los anticuerpos de la muestra de suero que se unieron a la tira. Después de otro paso de lavado, se adiciona el sustrato enzimático cromogénico y se observan bandas coloreadas sobre la tira en los sitios de reactividad inicial de los anticuerpos. En este diagrama, se muestra la reactividad con gp41, p24 y p31 lo que confirma que la muestra de suero contiene anticuerpos anti-HIV-1. Reproducido con autorización de Sandler SGH. En: DeVita VI Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. 2a ed. Filadelfia: Lippincott, 1988:128.

rias para la detección de anticuerpos anti-HIV-1/HIV-2. Se han creado EIA rápidos por inmunotransferencia en puntos (*dot blot*) (10-15 minutos) utilizando antígenos sintéticos y recombinantes. En estos ensayos, los antígenos virales están unidos a una membrana en un cartucho de reacción. Si los anticuerpos están presentes en el suero por ensayar se unen a los antígenos sobre la membrana. Luego de un paso de lavado, se agrega al cartucho de reacción una anti-IgG/IgM humana conjugada con una enzima. Si en el paso previo se unieron los anticuerpos, el conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo. El conjugado que no se unió se elimina por medio de un nuevo paso de lavado y el agregado del sustrato de la enzima da como resultado una reacción de color directamente sobre la membrana. La mayoría de estos ensayos tienen manchas de control positivas y negativas sobre la membrana para indicar si la prueba se realizó correctamente y establecer su validez. Uno de estos ensayos, la prueba SUDS® (Abbott-Murex), ha sido aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) como prueba diagnóstica para la detección de anticuerpos anti-HIV-1. Se han desarrollado otras pruebas de inmunotransferencia en puntos que detectan anticuerpos anti-HIV-1 y anti-HIV-2.²² La aplicación de antígenos sintéticos purificados en un patrón de bandas sobre tiras de nitrocelulosa ensambladas en un soporte plástico también condujo al desarrollo de ensayos suplementarios de segunda y de tercera generación "similares a la transferencia Western" que pueden utilizarse en lugar del procedimiento de inmunotransferencia basado en lisados virales. Estas pruebas se denominan inmunoanálisis en línea.^{74,108} Los métodos de EIA que utilizan antígenos recombinantes o sintéticos también están revolucionando el enfoque tradicional del laboratorio en el diagnóstico de otras infecciones, como la provocada por el virus de Epstein-Barr y la sífilis.^{50,149}

Métodos enzimoimmunológicos de captura de anticuerpos para la detección de IgM

Los métodos de EIA para anticuerpos detectan principalmente IgG. Sin embargo, se pueden utilizar métodos de detección de IgM específicos para diferenciar las infecciones recientes de las pasadas, ya que las IgM están presentes sólo en la fase temprana de la mayoría de las infecciones. Los métodos específicos para la detección de IgM obvian la necesidad de analizar la presencia de IgG en muestras obtenidas durante la fase aguda y la fase de convalecencia de la enfermedad. En las infecciones congénitas, la detección de IgM específicas en muestras de sangre fetal o neonatal indica infección activa en lugar de anticuerpos transplacentarios. Tiempo atrás, los EIA diseñados para la detección de IgM utilizaban como conjugado un anticuerpo anti-IgM marcado con una enzima. Sin embargo, si en la misma muestra se encuentran presentes IgG e IgM, las moléculas más pequeñas y numerosas de IgG compiten eficazmente por la unión con el antígeno fijado a la fase sólida, lo que produce la falta de unión del conjugado anti-IgM y un resultado falso negativo para la detección de IgM en la prueba. Además, el factor reumatoideo presente en la muestra también puede interferir en el ensayo. Este factor se compone de anticuerpos, principalmente de clase IgM, dirigidos contra las IgG de cualquier especificidad. Si la muestra de suero contiene IgG y factor reumatoideo, las moléculas IgG específicas más pequeñas se unen al antígeno de la fase sólida y el factor reumatoideo, a su vez, se une a la IgG. El agregado de un conjugado anti-IgM marcado da como resultado su unión al factor reumatoideo, con la consecuente generación de un resultado falso positivo cuando se agrega el sustrato de la enzima.

Se han creado numerosos métodos para separar las IgM de las IgG con el objeto de detectar IgM en las muestras de suero. La cromatografía de intercambio iónico en columna y la filtración por geles separa las clases de inmunoglobulinas basadas en la carga y el tamaño de las moléculas, respectivamente. Utilizando soluciones buffer de fuerza iónica variable, se puede eluir IgM de estas columnas y separar así las IgM de las IgG. Otros procedimientos para separar estas moléculas basándose en el tamaño es la centrifugación en gradiente de sacarosa, dado que las moléculas de IgM lo atraviesan antes que las moléculas más pequeñas y livianas de IgG. Las muestras de suero también pueden tratarse con anticuerpos anti-IgG, lo que da como resultado la unión de IgG dentro de los inmunocomplejos y se evita así que reaccionen en los ensayos para la detección de IgM. La proteína A del estafilococo, ya sea mezclada en forma directa con la muestra de suero o incorporada en una columna de filtración por geles, también puede utilizarse para "unir" moléculas de IgG presentes en las muestras de pacientes. Sin embargo, estos métodos de separación tienen otros problemas técnicos. Ninguno de los métodos es totalmente eficaz para separar IgM de IgG, por lo tanto, la interferencia de la IgG con la detección de IgM puede aún seguir constituyendo un problema incluso luego del pretratamiento de las muestras. Además, todas estas técnicas dan como resultado la dilución de la muestra de suero. Dado que las IgM pueden encontrarse en niveles muy bajos, la dilución de la muestra puede ocasionar resultados falsos negativos en las pruebas de detección, aunque realmente se encuentren presentes anticuerpos específicos del tipo IgM contra ese agente. La disponibilidad de pruebas de laboratorio precisas y confiables para la detección de IgM es de gran importancia para el diagnóstico del síndrome de rubéola congénita, ya que el feto tiene un riesgo sustancial de sufrir serios daños.

El método de elección para la detección de IgM es el de "captura de anticuerpos" (véase fig. 3-6). En esta modificación, IgG dirigidas contra las IgM se unen a la fase sólida. La incubación de la muestra da como resultado que todas las IgM presentes en la muestra se unan a las IgG inmovilizadas. Luego de un paso de lavado, se agrega el antígeno específico al pocillo de la microplaca, uniéndose a las moléculas de anticuerpo IgM que presentan la especificidad antigénica particular. El agregado posterior de un anticuerpo IgG dirigido contra otro epítipo del antígeno conjugado con una enzima conduce a la marcación enzimática indirecta de las IgM específicas contra el antígeno, lo cual se visualiza como un producto final coloreado cuando se adiciona el sustrato de la enzima. El factor reumatoideo o los anticuerpos de clase IgM con otra especificidad antigénica no unen el conjugado que produce el producto final coloreado.

Enzimoimmunoanálisis para la detección de antígenos

Los diseños de los EIA también pueden modificarse para detectar antígenos en lugar de anticuerpos. En este caso, un anticuerpo de "captura" se fija a la fase sólida (fig. 3-7). La incubación con una muestra que contiene al antígeno deriva en la unión del antígeno al anticuerpo. Luego de un paso de lavado, la incubación con anticuerpos marcados con enzima (o con biotina) dirigidos contra un segundo epítipo del antígeno deriva en la unión de este anticuerpo conjugado. Después del lavado, se agrega el sustrato enzimático (o la enzima conjugada con avidina). El agregado del sustrato enzimático genera un producto final coloreado. Los métodos de enzimoimmunoanálisis para la detección de antígenos se han utilizado para la detec-

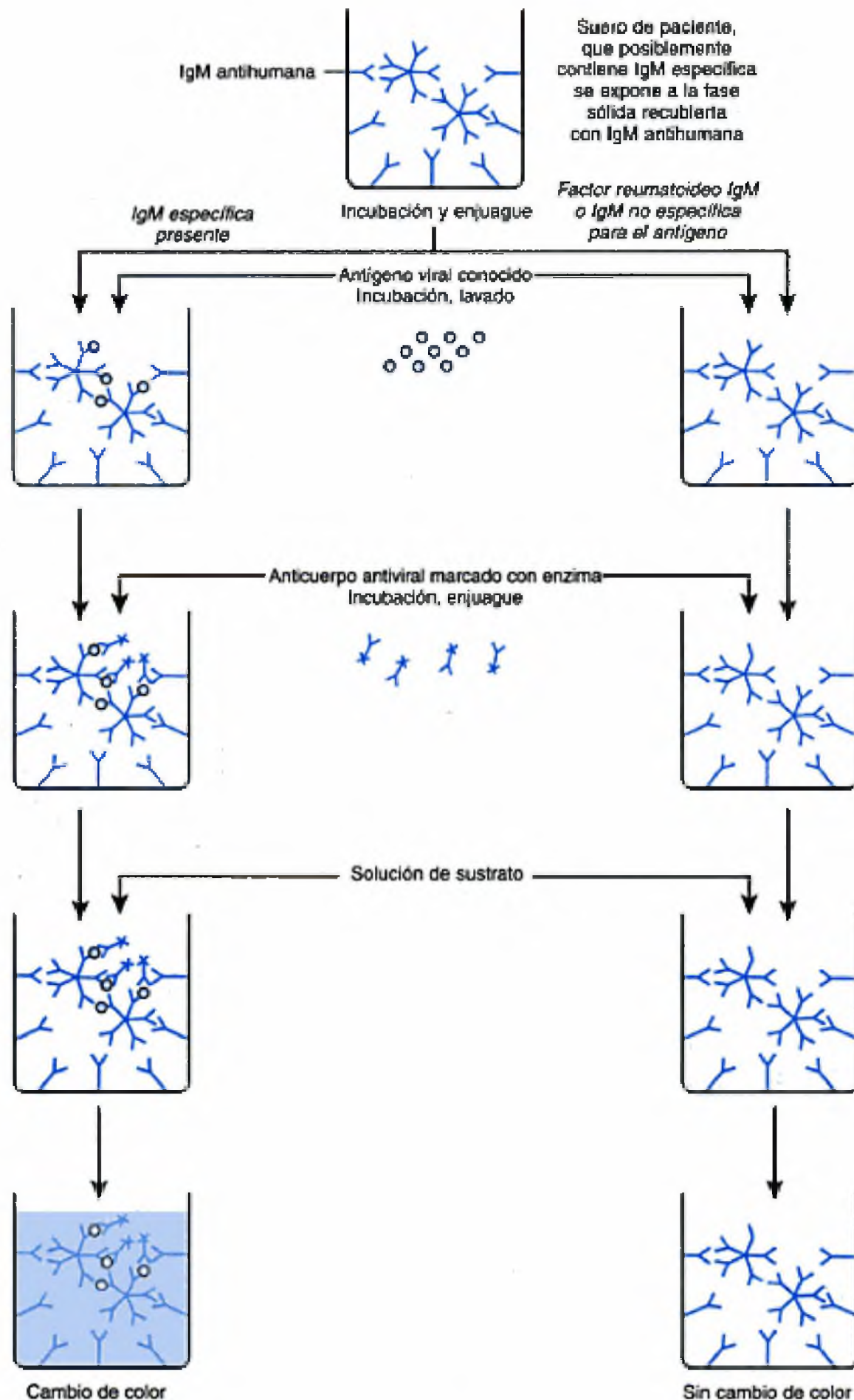


Figura 3-6 Enzimoanálisis de captura de IgM. El suero del paciente que puede contener IgM se expone a una fase sólida recubierta con anticuerpos anti-IgM humana. Cualquier IgM presente en el suero es "capturada" o unida a los anticuerpos anti-IgM humana. Los pasos subsiguientes en el ensayo (adición de antígeno viral conocido, anticuerpos antivirales marcados con enzima y sustrato) se realizan para determinar la especificidad de la IgM capturada. La IgM capturada de especificidad apropiada producirá un resultado final con cambio de color. La IgM capturada de otra especificidad, incluido el factor reumatoideo, no deberá producir cambio de color como resultado final. Redibujado de Leland DS. Clinical Virology. Filadelfia: Saunders, 1996.

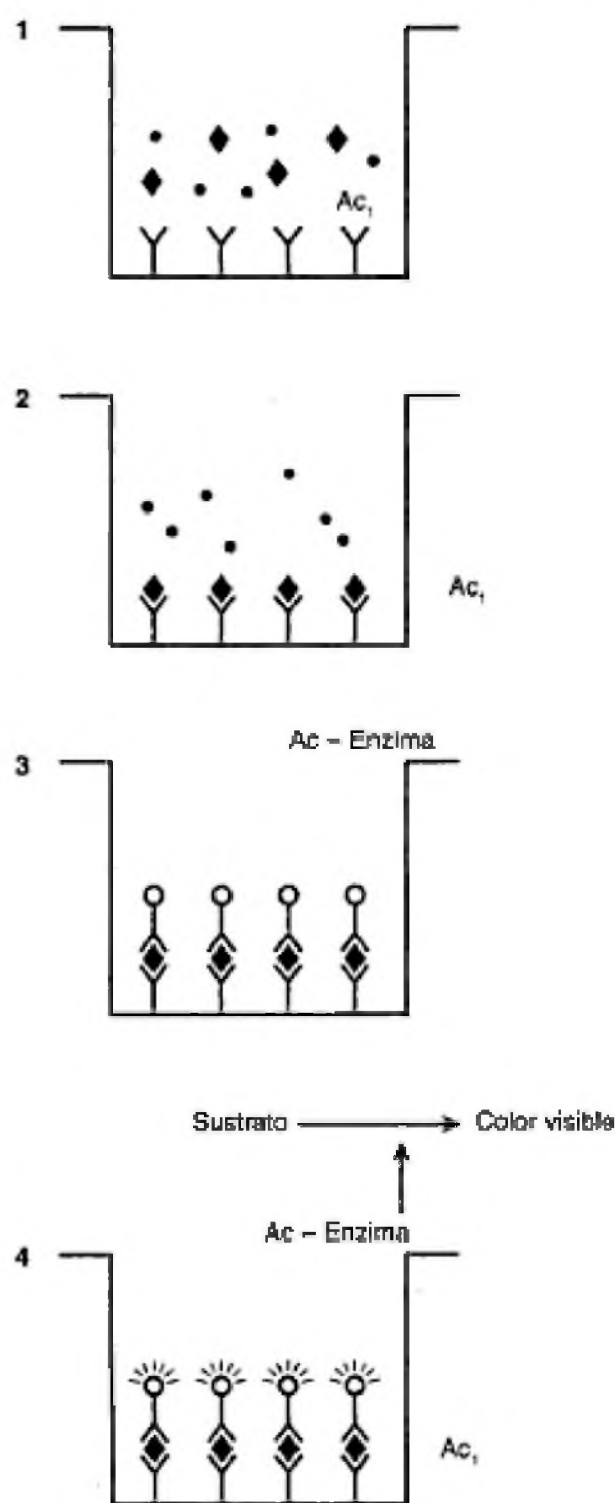


Figura 3-7 Técnica de inmunoensayo de captura de antígeno para *Chlamydia trachomatis*. En esta técnica, los anticuerpos dirigidos contra el antígeno que se quiere detectar se unen a una fase sólida. Las muestras de hisopados de lavados endocervicales se agregan al pocillo (paso 1). Las clamidias presentes en la muestra urogenital son "capturadas" por los anticuerpos de la fase sólida. Luego de un paso de lavado, se adiciona el antígeno anticlamidia que está conjugado con una enzima (paso 2) y que reacciona con el antígeno unido a los anticuerpos de la fase sólida. Después de otro paso de lavado, se adiciona el sustrato enzimático (paso 3) y se detecta un color visible.

ción de antígenos bacterianos de numerosos agentes en diversos tipos de muestras, por ejemplo, antígenos capsulares de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tipo b y *N. meningitidis* en LCR, antígenos de *Legionella* y *S. pneumoniae* en orina, toxinas similares a Shiga producidas por *E. coli* enterohemorrágica, toxinas de *Clostridium difficile* en muestras de heces y antígenos de clamidia en muestras endocervicales.^{7,33,89,90,97,119,122,123,148} En virología, se han desarrollado métodos de EIA para la de-

tección directa de rotavirus en filtrado de heces, para virus sincitial respiratorio en muestras de las vías aéreas bajas y para la detección de antígeno p24 en suero durante la infección primaria aguda por HIV.^{39,42,54,58,72,80,120,134,137,138} La disponibilidad de pruebas de EIA para la detección de antígenos de *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* directamente en muestras de heces ha hecho que esta técnica diagnóstica se conserve con muy pocas innovaciones desde la implementación de la preservación de las muestras y las técnicas de tinción.^{3,11,47,71,102,133} En micología, las dos únicas pruebas actuales de la detección de antígeno son la prueba para antígeno de *Histoplasma* y de la criptococos.^{44,144,145} El EIA para criptococos Premier® (Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH) utiliza una inmunoglobulina policlonal de captura y un anticuerpo monoclonal de detección y puede realizarse sobre muestras de LCR y de suero sin requerir pasos de pretratamiento.⁴⁴ En la figura 3-7 se presenta un diagrama de un ensayo típico de captura de antígeno para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Otra variante significativa para la detección de antígenos por EIA es el inmunoensayo sobre membranas de nitrocelulosa. Estas membranas sirven para absorber antígenos de una muestra clínica. El agregado de conjugado y sustrato en forma secuencial da como resultado la aparición de un producto de reacción coloreado directamente sobre la membrana. Una ventaja de estos ensayos es la presencia de controles positivos internos sobre la membrana junto con la reacción de prueba. Estos controles se utilizan para determinar si la prueba se realizó en forma correcta y se deben observar los resultados esperados del control sobre la membrana para considerarla válida. Actualmente se cuenta con pruebas de EIA sobre membranas para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados faríngeos, de virus sincitial respiratorio e influenza en secreciones de las vías aéreas bajas, de rotavirus en muestras de heces y de *C. trachomatis* en muestras endocervicales. A pesar de que estas pruebas proporcionan un resultado rápido, numerosos estudios han indicado que son un 15-20% menos sensibles y que tienen menor especificidad que las pruebas de EIA de detección de antígeno en microptacas, los ensayos de inmunofluorescencia, los métodos de detección molecular (p. ej., métodos de sonda directa o de amplificación) o el cultivo.^{20,77,82,114,116,133,134,139} Por ejemplo, el EIA Clearview® para la detección de *C. trachomatis* (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) ha demostrado un rango de sensibilidad entre 62% y 95% y de especificidad entre 86,9% y 99% comparado con el cultivo celular, los ensayos de sonda directa y la reacción en cadena de la polimerasa.^{25,75,83,125,131} La menor sensibilidad de este ensayo indica que no se detectarán entre el 5% y el 38% de las infecciones por clamidias, mientras que la baja especificidad sugiere que esta prueba puede no ser útil para el diagnóstico de rutina de las infecciones por clamidias, sobre todo en las poblaciones de baja prevalencia.¹²²

Otra modificación de los EIA para la detección de antígenos son los inmunoensayos ópticos (OIA, por su sigla en inglés) para la detección de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados faríngeos (Biostar®, Boulder, CO) (véase lámina en color 13-1). Este ensayo se realiza sobre un portaobjetos que permite la visualización directa de un cambio físico en el grosor de unas películas delgadas que se forman como resultado de las reacciones de unión entre el anticuerpo de captura sobre el portaobjetos y el antígeno de la muestra. Después de la extracción del antígeno del hisopo, se agrega al extracto un anticuerpo antiestreptococo del grupo A marcado con una enzima. Esta mezcla se coloca sobre el portaobjetos para permitir que el com-

plejo antígeno-anticuerpo se une a los anticuerpos antiestreptococo del grupo A que se encuentran sobre el portaobjetos. Tras una incubación de dos minutos, se agrega el sustrato de la enzima. Después del lavado, se lee la reacción examinando el tono de la luz que se refleja desde la superficie del portaobjetos. La presencia de antígeno de estreptococo en la muestra se determina por la aparición de una mancha púrpura, mientras que la conservación de un color dorado sobre el portaobjetos de reacción indica la ausencia de antígenos. La sensibilidad y la especificidad de la prueba Strep A OIA® tienen un rango de 81% a 98,9% y de 95% a 98,6%, respectivamente.^{24,29,96,114} Desde el lanzamiento de la prueba OIA para estreptococos del grupo A, se comercializan también pruebas OIA para la detección de estreptococos del grupo B y *C. trachomatis*. En una evaluación del OIA para *C. trachomatis* realizada por Pate y cols. se informó una sensibilidad y una especificidad del 73,8% y del 100%, respectivamente, cuando se la comparó con la PCR.¹⁰⁶ Para la detección de estreptococos del grupo B en muestras vaginales, ninguna de las pruebas rápidas (OIA, otros EIA y aglutinación de partículas de látex) demostró suficiente sensibilidad para detectar bajos niveles de colonización cuando se las comparó con los métodos de caldo recomendados por los CDC.^{17,18,52,53,147} En consecuencia, ninguno de estos métodos se recomienda como prueba de cribado en mujeres embarazadas para detectar la colonización por estreptococos del grupo B.

Técnicas de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia brinda una alternativa a los métodos de EIA para la detección y localización de antígenos para el diagnóstico de enfermedades bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales. Esta técnica también puede utilizarse en la detección de anticuerpos para el diagnóstico retrospectivo de enfermedades infecciosas. La fluorescencia se define como la radiación de energía cuando la luz de corta longitud de onda (la longitud de onda de "excitación") excita los electrones de una molécula a un estado de energía mayor por un tiempo muy corto. Cuando el electrón regresa al estado de preexcitación o basal, la energía se libera como luz de una longitud de onda más larga. En los ensayos de inmunofluorescencia, el anticuerpo específico está conjugado con un compuesto capaz de fotoexcitarse y luego fluoresce (por lo general, derivados de isotiocianato de fluoresceína [FITC] o rodamina), lo que da como resultado un trazador sensible con una reactividad inmunológica inalterable. El antisuero conjugado se agrega a las células o tejidos que se encuentran sobre un portaobjetos, se une a los antígenos y forma así un inmunocomplejo estable. Las moléculas que no reaccionaron se eliminan mediante el lavado, luego el preparado se seca y se examina con un microscopio de fluorescencia equipado con la fuente de luz y los filtros de barrera apropiados. Los antígenos unidos en forma específica a los anticuerpos fluorescentes pueden detectarse como objetos brillantes color verde manzana o amarillo anaranjado contra un fondo oscuro, según el fluorocromo utilizado. Las técnicas de inmunofluorescencia pueden ser directas o indirectas. Las pruebas de inmunofluorescencia directa generalmente se pueden utilizar para la detección de antígenos y anticuerpos (es decir serología).

Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de antígenos

Las técnicas de **inmunofluorescencia directa (IFD)** (fig. 3-8) implican la aplicación de un conjugado marcado sobre el

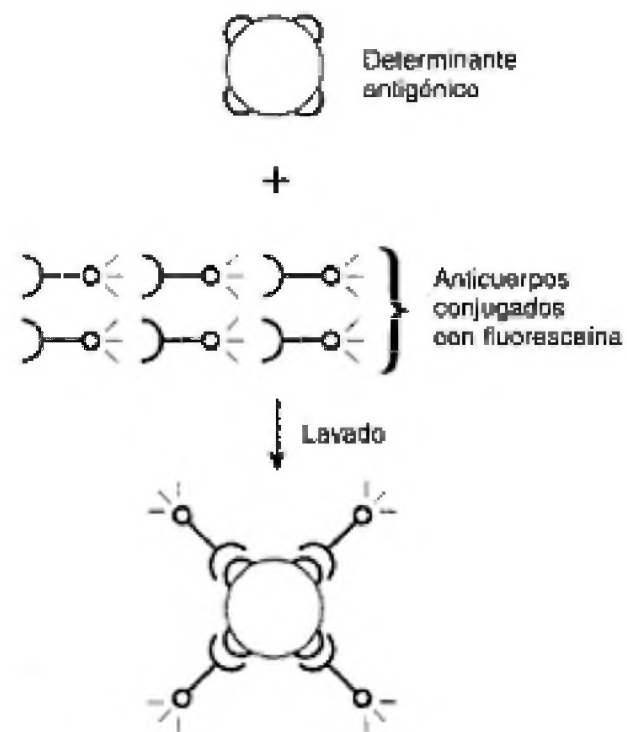


Figura 3-8 Diagrama de un análisis de inmunofluorescencia directa (IFD). En el método de IFD, el antígeno (p. ej., muestras respiratorias para el virus sincitial respiratorio, muestras urogenitales para clamidias) se coloca en el pocillo de un portaobjetos para inmunofluorescencia y reacciona directamente con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno conjugado con fluoresceína. Luego de la incubación y el lavado, el portaobjetos se examina para observar los patrones de fluorescencia característica.

material que se quiere examinar, seguido de un período de incubación de 15-30 minutos en un ambiente húmedo de 35 a 37 °C para permitir que ocurra la reacción antígeno-anticuerpo. Después de un paso de lavado para eliminar el conjugado no unido, el preparado se seca al aire y se monta para su observación con un microscopio con la fuente de luz y los filtros de barrera apropiados para fluorescencia. En el procedimiento de **inmunofluorescencia indirecta (IFI)** (fig 3-9) el material se cubre primero con un exceso de suero inmune sin marcar dirigido contra el antígeno y se lo incuba durante 30 a 45 minutos a 35-37 °C. Luego se lava la muestra con solución buffer fosfato salino y se incuba con un antisuero marcado dirigido contra la especie de la inmunoglobulina utilizada en la reacción inicial (p. ej., anticuerpo antihumano conjugado con fluoresceína producido en cabra). Luego de realizar los lavados para eliminar los materiales inespecíficos del fondo, la fluorescencia observada con el microscopio indica la presencia de antígeno. Las pruebas de IFD son simples y rápidas de realizar con menos reacciones inespecíficas; sin embargo, pueden ser menos sensibles que los procedimientos indirectos. Si bien los métodos de IFI son más sensibles y producen una fluorescencia más brillante, pueden ser menos específicos y encontrarse sujetos a una mayor reactividad cruzada.¹³ Se comercializan reactivos para la detección de antígenos por IFD y por IFI para diversos agentes, como *T. pallidum*, *C. trachomatis*, virus del herpes simple, virus varicela-zóster, virus respiratorios (virus influenza, virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza), *Pneumocystis jiroveci*, *G. lamblia* y *C. parvum*.^{14,19,23,48,63,93,98,99,126,132,139,140,145,146,151} Algunos reactivos se pueden utilizar para la detección directa de microorganismos en muestras clínicas (p. ej., frotis endocervicales, células ras-

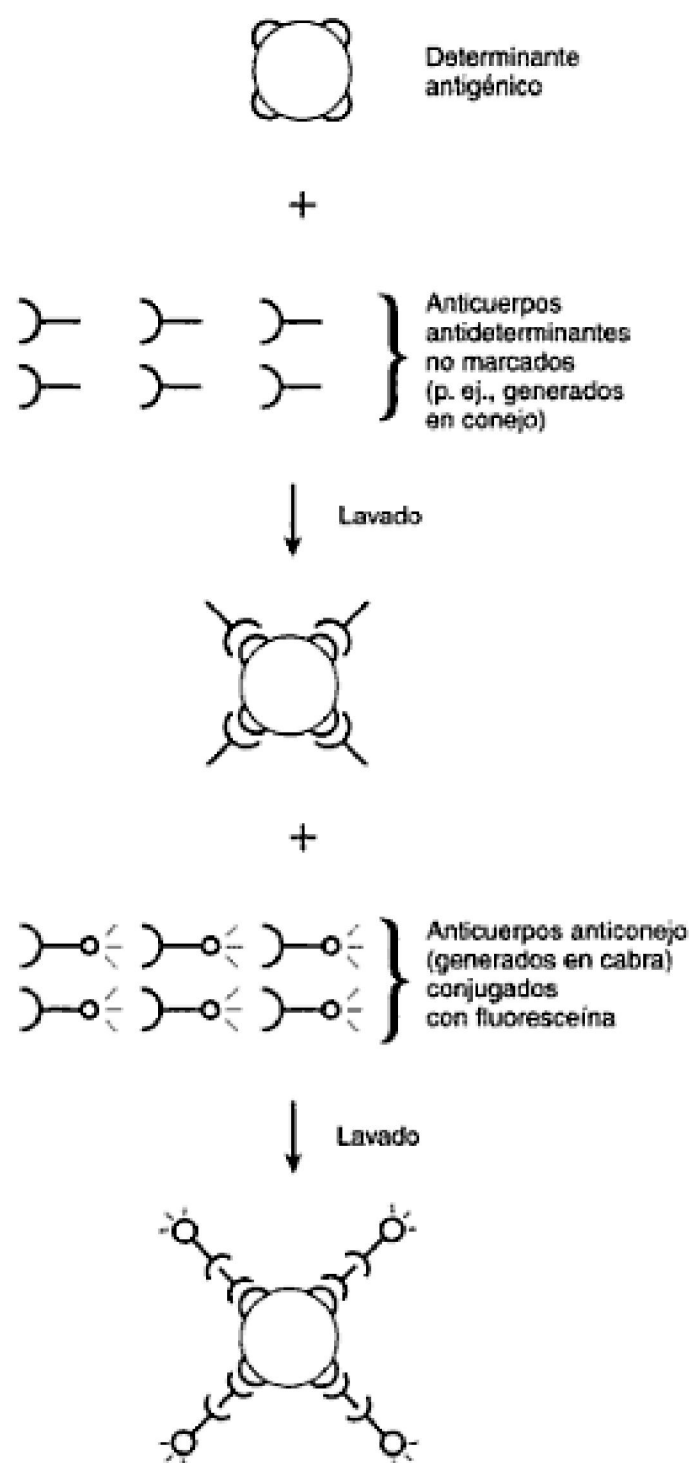


Figura 3-9 Diagrama de un estudio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de un antígeno. En este método, la muestra (p. ej., esputo para *Legionella*) se hace reaccionar con un exceso de anticuerpos no marcados dirigidos contra el antígeno. Luego del paso de lavado, los anticuerpos conjugados con fluoresceína dirigidos contra la especie de anticuerpos utilizado en la reacción inicial (p. ej., anticuerpos anticonejo de tipo IgG marcados con fluoresceína producidos en cabra) se colocan en el portaobjetos para inmunofluorescencia. Luego del lavado, el portaobjetos se examina para observar la presencia de fluorescencia específica. Por ejemplo, para *Legionella*, los anticuerpos de conejo no marcados dirigidos contra un gran número de serotipos se pueden utilizar para el primer paso del procedimiento, mientras que para el segundo paso sólo se requiere una única Ig de cabra anticonejo marcada con fluoresceína. Si se va a detectar *Legionella* por medio de un método de IFD, se requerirán conjugados marcados con fluoresceína separados para cada serotipo.

padas de la base de una lesión vesicular, esputos, lavados broncoalveolares, heces diarreicas) y para la identificación de los aislamientos de cultivo (p. ej., virus respiratorios, virus de herpes simple y varicela-zóster).

Técnicas de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos

Los ensayos de IFI pueden utilizarse para la detección de anticuerpos de manera similar a como se aplican las pruebas de FC o IHA (fig. 3-10). Las pruebas de IFI se utilizan más a menudo en el diagnóstico retrospectivo de infecciones virales para detectar seroconversión o incremento de cuatro veces del título de anticuerpos entre las muestras obtenidas durante la fase aguda y la de convalecencia. En el procedimiento de IFI, los portaobjetos con células de cultivos de tejido infectadas por virus fijadas sobre los pocillos del portaobjetos para pruebas de FA (fluorescencia de anticuerpos) se cubren con diluciones seriadas del suero del paciente. Luego de la incubación y el lavado se agrega un anticuerpo antiinmunoglobulina humana producido en cabra o conejo marcado con fluoresceína (conjugado) a cada pocillo del portaobjetos que contiene los antígenos virales. Después del lavado, se observan los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia y se determina el punto final (la dilución más alta del suero que produce inmunofluorescencia positiva). Se pueden establecer los cambios en el título mediante el examen de los portaobjetos con diluciones seriadas de suero de la fase aguda y de la convalecencia que se ensayaron juntas en una misma prueba. También se pueden realizar los ensayos indirectos utilizando conjugados marcados

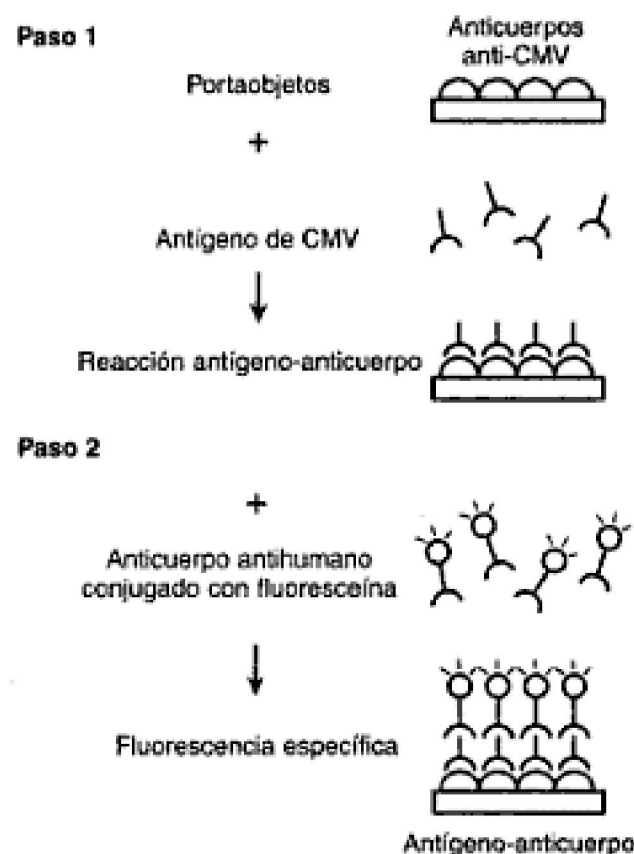


Figura 3-10 Método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos. En este método, el antígeno (p. ej., células de cultivo infectadas por citomegalovirus [CMV]) se fija sobre un portaobjetos para inmunofluorescencia y reacciona con el suero del paciente. Si los anticuerpos anti-CMV están presentes, se unen a los antígenos del portaobjetos. Luego del paso de lavado, el portaobjetos se cubre con una capa de anticuerpos de cabra antihumanos conjugados con fluoresceína. Esto da como resultado la marcación de las células infectadas con CMV fijadas en el portaobjetos e indica la presencia de anticuerpos anti-CMV en la muestra inicial de suero. Los títulos se pueden determinar realizando el ensayo con diluciones al doble del suero y leyendo la mayor dilución del suero, lo que da como resultado un grado no válido de fluorescencia.

con enzima (p. ej., peroxidasa del rábano picante), en lugar de utilizar reactivos marcados con fluorocromo. Las pruebas que utilizan conjugados con enzimas producen un precipitado coloreado que se observa con un microscopio óptico en lugar de con un microscopio de fluorescencia. La mayoría de los laboratorios que utilizan IFI para realizar la serología analizan inicialmente los sueros en diluciones 1:8 o 1:10. Si se obtiene un resultado positivo, se preparan diluciones al doble y cada dilución se prueba por IFI hasta que se alcanza una dilución de punto final. La inversa de la dilución más alta que mostró fluorescencia es el título de esa muestra para el anticuerpo en cuestión. En la figura 3-10 se muestra un procedimiento de IFI para la detección de anticuerpos anti-CMV.

El diagnóstico de ciertas infecciones virales, como la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV), se realiza totalmente por medio de la detección serológica de antígenos y anticuerpos porque este virus no crece en el cultivo de líneas celulares en monocapa utilizadas habitualmente en los laboratorios de microbiología. El EBV es un miembro de la familia *Herpesviridae* y causa mononucleosis infecciosa. La respuesta específica contra la infección está caracterizada por la aparición secuencial de ciertos anticuerpos, como IgM e IgG anti-VCA (antígeno de cápside viral) y anticuerpos antiantígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA) y antígeno temprano (EA) (véase cap.

22). Durante la fase aguda de la infección aparecen la IgM anti-VCA y luego la IgG anti-VCA, en tanto los anticuerpos anti-EBNA están ausentes durante la infección aguda, aparecen durante la fase de convalecencia y se mantienen durante toda la vida. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos anti-EBNA en el suero indica una infección pasada en lugar de una infección actual. Como el EBNA se encuentra en bajos niveles en las células infectadas con EBV, para su detección se utiliza a menudo la **prueba de inmunofluorescencia anticomplemento (ACIF)** (fig. 3-11).¹¹³ En esta prueba se utiliza una línea celular linfoblástica infectada por EBV como fuente de antígeno. Para este fin suelen utilizarse las células Raji ya que expresan sólo antígeno EBNA; VCA no se expresa y EA se detecta pocas veces.⁴⁵ Estas células se fijan en el portaobjetos y reaccionan con el suero del paciente. Si los anticuerpos específicos anti-EBNA están presentes se unen al antígeno nuclear. Luego de un paso de lavado, las células se cubren con complemento. Si los anticuerpos específicos anti-EBNA reaccionaron en el primer paso, el complemento se une a los inmunocomplejos. Tras otro paso de lavado, las células se cubren con anticuerpos anticomplemento conjugados con fluoresceína. La observación de fluorescencia nuclear revela la presencia de EBNA, que indica infección pasada por EBV. La prueba de inmunofluorescencia anticomplemento ACIF se utiliza también para determi-

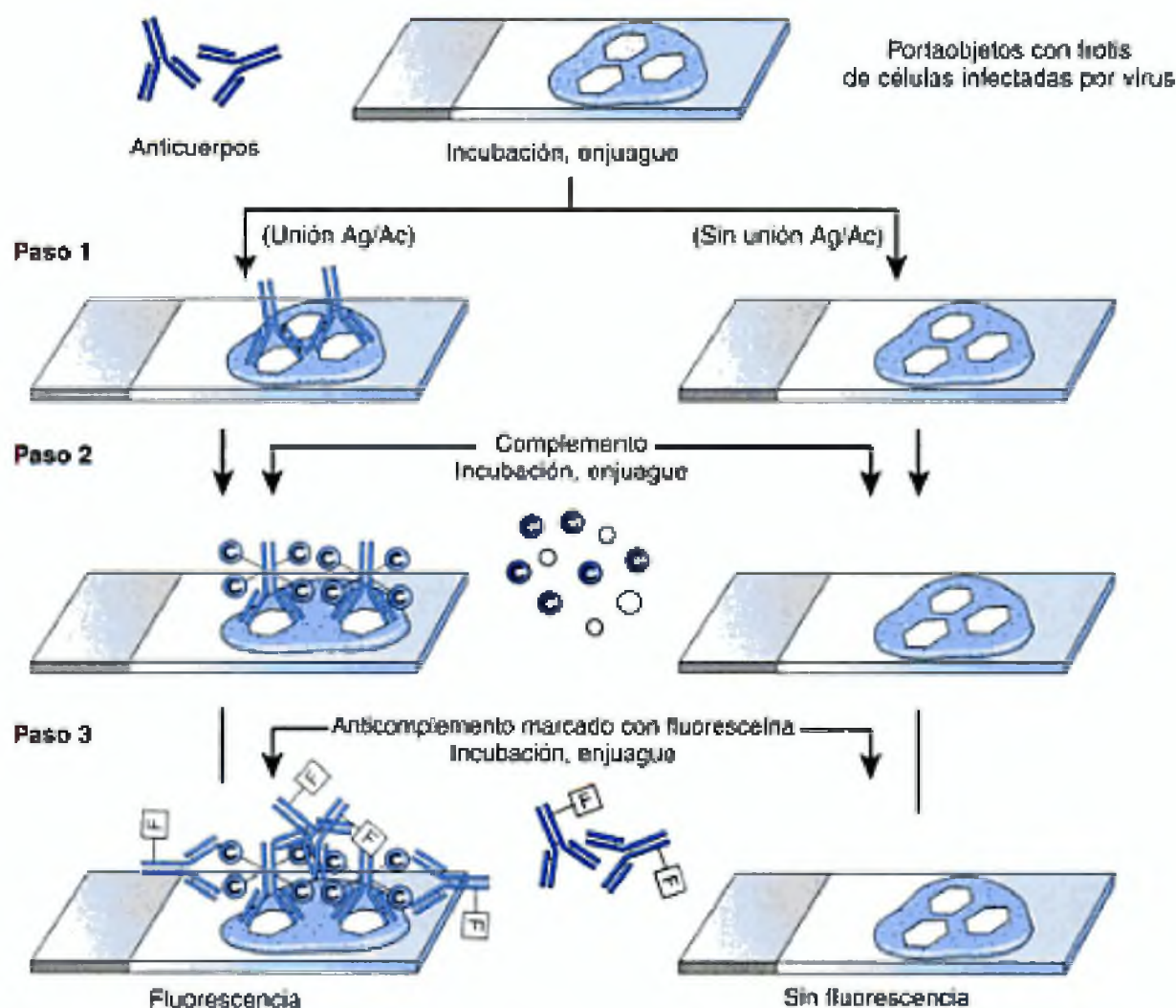


Figura 3-11 Inmunofluorescencia anticomplemento. En el paso 1, los anticuerpos se exponen a células infectadas fijadas en un portaobjetos. En el paso 2, se adiciona complemento que se une a los complejos antígeno-anticuerpo (Ag/Ac) formados en el paso 1. En el paso 3, se adiciona anticuerpo marcado con fluoresceína que se une al complemento unido en el paso 2 y puede observarse la fluorescencia. Si en el paso 1 los anticuerpos no se unen, el complemento no puede fijarse en el paso 2 y el anticuerpo marcado con fluoresceína no puede unirse en el paso 3; por lo tanto, no se observa fluorescencia. Redibujado de Leland DS. Clinical Virology. Filadelfia: Saunders, 1996.

nar el estado inmunitario, para detectar anticuerpos anti-CMV y para demostrar seroconversión luego de una inmunización con una vacuna viral (p. ej., virus varicela-zóster).^{3,50,58,73,109,112}

Otro ensayo de inmunofluorescencia denominado **prueba de anticuerpos fluorescentes contra antígenos de membrana (FAMA)** es de elección para determinar el estado inmunitario contra ciertos virus, como virus varicela-zóster (VZV), sobre todo por su extremada sensibilidad.^{46,114} En este ensayo, se realizan diluciones seriadas del suero del paciente en pocillos de microplacas y se agregan células de cultivo infectadas con VZV a las diluciones del suero. Luego de la incubación, la microplaca se centrifuga para forzar la sedimentación de las células en el fondo de los pocillos y se realizan dos lavados, con pasos de centrifugación intermedios. Se agrega a cada pocillo una dilución de trabajo de un anticuerpo IgG antihumana conjugado con fluoresceína y se incuba. Luego de unos pocos pasos de lavado/centrifugación, se cosechan las células, se fijan al pocillo de un portaobjetos FA y se examinan con un microscopio de fluorescencia. La prueba FAMA es más sensible que la FC o el EIA, pero requiere para su realización células vivas infectadas por virus.^{5,30,50,128}

Las estrategias de inmunofluorescencia y enzoinmunoanálisis tienen sus ventajas y sus desventajas. Los métodos de EIA para la detección de antígenos son ventajosos en los laboratorios con gran volumen de trabajo donde se analizan muchas muestras diarias para una única determinación (p. ej., *C. trachomatis* o virus sincitial respiratorio).^{49,113} A pesar de que las técnicas de IFD son más laboriosas, una ventaja distintiva es la capacidad de observar en forma directa los elementos celulares de fondo en ciertos procedimientos de detección directa de antígenos que permite determinar si la muestra es adecuada. Por ejemplo, dado que *C. trachomatis* infecta preferentemente las células epiteliales cilíndricas cervicales, la presencia de células epiteliales pavimentosas y/o de neutrófilos segmentados, eritrocitos y moco indica que la muestra es inadecuada para realizar el diagnóstico. Las muestras adecuadas presentan una preponderancia de células epiteliales cilíndricas y cúbicas intactas. Esto se puede determinar por medio de la prueba de anticuerpo fluorescente directo e incluir dentro del informe de laboratorio, lo que le permite al médico evaluar la evidencia clínica de infección por clamidias, así como la posibilidad de que un resultado negativo refleje en realidad una recolección inadecuada de muestra endocervical. Esto no se puede determinar con pruebas que no son visuales, como los EIA de captura de antígeno para *Chlamydia trachomatis* y la mayoría de los ensayos moleculares.

REFERENCIAS

- Addis DC, Mathews RM, Stewart JM, et al. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol* 1991;29:1137-1142.
- Anandnayagan JT, Mathews RS, Uthayakumar S, Clay JC. Evaluation of a novel solid-phase immunoassay, Clearview Chlamydia, for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2813-2814.
- Ashley R, Cem A, Magga V, et al. Inability of enzyme immunoassays to discriminate between infections with herpes simplex virus types 1 and 2. *Ann Intern Med* 1991;115:520-526.
- Ashley RL, Milioni J, Lee F, et al. Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus type 1 and 2 in human sera. *J Clin Microbiol* 1988;26:662-667.
- Balfour HH, Edelman CK, Dirksen CL, et al. Laboratory studies of acute varicella and varicella immune status. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;30:149-158.
- Bockwith DG, Habtewold DC, Alpaugh K, et al. Comparison of a latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985;21:328-331.
- Bibb WF, Arrow PM, Thacker L, McKinney RM. Detection of soluble *Legionella pneumophila* antigens in serum and urine by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1984;20:478-482.
- Bisno AL, Wood JW, Lawton J, et al. Antigens in urine of patients with glomerulonephritis and in normal human serum which cross-react with group A streptococci: identification and partial characterization. *J Lab Clin Med* 1978;91:500-513.
- Blandie J, Hirsch L, Straton N, et al. Comparison of Clearview Chlamydia, Chlamydia, the PACE 2 assay, and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 1993;31:1622-1625.
- Benton M, Balakrishnan K, Dumaswala U, et al. HLA antibodies in blood donors with reactive screening tests for antibody to the immunodeficiency virus. *Transfusion* 1987;27:113-119.
- Boone RL, Wilkin TD, Nash TE, et al. TechLab and Alexon Giardia enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *J Clin Microbiol* 1999;37:611-614.
- Booth JC, Haszington G, Bakir TMF, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive haemagglutination techniques for detecting cytomegalovirus IgG antibody. *J Clin Pathol* 1982;35:1345-1348.
- Brown SL, Bibb WF, McKinney RM. Retrospective examination of lung tissue specimens for the presence of *Legionella* organisms: comparison of an indirect fluorescent antibody system with direct fluorescent antibody testing. *J Clin Microbiol* 1984;19:468-472.
- Brunswick BG, Farthing PG, Castellino SN. Simultaneous detection of and differentiation between herpes simplex and varicella-zoster viruses with two fluorescent probe in the same test system. *J Clin Microbiol* 1993;31:3260-3263.
- Buckley RH, Dee SC, O'Fallon WM. Serum immunoglobulins: I. Levels in normal children and in uncomplicated childhood allergy. *Pediatrics* 1968;41:600-611.
- Dyme RE, Lake S, Bell M, et al. Evaluation of a *Treponema pallidum* Western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 1992;10:115-122.
- Carroll KC, Ballou D, Varner M, et al. Rapid detection of group B streptococcal colonization of the genital tract by a commercial optical immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:206-210.
- Centers for Disease Control. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45(RR-7):1-24.
- Chesneau SH, Fleck JE, Lombardo D, et al. Evaluation of a commercially available direct immunofluorescence staining reagent for detection of respiratory syncytial virus in respiratory secretions. *J Clin Microbiol* 1986;24:155-156.
- Chernesky M, Caciuciano S, Mahony J, et al. Ability of Testpack Rotavirus enzyme immunoassay to diagnose rotavirus gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:2439-2441.
- Chernesky MA, Mahony JB, Caciuciano S, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986;154:141-148.
- Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1989;321:794-799.
- Collins MH, Jiang B, Croffie JM, et al. Hepatic granulomas in children: a clinicopathologic analysis of 23 cases including polymerase chain reaction for *Histoplasma*. *Am J Surg Pathol* 1996;20:332-338.
- Dale JC, Vener EA, Combs JM, et al. Evaluation of two rapid antigen assays, Biostar Strept OIA and Pacific Biosch CARD O.S., and culture for detection of group A streptococci in throat swabs. *J Clin Microbiol* 1994;32:2698-2701.
- Daley JA, Siskin RC. Evaluation of rapid, commercial latex agglutination techniques for serotyping β -hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol* 1988;26:2429-2431.
- Davis RS, Siber GR, Kramo JS, Russell RR. Evaluation of a commercial latex particle agglutination test for rapid diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b infection. *Pediatrics* 1982;69:466-471.
- DeCock KM, Maran M, Kouadio JC, et al. Rapid tests for distinguishing HIV-1 and HIV-2. *Lancet* 1990;336:757-759.
- DeLeys R, Vanderburgh RB, Vanden Hoesevelde M, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west central African origin. *J Virol* 1990;64:1207-1216.
- Delva-Laita P, Whittier S, Hestner M, et al. Rapid detection of group A streptococcal pharyngitis in a pediatric population with optical immunoassay. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:742-743.
- Dentand G, Steinberg S, Ulton G, et al. Rapid enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibody to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1988;157:211-212.
- DeRoe JM, Schwillens P, Van den Borch JE. Monoclonal antibodies for serotyping of the P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1986;24:121-123.
- Diamond RD, Bennett JE. Prognostic factors in cryptococcal meningitis: a study of 111 cases. *Ann Intern Med* 1981;95:175-177.
- Dominguez JA, Gali N, Pedrosa P, et al. Comparison of the Biotex *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotex *Legionella* urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1998;36:2718-2722.
- Donohue-Rolfe A, Kelley MA, Bennett M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for shigella toxin. *J Clin Microbiol* 1986;24:65-68.
- Drew WL. Controversies in viral diagnosis. *Rev Infect Dis* 1986;8:814-824.
- Dwyer JM. The specific immune response. In: Root RK, Waldvogel F, Corey L, Stanton WE, eds. *Clinical Infectious Diseases: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1999:91-108.
- Englund JA, Fiedler PA, Jewell A, et al. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 1996;34:1649-1653.
- Engstom SM, Skoep E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1993;33:419-427.

39. Fedorko DP, Engler HD, O'Shaughnessy EM, et al. Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:3044-3047.
40. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 1973;182:1026-1028.
41. Ferraro MJ, Kallas WM, Welch KP, et al. Comparison of a new, rapid enzyme immunoassay with a latex agglutination test for qualitative detection of rhella antibodies. *J Clin Microbiol* 1987;25:1722-1724.
42. Flander RF, Lindsay PD, Charet R, et al. The evaluation of clinical specimens for the presence of respiratory syncytial virus antigen using an enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1986;19:1-9.
43. Forngren A, Sjogquist J. "Protein A" from *Staphylococcus aureus* I. Pseudimmune reaction with human globulin. *J Immunol* 1966;97:822.
44. Gade W, Himefeld SW, Babcock LS, et al. Comparison of the Premier Cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J Clin Microbiol* 1991;29:1616-1619.
45. Gade W, Ledman DW, Washington R. Serological responses to various *Coccidioides* antigen preparations in a new enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1992;30:1907-1912.
46. Gallo D, Schmidt NJ. Comparison of anti-complement immunofluorescence and fluorescent antibody to membrane antigen test for determination of immunity status to varicella-zoster virus and for serodifferentiation of varicella-zoster and herpes simplex virus infections. *J Clin Microbiol* 1981;14:539-543.
47. Garcia LS, Shindler RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:1526-1529.
48. Garcia LS, Sham AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992;30:3255-3257.
49. George JR, Schachterman G. Detection of HIV infection using serologic techniques. In: Schachterman G, George JR, eds. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide to Technical, Medical, Social, Legal, and Management Issues*. New York: Springer-Verlag, 1994:62-102.
50. Gershon A, Steinberg S, LaRosa P. Detection of antibodies to varicella-zoster virus by latex agglutination. *Clin Diagn Virol* 1994;2:271-277.
51. Gormley-Bernes P, Dale JR, Benchey EH, Oplerkuach W. Monoclonal antibody to human renal glomerular cross-reacts with streptococcal M protein. *Infect Immun* 1987;55:2416-2419.
52. Granato PA, Petosa MT. Evaluation of a rapid screening test for detecting group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1991;29:1336-1338.
53. Green M, Dushelsky R, Wald ER, et al. Comparison of two antigen assays for rapid intrapartum detection of vaginal group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol* 1993;31:78-82.
54. Halstead DC, Todd S, Frisch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. *J Clin Microbiol* 1990;28:1021-1025.
55. Hamilton JR. Comparison of Meritex Strep with Strepix for direct colony grouping of β -hemolytic streptococci from primary isolation and subculture plates. *J Clin Microbiol* 1988;26:692-695.
56. Harbeck RD, Teague J, Crossen GR, et al. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A streptococci from pharyngeal specimen: comparison with standard culture methods. *J Clin Microbiol* 1993;31:839-844.
57. Heimer DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics* 1958;22:616-627.
58. Henard DR, Wu S, Phillips J, et al. Detection of p24 antigen with and without immune complex dissociation for longitudinal monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 1995;33:72-75.
59. Hinderer W, Lang D, Roche M, et al. Serodiagnosis of Epstein-Barr virus infection by using recombinant viral capsid antigen fragments and autologous gene fusion. *J Clin Microbiol* 1999;37:3239-3244.
60. Humphrey CD, Cook RH Jr, Bradley DW. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electron microscopy. *J Virol Methods* 1990;29:177-188.
61. Hursh DA, Abbot AD, Sen R, et al. Evaluation of a latex particle agglutination assay for the detection of cytomegalovirus antibody in patient serum. *J Clin Microbiol* 1989;27:2878-2879.
62. Ingram DL, Pensen AW, Oechli AR. Detection of bacterial antigens in body fluids with the Wellcofen *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* (ACYW 135) latex agglutination tests. *J Clin Microbiol* 1983;18:1119-1121.
63. Ito E, George RW, Hunter EE, et al. Specific immunofluorescent staining of pathogenic treponemes with a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1992;30:731-738.
64. Janda WM, Wilczek LM, Mandel KL, et al. Comparison of monoclonal antibody-based methods and a ribosomal ribonucleic acid probe test for *Neisseria gonorrhoeae* culture confirmation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:177-184.
65. Jarrett EE, Miller JE. Production and activities of IgE in helminth infections. *Prog Allergy* 1982;31:178-184.
66. Johnson BJB, Robbins KE, Bailey RE, et al. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996;174:346-353.
67. Kao C-L, McIntosh K, Fernie B, et al. Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection by immunofluorescence. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984;2:199-206.
68. Kaufman L. Laboratory method for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 3):S23-S29.
69. Kaufman L, Sekhon AS, Molebina N, et al. Comparative evaluation of commercial Premier EIA and microimmunodiffusion and complement fixation for *Coccidioides* immunities. *J Clin Microbiol* 1995;33:618-619.
70. Kaufman L, Standaert PC. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:209-225.
71. Kehl KSC, Cicciello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 1995;33:416-418.
72. Kelling JA. Culture vs. direct antigen assays for detection of microbial pathogen from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:451-458.
73. Kettinger JD, Schmidt NJ, Gallo D, Lennette EH. Anti-complement immunofluorescence test for antibodies to human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1977;6:627-632.
74. Kline RL, McNam D, Holoshny M, et al. Evaluation of Chiron HIV-1/HIV-2 recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996;33:2650-2653.
75. Klyntman JAW, Goorens WHF, Mouton RW, et al. Evaluation of Clearview and Magic Lite test, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:3204-3210.
76. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of pre-defined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.
77. Kulni P, Seidl S, Holzberger G. HLA DR4 antibodies cause false-positive HTLV-III antibody ELISA results. *Lancet* 1985;1:1222-1223.
78. Lambert RS, George RB. Evaluation of enzyme immunoassay as a rapid screening test for histoplasmosis and blastomycosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:316-319.
79. Lange CF. Chemistry of cross-reactive fragments of streptococcal cell membrane and human glomerular basement membrane. *Transplant Proc* 1969;1:959-963.
80. Lange J, Gaudinot J. Decline of antibody reactivity to HIV core proteins secondary to increased production of HIV antigen. *Lancet* 1987;1:448.
81. LaRosa P, Steinberg S, Wanhe E, et al. Comparison of five assays for antibody to varicella-zoster virus and the fluorescence-antibody-to-membrane-antigen test. *J Clin Microbiol* 1987;25:2059-2062.
82. Lambacher H, van Melle G, Dreyfus N, et al. Evaluation of a new immunologic test for rapid detection of group A streptococci, the Abbott Testpack Strep A Plus. *J Clin Microbiol* 1995;33:260-261.
83. Landersdale T-L, Landers L, Thomeytruff I, Chapin K. Comparison of the PACE II assay, two amplification assays, and Clearview EIA for detection of *Chlamydia trachomatis* in female endocervical and urine specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:2223-2229.
84. Lecland DS, Bach KA, Cunningham EB, et al. Evaluation of four methods for cytomegalovirus antibody detection tests for use by a bone marrow transplant service. *J Clin Microbiol* 1989;27:176-178.
85. Lennette ET. Epstein-Barr Virus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Ed. Washington, DC: ASM Press, 1999:912-918.
86. Lewis LL, Taber LH, Baughn RE. Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol* 1990;28:286-292.
87. Loussier-Ajaka I, Ly D, Chais ML. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV subtype O infected patients. *Lancet* 1994;323:1393-1395.
88. Lyerty DM, Neville HD, Evans DT, et al. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *J Clin Microbiol* 1998;36:184-190.
89. Mackenzie AMR, Lebel P, Orblin E, et al. Sensitivities and specificities of Premier E. coli O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1608-1611.
90. Macone AB, Arkeno G, Letourneau JM, et al. Comparison of a new rapid enzyme-linked immunosorbent assay with latex particle agglutination for the detection of *Haemophilus influenzae* type b infections. *J Clin Microbiol* 1985;21:711-714.
91. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JE, Riviere GR. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1990;28:1276-1279.
92. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JP. Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965;2:235-237.
93. Manins TB, Jaskowski TD, Mouchen CL, Hill HR. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 1995;33:940-943.
94. Mayo DR, Brennan T, Surpinski SP, et al. Cytomegalovirus antibody detection by three commercially available assays and complement fixation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1985;3:455-459.
95. McDonald IC, Quennee P. Utility of a respiratory virus panel containing a monoclonal antibody pool for screening of respiratory specimens in nonpeak respiratory syncytial virus season. *J Clin Microbiol* 1993;31:2809-2811.
96. McHugh TM, Casavant CH, Wilber JC, et al. Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1985;22:1014-1019.
97. Moncada J, Schachter I, Bolan G, et al. Evaluation of Syva's enzyme immunoassay for the detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:663-608.
98. Ng VL, Virani NA, Chaisson RE, et al. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* using a direct fluorescence monoclonal antibody stain. *J Clin Microbiol* 1990;28:2228-2233.
99. Ng VL, Yaglo DM, McPhaul LW, et al. Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:935-939.

100. Norris SJ. Treponema pallidum Polypeptide Research Group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Microbiol Rev* 1993;57:750-779.
101. Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC, et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. *Science* 1983;219:637-644.
102. Ong SJ, Cheng MY, Liu KH, Horng CH. Use of the ProSpecT microplate enzyme immunoassay for the detection of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:248-249.
103. Oudin J. Methode d'analyse immunochimique par precipitation spécifique en milieu gelifié. *CR Acad Sci* 1946;222:115-116.
104. Padhye AA, Smith G, McLaughlin D, et al. Comparative evaluation of a chemiluminescent DNA probe and an exoantigen test for rapid identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1992;30:3108-3111.
105. Padhye AA, Smith G, Standard PG, et al. Comparative evaluation of chemiluminescent DNA probe assays and exoantigen tests for rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:867-870.
106. Pale MS, Dixon PB, Hardy K, et al. Evaluation of the Biostar Chlamydia OIA assay with specimens from women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 1998;36:2183-2186.
107. Petre GF. A specific precipitin reaction associated with the growth on agar plates of meningococcus, pneumococcus, and *B. dysenteriae* (Shiga). *Br J Exp Pathol* 1932;13:380-394.
108. Pollet DE, Saman EL, Peeters DC, et al. Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus 1 and 2 with a strip-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. *Clin Chem* 1991;37:1700-1707.
109. Preissner C, Steinberg S, Gershon A, Smith TF. Evaluation of the anticomplement immunofluorescence test for detection of antibody to varicella-zoster virus. *J Clin Microbiol* 1982;16:373-376.
110. Pruneda RC, Dover JC. A comparison of two passive agglutination procedures with enzyme-linked immunosorbent assay for rubella antibody status. *Am J Clin Pathol* 1986;86:768-770.
111. Radetsky M, Wheeler RC, Roe MH, et al. Comparative evaluation of kits for rapid diagnosis of group A Streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:274-281.
112. Rao N, Wanuszewski DT, Armstrong JA, et al. Evaluation of anti-complementary immunofluorescence test in cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1977;6:633-638.
113. Redman BM, Klein C. Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 1973;11:499-520.
114. Roe M, Kishiyama C, Davidson K, et al. Comparison of Biostar Strep A OIA optical immune assay, Abbott Tet-Pack Plus Strep A, and culture with selective media for diagnosis of group A streptococcal pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1551-1553.
115. Roth RA, Koshland ME. Identification of a lymphocyte enzyme that catalyzes pentamer immunoglobulin M assembly. *J Biol Chem* 1981;256:4633-4639.
116. Rothbarth PH, Hermes M-C, Schrijnemakers P. Reliability of two new test kits for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol* 1991;29:824-826.
117. Sangadharan MG, Popovic M, Bruch L, et al. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984;224:506-508.
118. Schable C, Zekeng L, Pau CP, et al. Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* 1994;344:1333-1334.
119. Shachter J, Jones RB, Butler RC, et al. Evaluation of the Vidas Chlamydia test to detect and verify *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2102-2106.
120. Schupbach J, Boni J. Quantitative and sensitive detection of immune-complexed and free HIV antigen after boiling of serum. *J Virol Method* 1993;43:247-256.
121. Seodand SM, Wilshaw GA, Said B, et al. Identification of *Escherichia coli* that produces heat-stable enterotoxin ST^a by a commercially available enzyme-linked immunoassay and a comparison of the assay with infant mouse and DNA probe tests. *J Clin Microbiol* 1989;27:1697-1699.
122. Sellers J, Mahoney J, Jang D, et al. Rapid, on-site diagnosis of chlamydial urethritis in men by detection of antigens in urethral swabs and urine. *J Clin Microbiol* 1991;29:407-409.
123. Sippel JE, Hider PA, Conroni G. Use of Directigen late agglutination test for detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* antigens in cerebrospinal fluid from meningitis patients. *J Clin Microbiol* 1984;20:884-886.
124. Skendzel LP, Wilcox KR, Edson DC. Evaluation of assays for the detection of antibodies to rubella: A report based on data from the College of American Pathologists Surveys of 1982. *Am J Clin Pathol* 1983;80:594-598.
125. Skulnick M, Small GW, Simor AE, et al. Comparison of the Clearview Chlamydia test, Chlamydiazyme, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with a low prevalence of infection. *J Clin Microbiol* 1991;29:2086-2088.
126. Spada B, Bichler K, Chegas P, et al. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretion from infants and children. *J Virol Methods* 1991;33:305-310.
127. Steece RS, Talley MS, Skeels MR, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination inhibition, and passive latex agglutination for determination of rubella immune status. *J Clin Microbiol* 1985;21:140-142.
128. Steinberg SP, Gershon AA. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus by using a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1991;29:1527-1529.
129. Stewart GI, Parkman PD, Hopps HE, et al. Rubella virus hemagglutination-inhibition test. *N Engl J Med* 1967;276:554-557.
130. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1993;31:845-850.
131. Stratton NJ, Hirsch L, Harris F, et al. Evaluation of the rapid Clearview Chlamydia test for direct detection of chlamydiae from cervical specimens. *J Clin Microbiol* 1991;29:1551-1553.
132. Tam MR, Stamm WE, Handsfield HH. Culture independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1984;310:1146-1150.
133. Thomas EE, Book LE. Comparison of two rapid methods for detection of respiratory syncytial virus (Test Pack RSV and Ortho Elisa) with direct immunofluorescence and virus isolation for the diagnosis of pediatric RSV infection. *J Clin Microbiol* 1991;29:632-635.
134. Thomas EE, Pateman ML, Kawano E, Curran M. evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1189-1193.
135. U.S. Public Health Service. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test. In: U.S. Public Health Service Public Health Monograph 74, Washington DC: Government Printing Office, 1965.
136. Van de Rijn L, Zabriskie JB, McCarty M. Group A streptococcal antigens cross-reactive with myocardium. Purification of heart-reactive antibody and isolation and characterization of the streptococcal antigen. *J Exp Med* 1977;146:579-599.
137. Von Sydow M, Gaines H, Sonnenberg A, et al. Antigen detection in primary HIV infection. *Br Med J* 1988;295:238-240.
138. Wall R, Denning D, Amos A. HIV antigenaemia in acute HIV infection. *Lancet* 1987;1:566.
139. Waner JL, Todd SJ, Shaiaby J, et al. Comparison of Directigen FLU-A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 1991;29:470-482.
140. Waner JL, Whitehurst NJ, Downs T, Graves DG. Production of monoclonal antibodies against parainfluenza 3 virus and their use in diagnosis by immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1985;22:535-538.
141. Wheat LJ, Connolly-Springfield P, Kohler RB, et al. *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen detection in diagnosis and management of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989;87:396-400.
142. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N Engl J Med* 1986;314:83-88.
143. Wieden MA, Lundergan LL, Blum J, et al. Detection of coccidioidal antibodies by 33 kDa spherule antigen, *Coccidioides* EIA, and standard serologic tests in sera from patients being evaluated for coccidioidomycosis. *J Infect Dis* 1996;173:1272-1277.
144. Williams V, Gershon A, Brunell P. Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by indirect immunofluorescence. *J Infect Dis* 1974;130:669-672.
145. Wolfson JS, Waldron MA, Sierra LS. Blinded comparison of a direct immunofluorescent monoclonal antibody staining method for identification of *Pneumocystis carinii* in induced sputum and bronchoalveolar lavage specimens of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1990;28:2136-2138.
146. Wong DT, Welliver RC, Riddlesberger KR, et al. Rapid diagnosis of parainfluenza virus infection in children. *J Clin Microbiol* 1982;16:164-167.
147. Wust J, Heibisch G, Peter K. Evaluation of two enzyme immunoassays for rapid detection of group B streptococci in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:124-127.
148. Yolken RH, Davis D, Winkelstein J, et al. Enzyme immunoassay for detection of pneumococcal antigen in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1984;20:802-805.
149. Young H, Moyes A, Seagar L, McMillan A. Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 1998;36:913-917.
150. Zabriskie JB, Breimer EH. An immunological relationship between group A streptococcus and mammalian muscle. *J Exp Med* 1966;124:661-678.
151. Zattarian M, Peterson EM, De la Maza LM. Detection of antibodies to *Coccidioides immitis* by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1997;107:148-153.
152. Zhang T, Mauracher CA, Mitchell LA, Tingle A. Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies by immunoblot assays. *J Clin Microbiol* 1992;30:824-830.
153. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* direct immunofluorescence assay and ProSpecT *Giardia* EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1942-1943.

Microbiología molecular

Ácidos nucleicos – Las bases del DNA y del RNA

- Estructura del DNA
- Estructura del RNA
- Función del DNA–Almacenamiento de información
- Función del RNA–Transferencia de información
- Lectura (transcripción) e interpretación (traducción) del código genético

Métodos de amplificación de señales

- Sondas de ácidos nucleicos
 - Aplicaciones clínicas
- Captura de híbridos
 - Aplicaciones clínicas
- DNA ramificado
 - Aplicaciones clínicas
- Hibridación in situ
 - Aplicaciones clínicas

Amplificación de ácidos nucleicos

- Bases de la reacción en cadena de la polimerasa
 - Aplicaciones clínicas
- Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos
 - Aplicaciones clínicas
- Modificaciones de la PCR
 - RT-PCR
 - Aplicaciones clínicas
 - PCR de amplio espectro
 - Aplicaciones clínicas
 - PCR múltiple
 - Aplicaciones clínicas

- PCR anidada
 - Aplicaciones clínicas

Análisis posamplificación

- Métodos tradicionales de detección
 - Análisis de electroforesis en gel/Southern blot
 - Detección enzimática de productos amplificados
 - Aplicaciones clínicas
- Hibridación inversa
 - Aplicaciones clínicas
- Secuenciación de DNA
 - Secuenciación tradicional de DNA
 - Aplicaciones clínicas
 - Secuenciación por síntesis (pírosecuenciación)
 - Aplicaciones clínicas
 - Análisis de micromatrices
 - Aplicaciones clínicas

Amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real

- Métodos de detección de productos de amplificación en tiempo real
 - Verde SYBR
 - Sondas de hibridación
 - Aplicaciones clínicas

Tipificación de especies

- Tipificación no basada en la amplificación
 - Electroforesis en gel de campo pulsado
- Tipificación basada en la amplificación
 - PCR-RFLP
 - rep-PCR
 - Aplicaciones clínicas de la tipificación microbiana

Conclusión

Los microbiólogos siempre han buscado y continúan buscando formas más rápidas y eficientes para detectar y caracterizar microorganismos. Las técnicas moleculares, introducidas en el laboratorio microbiológico clínico ya hace tiempo, han sido una de las herramientas más poderosas hasta la fecha. La migración de métodos de diagnóstico molecular modernos desde los laboratorios de investigación de ciencia básica hacia los laboratorios clínicos comenzó hace más de una década. Estos ensayos han revolucionado el laboratorio microbiológico y han cambiado la forma de detectar, caracterizar y cuantificar los microorganismos directamente en muestras biológicas y a partir de cultivos. En los últimos quince años, estas técnicas han progresado desde aquellos ensayos laboriosos y engorrosos hasta las pruebas sencillas y rápidas que, en algunos casos, permiten obtener los resultados dentro de la hora de iniciado el ensayo, directamente de la muestra clínica.

Los ensayos moleculares utilizados por los primeros microbiólogos moleculares se usaban para detectar microorganismos con requerimientos nutricionales especiales (*fastidious*) o no cultivables o para determinar la causa de brotes significativos. Sin embargo, como estos ensayos se volvieron cada vez más sencillos y menos costosos se los ha empleado para la detección y la caracterización de microorganismos mucho más comunes.

La microbiología molecular puede separarse en tres categorías. La primera es la detección de microorganismos sin el uso de la amplificación de ácidos nucleicos. Estas aplicaciones utilizan la amplificación de una señal generada (por lo general luz o color), que resulta de la hibridación satisfactoria de una sonda de ácido nucleico con la molécula diana de ácido nucleico. La segunda es la detección, la caracterización y, en algunas instancias, la cuantificación de microorganismos usando uno de los varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos disponibles. Por último, los métodos moleculares se han usado extensamente para determinar el parentesco entre microorganismos (tipificación de especies), lo que los ha convertido en una herramienta crítica para los epidemiólogos hospitalarios y de la salud pública. Todas estas tecnologías, de una manera u otra, utilizan la química de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, comenzaremos este capítulo con un repaso de las bases de los ácidos nucleicos.

No sería práctico, y escaparía al alcance de este libro, repasar todos los ensayos moleculares usados en la identificación e investigación el manejo de microorganismos. Por consiguiente, se describirán con detalle las pruebas que demostraron mayor utilidad en el laboratorio clínico, las que están disponibles en el mercado, y algunas nuevas particularmente promisorias. Ahora existen muchos tipos de amplificación de ácidos nucleicos. La denominación reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicada para la precursora de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, y que se usa a veces en un sentido genérico en este texto, reemplaza al término amplificación de ácidos nucleicos. Esto se hizo para darle practicidad y fluidez al texto, pero el lector debería saber que también es factible el uso de otros tipos de químicos para la amplificación de ácidos nucleicos.

Ácidos nucleicos – Las bases del DNA y del RNA

Estructura del DNA

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una molécula larga compuesta por dos hebras. Cada hebra de DNA es un polímero, lo que significa que está compuesta por subunidades similares

repetidas. Estas subunidades repetidas o “bloques” de DNA son nucleótidos monofosfatos. Las dos hebras que componen la molécula de DNA tienen una dirección determinada por su química orgánica y se orientan en direcciones opuestas. Las dos hebras de una molécula de DNA intacto interactúan a través de los puentes de hidrógeno y se denominan complementarias. La configuración básica del DNA se representa en la figura 4-1.

Hay cuatro clases de nucleótidos monofosfatos que forman el DNA, denominados de acuerdo con el tipo de base que contienen. Cada nucleótido monofosfato está constituido, a su vez, por tres moléculas: el azúcar desoxirribosa, un fosfato y una base nucleotídica (fig. 4-2). El esqueleto de cada una de las dos hebras de la molécula de DNA se compone de moléculas de azúcar desoxirribosa y fosfato alternadas que se unen de modo covalente. Las bases nucleotídicas se extienden a partir de la molécula de azúcar hacia el interior de la parte central de la molécula de DNA de doble cadena. Las posiciones y orientaciones de los ácidos nucleicos se determinan por convención de acuerdo con la numeración del átomo de carbono de las moléculas de azúcar. La base nucleotídica se adhiere al azúcar en la posición 1' del carbono. Las moléculas de fosfato que forman un puente se adhieren a los carbonos 3' y 5', y le dan a la hebra una orientación particular, cuya importancia se aclara más adelante en este texto. Las cuatro bases nucleotídicas presentes en el DNA son las moléculas de purina, adenina (A) y guanina (G), y las de pirimidina, timina (T) y citosina (C). La purina adenina presente en una hebra de DNA forma dos puentes de hidrógeno con la pirimidina timina en la hebra opuesta de DNA. Estos nucleótidos se dice que son complementarios. De modo similar, la guanina en una hebra de DNA forma tres puentes de hidrógeno con la citosina complementaria en la hebra opuesta de DNA.

La estructura del DNA suele representarse, por razones de simplicidad, como una escalera en la que los peldaños están formados por las bases complementarias de las dos hebras de DNA y los laterales representan las moléculas alternadas de azúcar fosfato (fig. 4-3). El DNA en los seres vivos no existe como una molécula lineal excepto tal vez de modo temporal. Antes bien, es una superhélice: la longitud total de la molécula de DNA suele ser mayor que la longitud de la célula que la contiene. Por consiguiente, el DNA debe estar superenrollado de manera que toda su extensión pueda estar empaquetada en espacios muy pequeños. La estructura real del DNA es la doble hélice clásica descrita por James Watson y Francis Crick en 1953 (<http://nobelprize.org/medicine/laureates/1962/>). Las dos hebras de DNA mantenidas juntas por puentes de hidrógeno, como ya se describió, existen como una molécula helicoidal levógira con surcos mayores y menores. El conocimiento de la estructura básica del DNA y de la replicación de esta molécula fue fundamental para el desarrollo de las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos que ahora se utilizan con frecuencia.

Estructura del RNA

Existen muchos tipos de moléculas de RNA en la célula, pero nos limitaremos aquí a las formas más comunes, que son el RNA mensajero (mRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA). Las subunidades repetidas de RNA son similares a las de DNA. El RNA también es un polímero, pero de cadena simple o monocatenario. El esqueleto de esta molécula también se compone de moléculas de fosfato y azúcar alternadas, pero el azúcar del RNA es ribosa. Como el DNA, las bases nucleotídicas están unidas de modo covalente a la molécula de azúcar. Sin embargo, en el RNA la base nucle-

otídica timina está reemplazada por la base uracilo. Aunque la mayoría de las moléculas de RNA son monocatenarias, pueden plegarse sobre sí y formar puentes de hidrógeno complementarios, de tal modo que se origina una estructura secundaria.

Función del DNA – Almacenamiento de información

Los genes que codifican la gran mayoría de las proteínas funcionales y estructurales de la célula están contenidos en el DNA cromosómico. Si la célula requiere más proteína para su citoesqueleto o si necesita más de una enzima para metabolizar un azúcar, puede producir más si abre, lee y usa el mensaje en el DNA (véase la próxima sección). Por lo tanto, se ha sugerido que el DNA es la copia heliográfica de la célula, una analogía pertinente. Cuando una célula se divide, la célula nueva también debe tener una copia del DNA para preservar su estructura y sus funciones.

Es importante entender las bases de la replicación del DNA porque muchos de estos principios se usan en la PCR y en algunos otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos. La replicación del DNA comienza con el aflojamiento de la molécula de DNA superenrollada. Luego, la porción más lineal de la doble hélice se separa parcialmente en dos hebras componentes. Es como si los peldaños de la "escalera" de DNA estuvieran serruchados por la mitad y las dos porciones laterales de la escalera se separaran (fig. 4-4). La DNA helicasa es una enzima importante para separar las dos hebras de DNA. Una limitación en la síntesis de DNA, que se lleva a cabo por la DNA polimerasa, es que ocurre sólo en dirección 5' a 3'. Por lo tanto, una sola hebra de DNA puede hacerse de un modo continuo en esa dirección. Como se sintetiza de modo continuo y más rápidamente que la opuesta, esta hebra se denomina conductora (adelantada). La hebra retrasada se replica en secciones, debido a que el extremo 5' estará disponible para la síntesis sólo después que la DNA helicasa haya realizado su función. Las porciones discontinuas de DNA que se sintetizan en la hebra retrasada se ligan o se funden una con otra por acción de la DNA ligasa, que por último hace de la hebra retrasada una hebra continua de DNA. El resultado final en la replicación del DNA es la creación de dos hebras hijas a partir de una molécula de DNA madre (fig. 4-5). Cada una de las moléculas hijas nuevas de DNA se componen de una hebra de la molécula de DNA madre u origen y una hebra sintetizada de nuevo que es complementaria de la hebra madre. Cada una de las moléculas de DNA bicatenario recién sintetizadas son parejas perfectas de la molécula de DNA madre, a menos que suceda un error en la replicación. La replicación del DNA debe preceder a la división celular, de modo que cada nueva célula formada tenga un complemento completo de DNA.

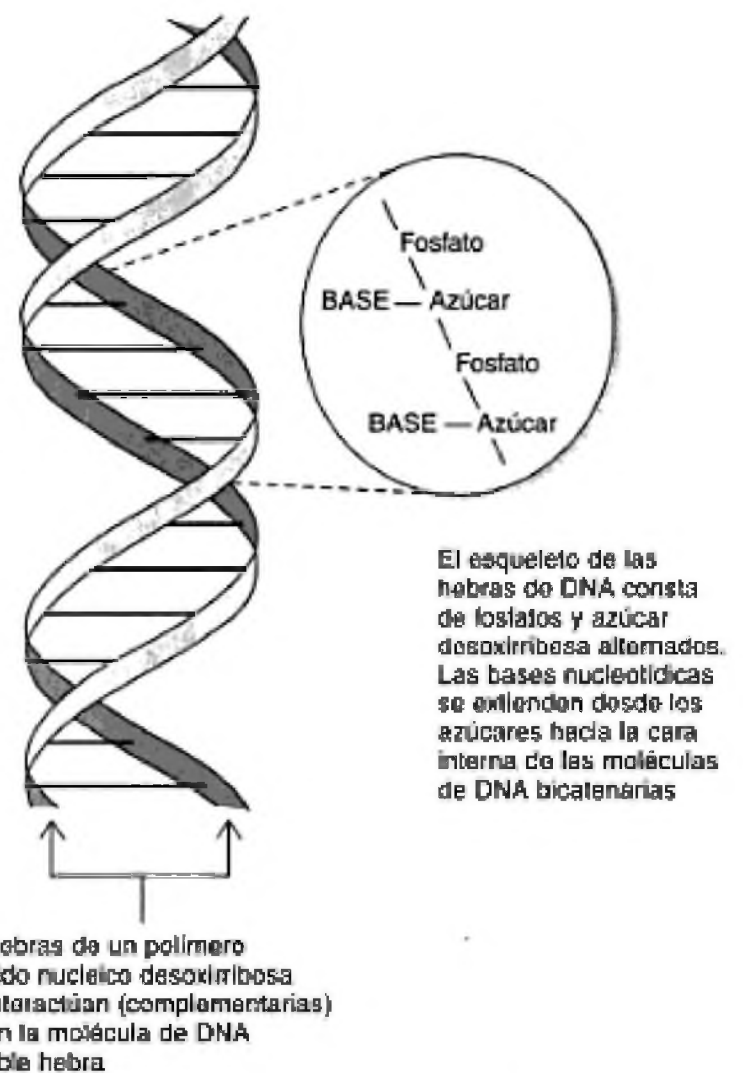


Figura 4-1 Estructura del DNA. La estructura del DNA fue descrita como una doble hélice. El DNA es un polímero bicatenario que se compone de nucleótidos como la unidad repetitiva básica; los nucleótidos, a su vez, se componen de un azúcar (desoxirribosa), un fosfato y una de cuatro bases.

Función del RNA – Transferencia de información LECTURA (TRANSCRIPCIÓN) E INTERPRETACIÓN (TRADUCCIÓN) DEL CÓDIGO GENÉTICO

Los ácidos nucleicos y las proteínas de la célula interactúan en la formación de proteínas nuevas, que forman la estructura y realizan las funciones celulares. La primera etapa en la síntesis proteica es la "reescritura", o transcripción, del mensaje genético de modo que pueda ser transportado al ribosoma. El mensaje, que está codificado por el DNA, se transcribe en la forma de una molécula de RNA, que se denomina (con acierto)

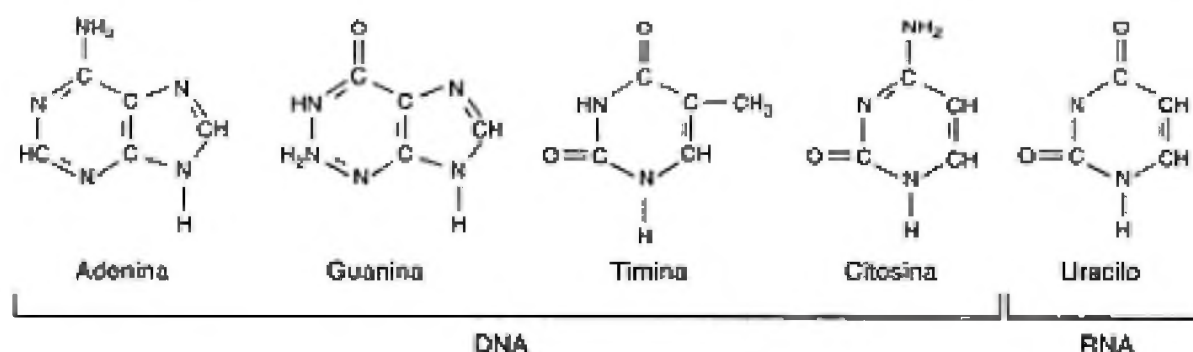


Figura 4-2 Bases nucleotídicas de DNA y RNA. Las cuatro bases nucleotídicas presentes en el DNA son adenina (A) y guanina (G), y ambas son purinas; y timina (T) y citosina (C), que son pirimidinas. Uracilo (U) está presente en el RNA en lugar de timina.

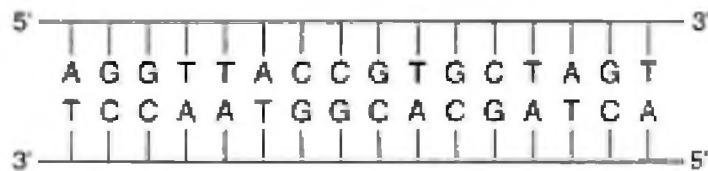


Figura 4-3 Dibujo simplificado del DNA. La compleja estructura del DNA se representa simplificada como una estructura similar a una escalera, en la que los peldaños están representados como las bases de nucleótidos complementarios. Esto se simplifica más aún y sólo la hebra superior de DNA se representa en una dirección 5' a 3' y la presencia de la hebra complementaria se da por sobreentendida.

RNA mensajero (mRNA). Esto sucede de modo similar a la síntesis del DNA, pero utiliza un grupo diferente de enzimas. La hebra del DNA se desenrolla y se crea una molécula de RNA monocatenaria que es complementaria con los genes que se han transcrito. Esto puede sufrir un proceso adicional o no (procesamiento transcripcional), según el tipo de célula en la que ocurre. Luego, el mensaje se lee o el código genético se traduce por la maquinaria celular. Este proceso involucra otros tipos de moléculas de RNA, como tRNA, rRNA y diversas proteínas. La traducción del mensaje en una proteína sucede en una superestructura complicada compuesta por proteínas y rRNA denominada ribosoma. El mRNA se asocia con el ribosoma y se procesan tres bases al mismo tiempo. Estos segmentos de tres pares de bases se llaman codones y codifican un aminoácido particular. Los codones del mRNA son complementarios de los anticodones de una porción del tRNA. Los tRNA particulares transportan o transfieren aminoácidos particulares al ribosoma, el sitio de la síntesis proteica. Las moléculas de aminoácidos se sitúan de modo que los enlaces peptídicos puedan formarse mediante la acción de enzimas entre ellos. Por último, se forma una cadena de aminoácidos (un péptido), que a través de su extensión continuada, el plegamiento de la estructura secundaria y las modificaciones postraduccionales, se vuelve una proteína (fig. 4-6). El lector interesado en obtener un conocimiento acabado de estos procesos deberá recurrir a textos de bioquímica y biología molecular.^{5,131}

Métodos de amplificación de señales

Los métodos de amplificación de señales descritos combinan algunos tipos de ácidos nucleicos, por lo general una sonda, con la generación de una señal. La señal suele amplificarse

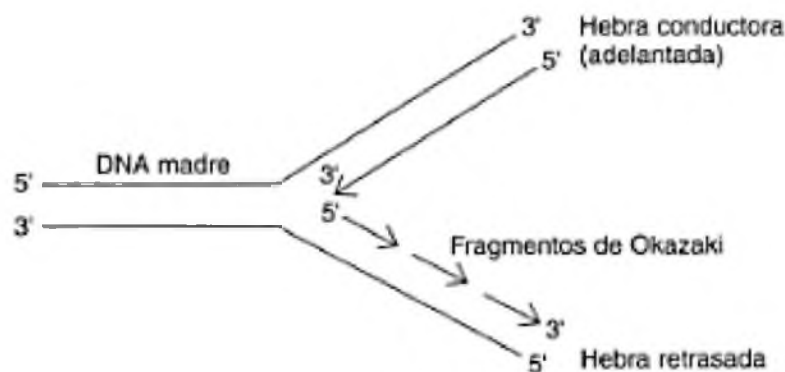


Figura 4-4 Replicación del DNA. La replicación del DNA se desarrolla en la dirección 5' a 3'. Por lo tanto, una hebra, la hebra conductora (adelantada), se sintetiza continuamente, mientras que la opuesta (hebra retrasada) se sintetiza en segmentos denominados fragmentos de Okazaki.

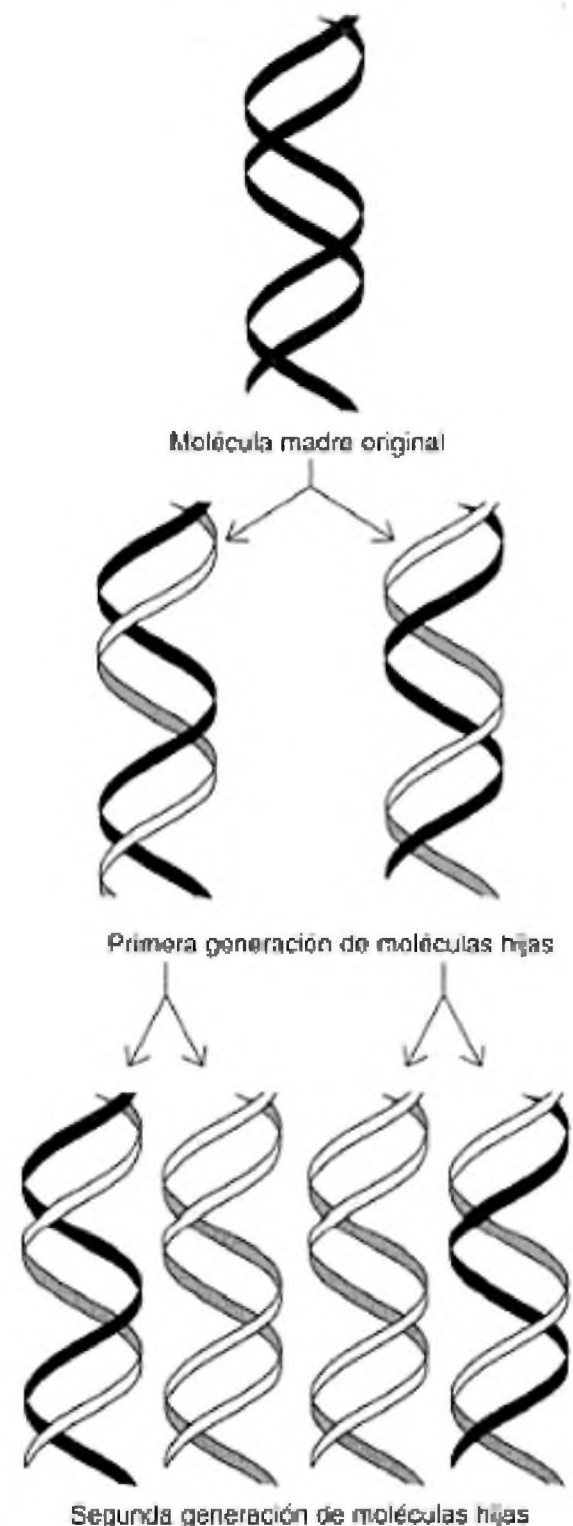
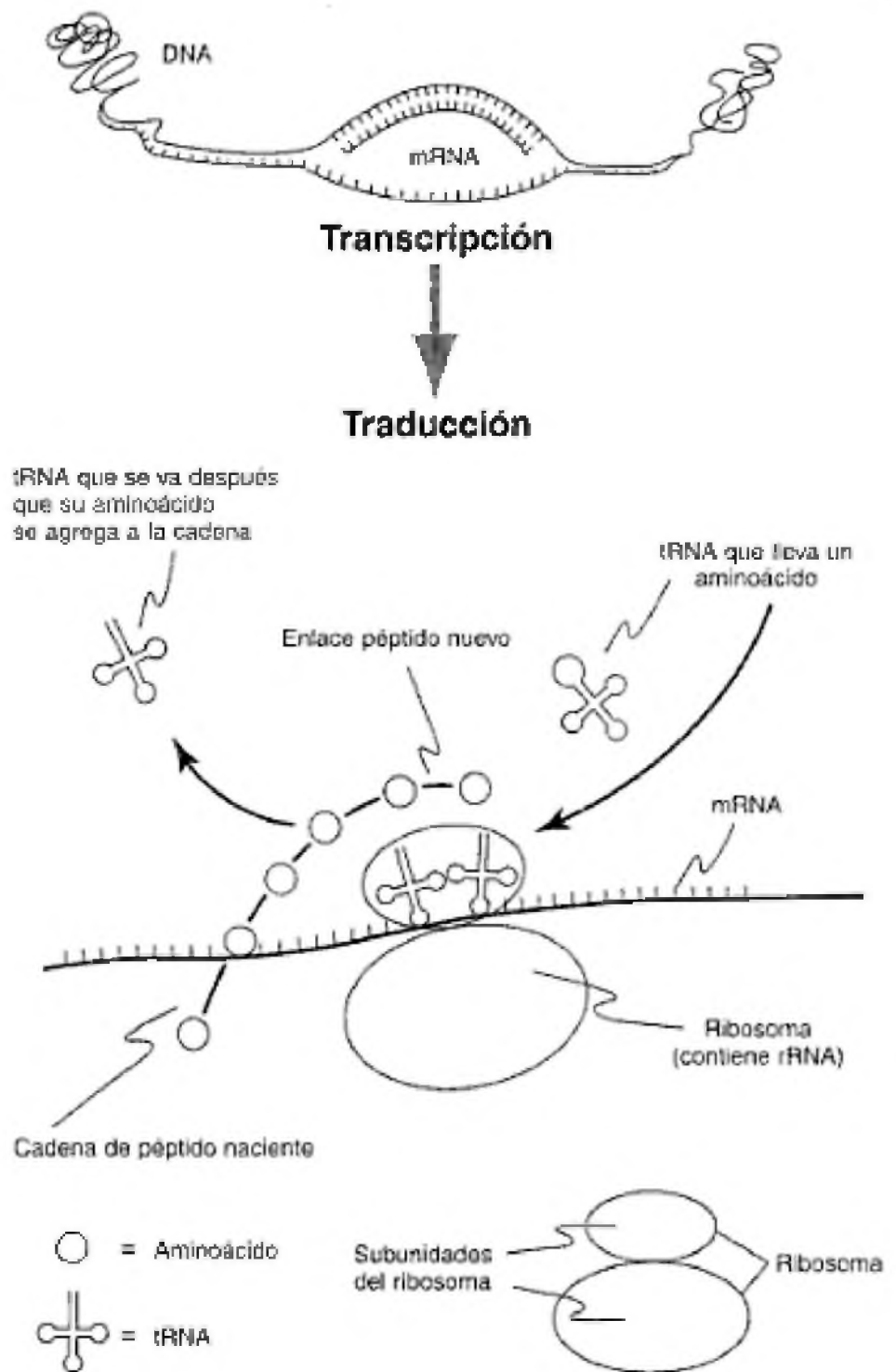


Figura 4-5 Productos de replicación del DNA. Cada una de las moléculas hijas de DNA de la primera generación contiene una hebra de la molécula madre y una hebra recién sintetizada. Dos de las moléculas hijas de la segunda generación de replicación de DNA contienen una de las hebras originales y dos se componen por completo de hebras de DNA recién sintetizadas.

mediante una reacción enzimática. Sin embargo, la señal de hibridación in situ de fluorescencia (FISH) puede observarse directamente después de la hibridación de la sonda marcada con fluorescencia con su ácido nucleico diana complementario. Se pueden aplicar diversas modificaciones químicas y enzimáticas a la FISH o a la hibridación in situ cromogénica si se requiere una amplificación posterior de la señal, pero su explicación está fuera del alcance de este libro. En esta sección, trataremos cuatro tipos de amplificación de señal: sonda de ácido

Figura 4-6 Esquema de la transcripción y de la traducción. En la representación más básica, el mensaje genético en el DNA se reescribe o transcribe (transcripción) en el RNA mensajero (mRNA), que se usa como el sustrato para la traducción (la formación de proteínas a partir del código genético).



nucleico, captura de híbrido, DNA de cadena ramificada e hibridación in situ.

Se considera que la amplificación de la señal es menos sensible que los métodos de amplificación de ácidos nucleicos. Una excepción podría ser la FISH, en la cual puede identificarse una única copia de una molécula diana en una gran población de otras células. Esta aplicación de la FISH es muy útil en muestras de anatomía patológica o en investigación, en las cuales una subpoblación menor de células puede tener importancia clínica. Las técnicas de amplificación de señales tienen varias ventajas sobre los métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En comparación con estos métodos tradicionales, es mucho menos probable que las técnicas de amplificación de señales den resultados falsos positivos por contaminación. Sin embargo, se ha informado la contaminación de la señal o el derrame de una señal fuerte desde una cámara de reacción hacia una adyacente.

Sondas de ácidos nucleicos

Las sondas de ácidos nucleicos fueron los primeros ensayos que pasaron a ser comunes en muchos laboratorios. Las sondas, llamadas AccuProbes®, están disponibles en el mercado para la detección de numerosos microorganismos a partir de GenProbe® (San Diego, CA). Éstas son sondas de DNA que contienen una marca quimioluminiscente y que tienen como blanco el rRNA del microorganismo de interés, que es un objetivo útil porque el rRNA está presente en mayor cantidad que los genes rDNA que lo codifican. Esto es un ejemplo de amplificación biológica o de amplificación de un ácido nucleico que sucede durante el curso normal de los eventos celulares o secundario al crecimiento del microorganismo. Esta propiedad química es útil para diferenciar la sonda hibridada de la no hibridada. Cuando el híbrido DNA-RNA estable se trata con los reactivos de detección provistos, se produce la luz secundu-

ria a una reacción química. La presencia de una cierta cantidad de luz que excede un valor umbral predeterminado se considera una reacción positiva e indica la presencia del microorganismo para el cual se diseñó la sonda para hibridar.

APLICACIONES CLÍNICAS

Las sondas genéticas AccuProbe® están disponibles para la detección directa de bacterias en muestras clínicas o como un método rápido y específico de identificación de microorganismos en cultivo. Los productos disponibles para la detección directa de bacterias en muestras clínicas son los productos PACE (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA) para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, y una prueba para la detección directa de *Streptococcus* del grupo A. En el momento de su introducción, los productos PACE representaron un avance significativo en sensibilidad comparados con los cultivos de estos patógenos con requerimientos nutricionales especiales.^{45,116} Sin embargo, estos productos son algo menos sensibles que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos con las cuales ahora deben competir.^{39,116,124} El ensayo de *Streptococcus* el grupo A es una prueba fácil de usar que tiene casi la misma sensibilidad y especificidad que el cultivo. Aunque el producto puede ser más costoso que los materiales necesarios para el cultivo, el ahorro en el trabajo manual requerido para las pruebas de subcultivo y confirmación, como la aglutinación de látex, hace de la prueba directa para *Streptococcus* del grupo A (Gen-Probe) una opción atractiva.¹⁸

Hoy en día, las sondas genéticas parecen una opción útil para la identificación rápida de una variedad de microorganismos en cultivo, muchos de los cuales requerirían pruebas complicadas y cuya confirmación lleva mucho tiempo. Las más útiles de ellas en muchos laboratorios han sido las de identificación rápida para micobacterias y el hongo dimorfo. Se encuentran en el mercado las sondas genéticas para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. goodii* y del complejo *M. avium-intracellulare*.^{12,112,234} También se dispone de sondas genéticas para *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis*.^{128,151} El uso de estas sondas para la caracterización de cultivos que contienen micobacterias u hongos sospechosos de ser dimorfos disminuye significativamente el tiempo insumido para la identificación en el laboratorio clínico cuando se compara con los métodos tradicionales. A pesar de que son más caros, estos métodos pueden ahorrar dinero al laboratorio si se considera el costo de los materiales más la mano de obra.

También se cuenta con una variedad de AccuProbes para la identificación de ciertas bacterias en cultivo. Éstos incluyen pruebas para *Campylobacter*, *Streptococcus* del grupo A y del grupo B, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, y *N. gonorrhoeae*.⁴⁰ Cuando se realizan a partir de cultivos, estas pruebas tienen una sensibilidad y una especificidad entre el 90% y el 100%. La ventaja de usar estos ensayos es el ahorro de tiempo; su desventaja es el costo mayor.

Captura de híbridos

La captura de híbridos (Digene, Gaithersburg, MD) es una técnica de amplificación de señales que consiste de la retención (captura) de un complejo molecular DNA-RNA (un híbrido) en un tubo o placa de microtitulación (fig. 4-7). Primero se procesa la muestra para preparar el DNA. Las sondas de RNA usadas son complementarias a la molécula de DNA del microor-

ganismo en estudio. La detección de un complejo híbrido DNA-RNA es útil, porque este complejo existe sólo de modo transitorio en la naturaleza, en el principio de la transcripción. Si el complejo no está presente, la muestra se considera negativa. El híbrido DNA-RNA, si está presente, se introduce en un tubo o en el fondo de una placa, cuyas paredes han sido recubiertas con un anticuerpo monoclonal que reconoce un híbrido DNA-RNA. Este anticuerpo captura e inmoviliza el complejo de modo que los otros constituyentes de la muestra clínica procesada pueden eliminarse por lavado. Luego, se agrega otro anticuerpo que también reconoce al complejo DNA-RNA, pero este anticuerpo está marcado con una molécula capaz de generar una señal en forma de luz. Se considera una reacción positiva cuando la luz supera un cierto umbral.

APLICACIONES CLÍNICAS

Existen ensayos de captura de híbridos (HC) disponibles en el mercado para la detección de los subtipos del virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, y citomegalovirus (CMV). La prueba para HPV de alto riesgo se ha convertido en un ensayo suplementario importante para las mujeres con diagnóstico citológico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Un metaanálisis demostró que la prueba HCII tenía una sensibilidad mayor y una especificidad equivalente en comparación con el Papanicolaou repetido para la detección de neoplasia intraepitelial cervical de tipo 2 (NIC-CIN 2) o más grave, cuyo Papanicolaou inicial fue interpretado como ASCUS.⁷ Además, fue incorporado a las recomendaciones del American College of Obstetricians and Gynecologists como un auxiliar para el cribado citológico en mujeres mayores de 30 años.³ La solidez de este ensayo surge de su elevada sensibilidad y alto valor predictivo negativo.¹⁴⁹ Algunos lo han encontrado comparable con la PCR; sin embargo, otros lo consideran un poco menos sensible.^{35,46} Aunque éste es un ensayo extremadamente útil, se ha cuestionado tanto su sensibilidad como su especificidad.^{65,217} De Cremoux y cols. mostraron que algunas de las reacciones falsas positivas con este ensayo se debieron a reacciones cruzadas de sondas con subtipos HPV de bajo riesgo, mientras que otros autores lo explican como "contaminación de señal" o derrame de señal fluorescente desde pozos fuertemente positivos a un pozo adyacente que contenía muestras negativas.⁴³ Resta por determinar el papel que tendrán la detección molecular y la clasificación del HPV en los exámenes periódicos para mejorar la detección de displasia y carcinoma en las mujeres. No obstante, según parece, las pruebas para el HPV seguirán vigentes.

La captura de híbrido también se usó con éxito para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.^{61,62,127,246,250} Se informó que este ensayo es más sensible que el cultivo, lo que no resulta sorprendente dada la naturaleza de requerimientos especiales de esos patógenos, y más sensible que los análisis de sondas genéticas.⁶² Todavía no se ha realizado una comparación rigurosa entre la captura de híbrido para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* y los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos.

La técnica de captura de híbridos puede también utilizarse para detectar CMV y HBV en la sangre. La prueba HBV es un ensayo cualitativo, mientras que la de captura de híbridos para CMV es cuantitativa.³⁴⁹ La cantidad de señal generada en el ensayo es proporcional a la cantidad de virus presente. Se puede calcular la carga viral cuando los datos generados se usan junto con los estándares cuantitativos provistos por el

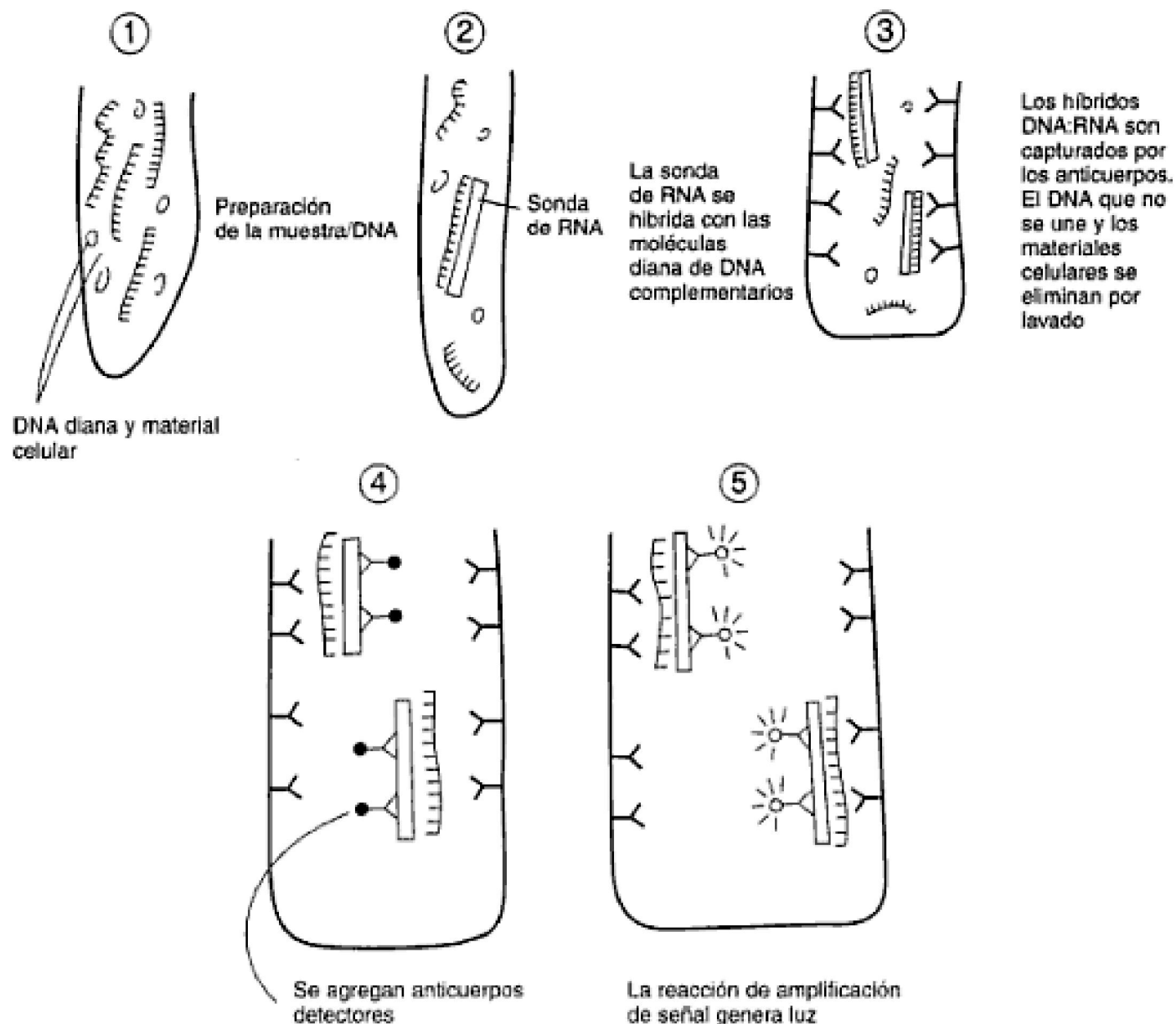


Figura 4-7 Técnica de captura de híbridos. La captura de híbridos es una prueba de amplificación de señales. Su uso se ha generalizado para detectar subtipos de HPV de alto riesgo y para determinar la carga viral de CMV en la sangre.

fabricante. La carga viral de CMV, calculada por este u otros métodos, ha sido útil para el control de pacientes que recibieron trasplante de órganos y de células madre (médula ósea).^{247,367} Cuando se la compara con la PCR, la técnica de captura de híbrido es 1,5–2,0 log menos sensible; la especificidad de la PCR y la de la captura de híbrido fueron del 100% y del 93,8% respectivamente.³²

DNA ramificado

La técnica del DNA ramificado se usa para la detección y cuantificación de patógenos, como HIV, HBV y HCV. Esta técnica se compone de diversas sondas de DNA ramificado (bDNA) y moléculas indicadoras de amplificación de señal. Las sondas de oligonucleótidos bDNA específicas para el organismo se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana y este complejo se captura en un sustrato sólido. Se agregan moléculas indicadoras de oligonucleótidos DNA ramificados, que se conjugan a enzimas indicadoras. Éstas, a su vez, generan una señal quimioluminiscente después del agregado del sustrato apropiado. La intensidad de la señal, como en el caso del ensayo de captura de híbrido, es proporcional a la cantidad

de ácido nucleico diana, lo que significa que los resultados cuantitativos pueden producirse cuando este ensayo se realiza con estándares cuantitativos.^{301,348}

APLICACIONES CLÍNICAS

A pesar de que es una técnica muy útil y reproducible, todavía no se ha desarrollado un gran número de ensayos clínicos que la utilicen. Se ha utilizado con buenos resultados para la detección y cuantificación de HIV, HBV y HCV.^{42,81,255,375} Se ha convertido en el estándar de vigilancia para controlar monitorear las cargas virales de pacientes infectados con HIV. Se encontró que el VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) es un ensayo altamente reproducible con un rango lineal amplio (75–500 copias de HIV-1 RNA) que es útil para la medición cuantitativa de la carga viral de HIV-1, incluso cuando se lo compara con la PCR-transcriptasa inversa.^{80,110} De modo similar, las evaluaciones multicéntricas de los ensayos VERSANT Hepatitis B DNA 3.0 y VERSANT HCV RNA 3.0 encontraron que estas pruebas y esta tecnología eran reproducibles, tenían un rango dinámico amplio y demostraron resultados comparables con otras pruebas comúnmente usa-

das.^{79,235,271} Aunque la sensibilidad de las pruebas de bDNA puede ser un poco menor que la de la PCR, existe una buena correlación entre las cargas virales generadas por estos ensayos diferentes.^{59,231}

Hibridación in situ

Durante muchos años se utilizó la hibridación in situ en la patología molecular para detectar translocaciones cromosómicas (p. ej., t(9;22) y amplificaciones génicas (p. ej., *Her2/neu*) y para la identificación de agentes infecciosos.²¹² Estos métodos, en otro tiempo complejos, son cada vez más fáciles de usar y se dispone de plataformas semiautomatizadas. La hibridación in situ está separada en hibridación in situ fluorescente (FISH), en la que la sonda de oligonucleótido está marcada con un fluoróforo que se detecta mediante el microscopio de fluorescencia directa, e hibridación in situ cromogénica (CISH), en la que la sonda de oligonucleótido está marcada de tal forma que una reacción enzimática genera un color que puede visualizarse con un microscopio de luz tradicional. Varios estudios recientes han demostrado la factibilidad y las posibles ventajas de los ensayos in situ en el laboratorio de microbiología clínica.^{148,158,170,238,240,285}

Algunos de los primeros ensayos de hibridación in situ se usaron para la detección de virus mediante la hibridación directa de una sonda de oligonucleótido y los ácidos nucleicos virales. Éstos se utilizaron para confirmar la identidad de un virus particular asociado con cierto efecto citológico (p. ej., CMV como causa de una inclusión intranuclear tipo A de Cowdry), así como para diferenciar virus que producen efectos citopáticos directos (p. ej., HSV y VZV).²⁶ Esta técnica también puede utilizarse para diferenciar los subtipos de HPV de alto riesgo y de bajo riesgo.²²²

También se ha demostrado que la hibridación in situ es una técnica útil para establecer la presencia de ciertos virus en algunas neoplasias, como el HPV en las displasias o carcinomas epiteliales de cuello uterino, o el virus de Epstein-Barr (EBV) en los trastornos linfoproliferativos postrasplante y en el linfoma de Burkitt, y el herpes virus humano 8 (HHV-8) en el sarcoma de Kaposi.^{123,252,36,193} La observación directa de las células infectadas con virus en el foco de la patología ayuda a confirmar el papel etiológico del microorganismo detectado con la enfermedad. Aunque la detección de virus mediante la hibridación in situ ha sido de gran utilidad en el laboratorio de patología molecular, el uso de estas técnicas no es común en los laboratorios de virología clínica.

La hibridación in situ también puede usarse para la detección de bacterias, micobacterias, hongos y parásitos. En tales casos, el rRNA microbiano puede usarse como sitio diana de la sonda de hibridación. Esto puede ser más ventajoso que una DNA diana por dos razones. Primero, hay muchas más copias de rRNA en la célula que copias de genes codificados por los ribosomas (rDNA), lo que aumenta la sensibilidad del ensayo. Segundo, la presencia de rRNA señala la presencia de un organismo viable, ya que la detección del DNA, en particular por métodos como la PCR, puede hacerse incluso después que el organismo no es viable (p. ej., microorganismos muertos por tratamientos antimicrobianos).

Antes de la introducción relativamente reciente de la FISH en el laboratorio de microbiología clínica, estas técnicas fueron usadas por microbiólogos del medioambiente para identificar y contar *Legionella*, *E. coli* y otras bacterias en muestras de agua y biopelículas,^{208,210,264} así como por microbiólogos veterinarios para estudiar diversas enfermedades.^{184,299} En histopatología

molecular se usó la hibridación in situ para investigar *Helicobacter pylori* en las biopsias gástricas, *Chlamydia* en una variedad de estados de enfermedad y *Legionella pneumophila* en preparados fijados de muestras respiratorias.^{16,34,159,124,21,306}

El objeto de algunas pruebas ha sido lograr una rápida caracterización de micobacterias tuberculosas o no tuberculosas. Las micobacterias son candidatas excelentes para su identificación por métodos moleculares, porque algunas de ellas causan enfermedades graves y son de crecimiento lento en los cultivos (*M. tuberculosis*), y algunas tienen requerimientos nutricionales especiales (*M. genevensis* y *M. haemophilum*) o no se desarrollan en medios artificiales (*M. leprae*). La FISH que utiliza sondas híbridas de ácidos nucleicos-péptidos se usó con buenos resultados para la identificación rápida de *M. tuberculosis* en frotis de cultivos micobacterianos y directamente en muestras respiratorias que contienen bacilos ácido-alcohol resistentes.^{244,330,331} También se usaron aplicaciones in situ tradicionales en secciones histológicas para identificar en forma definitiva *M. leprae*.⁸

También los hongos y los parásitos fueron caracterizados por medio de hibridación in situ. Se describieron ensayos para la identificación de especies de *Aspergillus*, cuya importancia está dada por la creciente notoriedad de mohos tabicados hialinos no *Aspergillus*, como *Fusarium* y *Pseudallescheria*, que son patógenos para los seres humanos y tienen perfiles de sensibilidad antifúngicos diferentes de los de la mayoría de las especies *Aspergillus*.^{135,248,310} Éstos son especialmente importantes cuando el material cortado no fue sometido para cultivo o si fracasa el crecimiento del moho en el cultivo. La hibridación cromogénica in situ, que utiliza el método de amplificación de señal de la tiramida, también se aplicó para el diagnóstico diferencial histológicamente dificultoso entre levaduras y formas similares a levaduras en tejidos humanos.¹⁴¹ Estos métodos fueron menos sensibles que la tinción de metenamina de plata para la detección de algunos de los hongos, pero demostraron el 100% de especificidad con identificación específica de especies.¹⁴¹ Otro hongo que se ha estudiado usando hibridación in situ es *Pneumocystis jirovecii*.¹⁴⁰ El uso de esta técnica para la detección de estos hongos pueden tener algunas ventajas, porque se pueden detectar tanto la forma quística como trofozoito, en vez de sólo la forma quística, que es lo que sucede con algunas tinciones histoquímicas, como la tinción de metenamina de plata de Gomori (GMS).

APLICACIONES CLÍNICAS

La mayoría de los trabajos respecto del uso de hibridación in situ para la detección de microorganismos en muestras clínicas fueron realizados en laboratorios de patología molecular, a menudo en muestras fijadas incluidas en parafina. Sin embargo, esta técnica es promisoría por las expectativas que despierta por su utilización habitual en el laboratorio de microbiología clínica. Jansen y cols.¹⁵⁴ y Kempf y cols. publicaron simultáneamente artículos que investigan el uso de la hibridación in situ para la identificación rápida de microorganismos presentes en frascos de hemocultivos positivos. Se usó una variedad de sondas, todas ellas dirigidas contra secuencias específicas presentes de rRNA bacteriano. Algunas sondas reconocen géneros y familias (es decir, todos los estafilococos o todas las enterobacterias respectivamente), mientras que otras fueron específicas para especies particulares (*Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*). La mayoría de estas sondas fueron extremadamente precisas para la identificación bacteriana en los hemocultivos positivos. Una característica atractiva de estos ensayos

fue que la elección de las sondas de hibridación in situ a utilizar puede hacerse sobre la base de los hallazgos de la tinción de Gram. Otra característica importante fue el tiempo requerido para la detección, que pudo ser de sólo 2-3 horas. Kempf y cols. compararon el tiempo insumido por la identificación con la hibridación in situ respecto de los métodos tradicionales; para ello estudiaron 115 hemocultivos positivos. Encontraron un ahorro de tiempo aproximado de 26 horas para la identificación de estafilococos (62 de 62 identificados por hibridación in situ [ISH]), 46 horas para estreptococos (19 de 20 identificados por ISH) y 40 horas para bacilos gramnegativos (28 de 30 identificados por ISH).¹⁷⁰ Concluyeron que con un número limitado de sondas para hibridación in situ se podría identificar la causa del 96,5% de los hemocultivos positivos dentro de las 2,5 horas, mientras que el cultivo convencional tomaba entre uno y 3 días.¹⁷⁰

La hibridación in situ también se usó para la detección directa de bacterias patógenas a partir de muestras clínicas. Hogardt y cols. la utilizaron para detectar e identificar las bacterias comúnmente presentes en las secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística.¹⁴⁶ Realizaron pruebas para *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* usando hibridación in situ. Estos ensayos realizados directamente sobre muestras clínicas demostraron 90% de sensibilidad y 100% de especificidad comparados con los cultivos, incluso en el medioambiente complejo de las secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística.¹⁴⁶ Es imaginable que una batería de sondas de hibridación in situ pueda ser útil para la detección de patógenos que están por lo común asociados con enfermedades particulares, como meningitis bacteriana y neumonía adquirida en la comunidad.

Se ha desarrollado y está disponible en el mercado otro método de ISH, que usa una sonda híbrida de ácidos nucleicos-péptidos (PNA) en lugar de una sonda de DNA. Las sondas de ácidos nucleicos-péptidos tienen propiedades que pueden ser más ventajosas que las sondas de DNA con respecto a la penetración, cuando la hibridación se realiza sobre microorganismos intactos, y para una diferenciación mayor, en particular de polimorfismos de nucleótidos simples.¹⁷⁰ AdvanDx (Woburn, MA) es un proveedor de los equipos PNA ISH para la detección rápida de *S. aureus*, *Candida albicans* y *E. faecalis*. Varios estudios han analizado estas pruebas y se las encontró útiles para diferenciar *S. aureus* de estafilococos coagulasa negativos en frascos de hemocultivos positivos que contienen cocos grampositivos en racimos en la tinción de Gram.^{10,239,240}

La hibridación in situ también ha resultado útil para la identificación rápida y la diferenciación de levaduras clínicamente importantes en cultivos de sangre positivos. Kempf y cols. diferenciaron *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* usando cuatro sondas ISH.¹⁷⁰ De modo similar, se utilizó el ensayo FISH PNA para *Candida albicans* (AdvanDx) para diferenciar *C. albicans* de levaduras no *C. albicans* en cultivos de sangre positivos^{241,285} (fig. 4-8). Es importante la diferenciación rápida y precisa de levaduras, porque es muy probable que algunas especies no *Candida albicans*, como *C. glabrata* y *C. krusei*, sean resistentes al fluconazol, un fármaco habitual en el tratamiento de las infecciones por *C. albicans*.⁵⁴³

La hibridación in situ con PNA y la tradicional también se han usado para la diferenciación rápida de micobacterias. El interés en la identificación de estos microorganismos mediante métodos moleculares es indudable porque los miembros de este grupo causan enfermedades graves (*M. tuberculosis*), muchos de ellos son de crecimiento lento y, al menos uno, *M.*



Figura 4-8 FISH PNA para *Candida albicans*. La levadura y la pseudohifa (flechas) muestran fluorescencia verde manzana y se detectan con facilidad contra el fondo rojo que usa el FISH PNA para *Candida albicans* (AdvanDx).

leprae, no crece en medios artificiales. La hibridación in situ se utilizó para diferenciar *M. tuberculosis* de micobacterias no tuberculosas en cultivos con desarrollo positivo, así como en forma directa en frotis positivos para la tinción ácido-alcohol resistente y en secciones histológicas.^{111,179} La confirmación de *M. leprae* en cortes histológicos también se ha logrado con hibridación in situ.⁸

Aunque se describieron algunos usos de la hibridación in situ para el estudio de parásitos y de enfermedades parasitarias, su aplicación es todavía limitada.^{156,251,246,381} Su uso en el laboratorio de parasitología clínica es aun más restringido. Se la utilizó para la detección de la microsporidia más común, *Enterocytozoon bienersi*, que causa gastroenteritis en pacientes con SIDA.³⁵⁶ La FISH con ácidos nucleicos-péptidos se usó para detectar tripanosomas circulantes en pacientes con enfermedad del sueño africana.²⁷⁵

La hibridación in situ es una herramienta de diagnóstico molecular nueva para la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Según la disponibilidad de los productos comerciales, esta tecnología podría influir en la manera de practicar la microbiología clínica. El escaso tiempo para la detección y la capacidad de seleccionar sondas para usar de acuerdo con los datos de la tinción de Gram o con las características de la población de pacientes en estudio la hacen atractiva como instrumento diagnóstico.

Amplificación de ácidos nucleicos

Bases de la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, descrita por Kary Mullis en 1983, aplica la bioquímica básica de la replicación del DNA con el objetivo de amplificar una porción particular de DNA.^{232,233} La porción de DNA que se amplifica por lo general contiene información útil desde el punto de vista diagnóstico. La mezcla de PCR consta del DNA diana para la amplificación y la mezcla maestra. Ésta, a su vez, se compone de cebadores de oligonucleótidos de DNA, los cuatro nucleótidos trifosfatos, DNA polimerasa termoestable, cloruro de mag-

neso y agua o una solución reguladora. La reacción en cadena de la polimerasa consiste en tres fases repetitivas, lo que constituye la base de la porción "reacción en cadena" del nombre. Estas tres fases son: 1) desnaturalización del DNA (o la separación de las dos hebras de DNA), 2) hibridación del cebador y 3) extensión del cebador (la porción de la reacción donde sucede la síntesis de DNA).

La desnaturalización de la molécula de DNA molde o la separación de las dos hebras individuales que componen la molécula de DNA bicatenaria madre es la primera etapa de la PCR. Esto se acompaña por la elevación de la temperatura de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 95 °C. A esa temperatura, el DNA bicatenario se separa en dos hebras simples. Esto sucede porque la energía térmica rompe los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de DNA juntas a temperaturas más bajas. Se prefiere la desnaturalización térmica de DNA a la desnaturalización química porque es fácilmente reversible por enfriamiento.

La próxima etapa de la PCR, la hibridación del cebador, comienza cuando la mezcla de reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos, que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde. Los oligonucleótidos cebadores son frag-

mentos cortos de DNA, por lo común de entre 12 y 20 nucleótidos de largo, necesarios para iniciar o cebar la reacción de síntesis de DNA. Un cebador tiene el mismo sentido que la hebra superior de DNA y se denomina cebador directo (*forward*), como se señala (fig. 4-9), mientras que el otro es del mismo sentido que la hebra opuesta de DNA y se llama cebador inverso. Los cebadores se hibridan con la diana mediante el tradicional apareamiento de bases de Watson y Crick; así, la temperatura de hibridación del cebador podría ser menor o igual a la T_M , o temperatura de fusión, de los cebadores usados; en la práctica, la T_M es la temperatura a la cual se hibridan los cebadores.

Cuando se elige un grupo de cebadores, se deben considerar diversos factores técnicos, muchos de los cuales están ahora incluidos en los programas informáticos de diseño de cebadores. De estos factores se ocupan los científicos industriales, mientras que los usuarios adquieren en el comercio los equipos para la PCR. La mayoría de los detalles del diseño del cebador exceden el propósito de este libro; sin embargo, algunos puntos merecen una mención especial. Si se desea un producto de amplificación de DNA simple, también conocido como amplicón, los cebadores deberían elegirse para hibridar con una región simple de la molécula de DNA de interés. Es

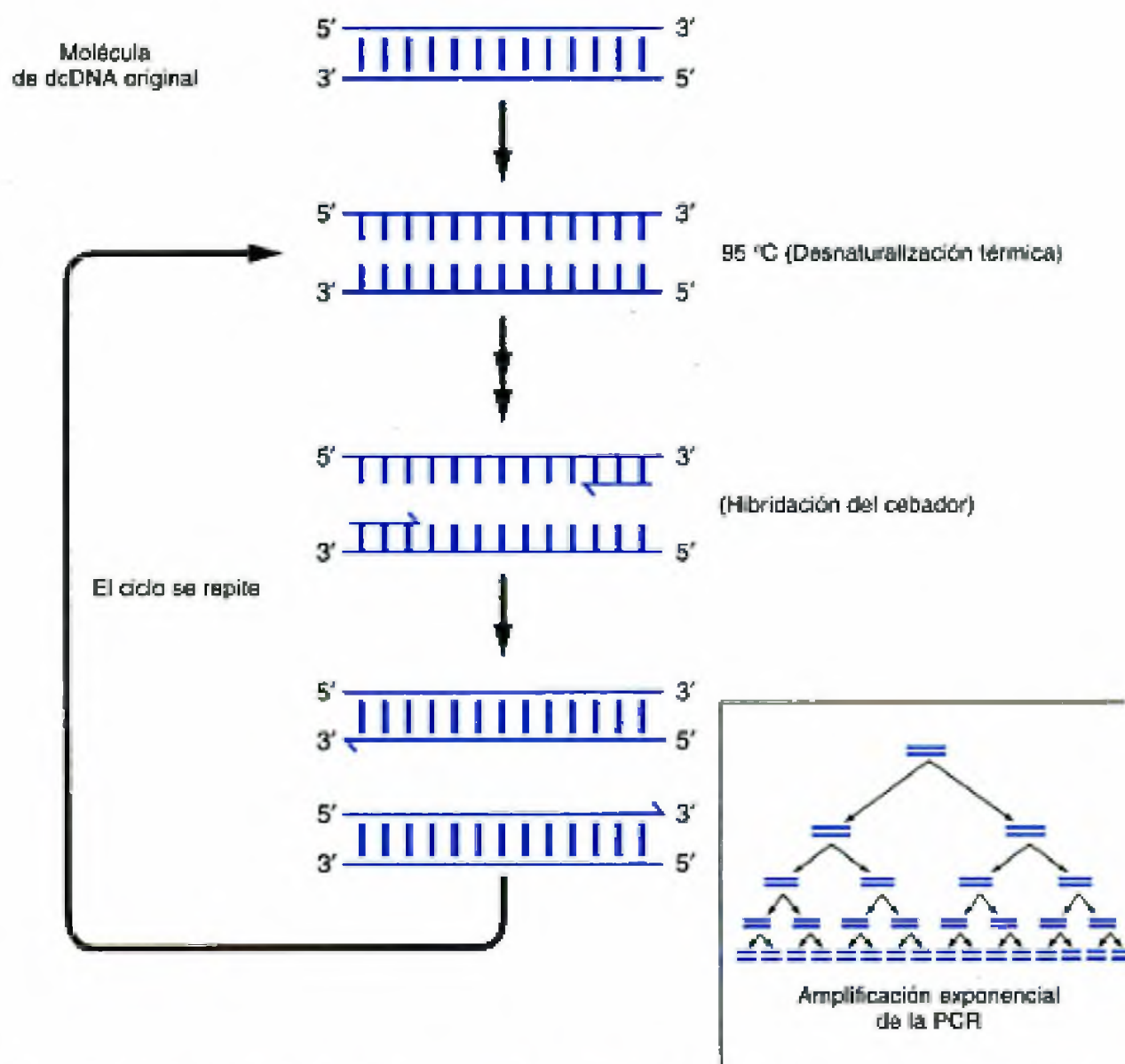


Figura 4-9 Reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa es un ciclo repetitivo de desnaturalización térmica, hibridación y extensión de los cebadores a través de la acción de la DNA polimerasa (aquí no se muestra). La reacción deriva en la producción exponencial de moléculas nuevas de DNA, el principio y el final de las cuales se determinan por las posiciones de los directos e inversos.

importante que los cebadores no hibriden con otras áreas de la molécula del mismo organismo o con el DNA de otras especies que puedan estar presentes en la preparación de la muestra. Por ejemplo, si el microbiólogo molecular está intentando detectar *Legionella pneumophila* en muestras clínicas, debería elegir una región única para este microorganismo que no esté presente en el genoma humano. Esto se ha logrado con éxito mediante la señalización del gen potenciador de infectividad del macrófago (*mip*), que contiene regiones únicas suficientes para diferenciar *L. pneumophila* de otras bacterias, y no es un constituyente del genoma humano.^{284,270} La reactividad cruzada con el genoma humano podría consumir de modo no específico los cebadores y las bases de los nucleótidos trifosfatos en la mezcla de reacción, y podría derivar, en el peor de los casos, en una PCR falsa positiva, según el sistema de detección usado.

La presencia de los productos de la amplificación por PCR suele determinarse por el examen de los productos obtenidos por electroforesis en gel y teñidos con bromuro de etilo. La presencia de una banda única en el gel es una buena evidencia preliminar de la especificidad de la reacción. La presencia de bandas múltiples sugiere que los cebadores no son específicos o que las condiciones rigurosas de la reacción no son óptimas (fig. 4-10). En algunos casos, la especificidad puede mejorarse con un cambio en las condiciones de la reacción, como la concentración salina o la temperatura de fijación del cebador. Lo más fácil de cambiar es la temperatura de hibridación del cebador. La especificidad de la unión de los cebadores a la molécula de DNA diana aumentará conforme la temperatura de hibridación usada se aproxime a la T_m de los cebadores, una condición más exigente.

La síntesis de una hebra nueva de DNA complementaria a la hebra madre de DNA se lleva a cabo por la acción de la DNA polimerasa después de que se completa la hibridación del cebador. El descubrimiento de una DNA polimerasa termoestable facilitó el ciclo de esta reacción en un tubo cerrado, sin necesidad de agregar una enzima nueva después de cada paso de desnaturalización térmica del ácido nucleico. La DNA polimerasa sintetiza la hebra complementaria nueva a una tasa aproximada de 25 pb/segundos. Este dato es importante para determinar cuán larga podría ser por último la fase de extensión, que se basa en la longitud del amplicón. Una vez transcurrido el tiempo necesario para permitir la extensión completa del amplicón, la mezcla de reacción se vuelve a ciclar a 95 °C para otro ciclo de la PCR.

Así, la porción diana de una molécula de DNA se amplifica exponencialmente para formar millones de amplicones. Este incremento exponencial de la región diana del DNA explica la gran sensibilidad de la PCR y la capacidad de las pruebas diagnósticas que usan tales métodos para detectar un muy escaso número de patógenos. Esta sensibilidad extrema explica también el gran cuidado que se debe tener cuando se trabaja con DNA amplificado, porque cada molécula amplificada, si se libera en el medioambiente, podría contaminar una muestra clínica (contaminación con amplicón) y dar lugar a una reacción falsa positiva. Aunque parezca que una única copia del DNA diana debería ser detectable por PCR, existen en la práctica numerosos inhibidores de la PCR en las muestras clínicas que limitan la sensibilidad de estos ensayos. Aun cuando la extracción del ácido nucleico no se trate con detalle aquí, es probable que el proceso de preamplificación de las muestras clínicas, para eliminar de ellas a los inhibidores y prepararlas para la amplificación del ácido nucleico, sea tan importante como la reacción de amplificación en sí misma.

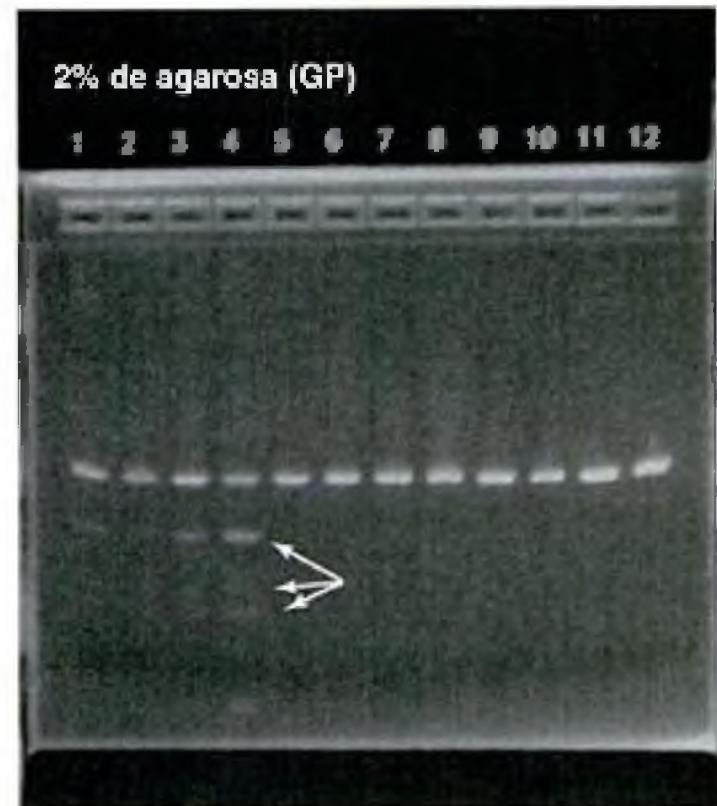


Figura 4-10 Amplificación no específica de ácidos nucleicos. Esta amplificación puede ocurrir durante la reacción en cadena de la polimerasa o de otros ensayos de amplificación de ácidos nucleicos si los cebadores se hibridan con un sitio alternativo o se unen entre sí y forman dímeros de cebador. La amplificación no específica y los dímeros de cebador pueden reducirse mediante un diseño de ensayo cuidadoso y la optimización de las condiciones de reacción. Los carriles 1-5 muestran bandas de amplificación no específica pero son más notorias en el carril 5 (*flecha*).

APLICACIONES CLÍNICAS

La introducción de la PCR en el laboratorio diagnóstico representó un avance significativo en medicina. Las pruebas basadas en PCR les permitió a los laboratoristas detectar microorganismos que no podían ser cultivados, así como los con requerimientos nutricionales especiales o de crecimiento lento. Sin embargo, los primeros métodos para detectar los productos de la PCR fueron laboriosos y consumían bastante tiempo (véase "Análisis de posamplificación", más adelante). Por lo tanto, estos ensayos se reservaban sólo para los patógenos más importantes. La aparición de las plantillas de PCR automatizadas y semiautomatizadas y los métodos cada vez más fáciles y convenientes de detección incrementaron el uso de estas técnicas para una variedad más amplia de patógenos. Casi todos los microorganismos de interés clínico han sido detectados y estudiados por PCR.

Además de la detección, la PCR provee al investigador de una herramienta para examinar la presencia o la ausencia de elementos genéticos particulares dentro de las poblaciones, y, cuando se acopla con la secuenciación de DNA, permite analizar la composición y variabilidad de los genes en estudio. La PCR transcriptasa in-

tar virus RNA y microorganismos y las células.
La FDA, están dispuestas para detectar dos de las bacterias más comunes: *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.^{176,192} Aun con gran sensibilidad, q

sa (véase más adelante) permite detectar la respuesta genética (el mRNA) de los eucariotes a diversos estímulos.
ales, que han recibido la aprobación de la FDA para detectar dos de las bacterias más comunes: *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.^{176,192} Aun con gran sensibilidad, q

son perfectas.¹³² Su especificidad no es del 100%, lo que significa que en una población de baja prevalencia el valor predictivo positivo es subóptimo y pueden ocurrir resultados falsos positivos para los que se recomiendan pruebas confirmatorias.^{30,337,351} Además, la prueba de PCR para *N. gonorrhoeae* disponible en el comercio, tanto como la prueba que usa amplificación con desplazamiento de hebra (véase más adelante) han mostrado tener la capacidad de reacción cruzada con ciertas especies de *Neisseria* no gonocócica, que podría causar una reacción falsa positiva.^{434,460} Las pruebas de PCR aprobadas por la FDA se encuentran en el mercado para la identificación rápida de *M. tuberculosis* en secreciones respiratorias con frotis positivos para bacilo ácido-alcohol resistente.^{98,282} Las modificaciones aprobadas por la FDA que usan PCR de ciclo rápido están disponibles para la detección rápida de *Streptococcus* del grupo B y *S. aureus* resistente a la meticilina (véase "Amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real", más adelante). Los ensayos aprobados por la FDA que usan PCR-RT (véase más abajo) están disponibles para la detección y cuantificación de virus de RNA, como HIV y HCV. Existen otros ensayos aprobados por la FDA y una amplia variedad de reactivos específicos del análisis (ASR) disponibles en el mercado y equipos sólo para uso en investigación (RUO) para el estudio de diversos patógenos humanos.

Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos

Se han ideado varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos, algunos para evitar los pagos de patentes de la PCR. Se encuentran disponibles comercialmente equipos diagnósticos para varios patógenos microbianos. Uno de los primeros que se comercializó, hace poco tiempo, usó la reacción en cadena de la ligasa. Este método fue el primer ensayo de amplificación de ácidos nucleicos que resultó ampliamente usado para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*. Los métodos no PCR que están disponibles en la actualidad en el mercado son el de amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) (bioMérieux, Durham, NC) y la amplificación de la transcripción con fármacos (TMA) (Gen Probe, San Diego, A), que básicamente son la misma técnica y el de amplificación con desplazamiento de hebra (SDA) (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD).

La reacción en cadena de la ligasa en su forma más pura es en realidad una reacción de amplificación de señal que se sustenta en la unión o conexión de dos sondas que se hibridan en contigüidad sobre la hebra de DNA molde. Esta técnica, cuando se combinó con la extensión limitada por DNA polimerasa, fue la base de los productos Abbott (pruebas LCx *Neisseria gonorrhoeae* o LCx *Chlamydia trachomatis*, Abbott Park, IL) para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*. El uso del sistema de dos sondas es necesario para que la ligasa contribuya a su excelente sensibilidad. La desventaja de este ensayo fue la falta de un control interno. No se tratará esta tecnología más adelante debido a su ausencia en el mercado comercial.

Tanto NASBA como TMA son ensayos disponibles en el mercado que constituyen ejemplos de amplificación mediada por transcripción. Estas pruebas isotérmicas usan tres enzimas: transcriptasa inversa (RT), RNasa H y RNA polimerasa dependiente de DNA T7. La enzima RT hace una copia de cDNA de la molécula diana, que por lo general es RNA. El cebador que se usa para crear la hebra del DNA complementario a la molécula de RNA diana contiene la secuencia de unión a la RNA polimerasa T7 sobre el extremo 5' de la molécula. Luego se hidroliza la porción de RNA del híbrido DNA-RNA por la

acción de la RNasa H. Después se une el segundo cebador y crea la hebra complementaria de la molécula de DNA, con lo cual se completa la molécula de cDNA. Esta molécula tiene la secuencia de unión a la RNA polimerasa T7 incorporada y sirve como molde para la RNA polimerasa T7, la cual transcribe numerosas copias de RNA, que pueden detectarse mediante varios métodos.

La amplificación con desplazamiento de hebra es una reacción isotérmica que se basa en la capacidad de la DNA polimerasa para desplazar una hebra de DNA en el sitio de una mella monocatenaria y proceder a la replicación del DNA o amplificación en este ensayo. Esta técnica, aunque eficiente, requiere condiciones especiales y endonucleasas que generen una mella en una sola de las hebras de la molécula de DNA bicatenario, en vez de producir un corte a través de las dos hebras del DNA, que es la forma de acción para la mayoría de las endonucleasas de restricción.

APLICACIONES CLÍNICAS

Se dispone de pruebas comerciales aprobadas por la FDA para la detección de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* que usan TMA y SDA.⁴ Akduman y cols. analizaron más de 3 500 muestras de orina utilizando la prueba BDProbeTec-SDA[®] (BD Bioscience) e informaron una sensibilidad del 99,2%, una especificidad del 99,3%, un valor predictivo positivo del 84,9% y un valor predictivo negativo del 99,9%. Con respecto a los diferentes ensayos de amplificación, estos autores, como otros, recomiendan la necesidad de confirmar los resultados positivos, dado el valor predictivo positivo. La prueba BDProbeTec-SDA[®] tiene un control de amplificación interno, que es útil para identificar reacciones potencialmente falsas negativas secundarias a la inhibición de la amplificación.

La línea de productos APTIMA (Gen-Probe) está aprobada por la FDA, se encuentran en el comercio las pruebas TMA para la detección de *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis*. Gaydos y cols. estudiaron el ensayo APTIMA U (GenProbe) y compararon su sensibilidad y especificidad en muestras de escobillado endocervical con respecto a los estudios de orina.¹⁰⁴ Para *C. trachomatis* encontraron una sensibilidad y especificidad de los escobillados endocervicales del 94,2% y el 97,6% comparadas con una sensibilidad y especificidad de la primera muestra de orina del 94,7% y el 98,9%. Para *N. gonorrhoeae* encontraron una sensibilidad y especificidad de escobillados endocervicales del 99,2% y el 98,7%, y una sensibilidad y especificidad de las muestras de la primera orina del 91,3% y el 99,3%, respectivamente. Las pruebas APTIMA no tienen un control interno para la amplificación, sino que usan un sistema de captura de la diana, con el que, según Gaydos y cols., se elimina virtualmente la inhibición y no se requiere un control interno.

La prueba Nuclisens HIV-1 QT es un ensayo aprobado por la FDA que usa la técnica NASBA para medir las cargas virales de HIV. La prueba Nuclisens CMV pp67 para el control de los niveles de CMV fue retirada del mercado por la FDA. Ésta se comparó con una antigenemia de CMV en un estudio de receptores de trasplante de médula ósea y se encontró que es un sustituto accesible de la prueba de antigenemia, mucho más laboriosa.¹⁰⁸ Se están haciendo ensayos con una prueba basada en NASBA para la detección rápida de enterovirus en líquido cefalorraquídeo (LCR). Se han diseñado diversas pruebas de preparación casera usando la técnica NASBA y el Basic Kit (bioMérieux) que valida estas pruebas y que están disponibles en el comercio. Estas han sido muy útiles para la detección de virus de RNA, como los enterovirus y el virus del Nilo Occi-

dental, pero como en el caso de TMA, NASBA también se usó para detectar bacterias, por señalización directa del rRNA o de otros mRNA específicos.^{11,75,185,198} Landry y cols. la compararon con la RT-PCR para la detección de enterovirus de muestras clínicas y encontraron que la prueba NASBA era un poco más sensible y que tenía un tiempo de ejecución más corto.¹⁸⁶

Modificaciones de la PCR

Se han hecho ciertas modificaciones para estandarizar la PCR, que expandieron el uso de esta técnica ampliando el espectro de microorganismos que pueden detectarse usando estos métodos moleculares.^{82,254,361} Muchas de estas modificaciones están bien estandarizadas y se han incorporado como técnicas habituales en el laboratorio clínico. Entre las modificaciones, las técnicas que se describirán aquí son RT-PCR, PCR de amplio espectro (*broad-range*), PCR múltiple y PCR anidada. La modificación más reciente, la PCR en tiempo real, se detalla en otro apartado.

RT-PCR

Los retrovirus son virus de RNA que, como parte de su ciclo vital, fabrican una copia de DNA de su genoma RNA. Este hecho se cumple por la acción de la enzima transcriptasa inversa (*reverse transcriptase*, RT). El agregado de una etapa RT anterior a la PCR hace posible amplificar y detectar RNA. Esto puede suceder en una reacción tanto de una como de dos etapas. En la reacción RT-PCR de dos etapas se usa una enzima RT separada antes del agregado de la DNA polimerasa, mientras que en la reacción de una sola etapa se usa una única DNA polimerasa termoestable que también tiene actividad RT.²³⁵ El cDNA creado por la transcriptasa inversa puede formarse usando cebadores oligonucleótidos específicos o hexámeros de oligonucleótidos al azar. Luego, se realiza la PCR como ya se describió.

La RT-PCR es muy útil para detectar virus de RNA, pero también puede usarse para detectar otros microorganismos por señalización del RNA ribosómico.^{24,166,376} La detección de mRNA es valiosa para estudiar la expresión genética tanto de los microorganismos como de las células huéspedes humanas. Del mismo modo que con la PCR, se pueden obtener resultados cuantitativos con RT-PCR, y constituyen la base para las pruebas de carga viral para HIV y HCV con esta técnica.²⁹⁹ Otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que amplifican de modo preferencial RNA, como NASBA y TMA, compiten con la RT-PCR.

APLICACIONES CLÍNICAS

Es probable que la detección de virus de RNA haya sido la más importante de las aplicaciones clínicas de la RT-PCR hasta la fecha. Las pruebas cuantitativas de RT-PCR se han convertido en un procedimiento común para la detección de HCV y HIV.^{107,255} La naturaleza cuantitativa de la amplificación de ácido nucleico, cuando se emplea junto con estándares cuantitativos externos, suele usarse para determinar la cantidad de estos virus presentes en la sangre del paciente, lo que se conoce como carga viral. Los datos de la carga viral son importantes para el control de la respuesta del paciente a la terapia. Por ejemplo, un paciente infectado con el HIV debería tener un aumento del recuento de linfocitos T CD4 y una disminución de la carga viral cuando se trata con la terapia antirretroviral adecuada.

La RT-PCR también se usó para la detección de las causas virales de la meningitis y de la meningoencefalitis, como los enterovirus y el virus del Nilo Occidental.^{127,145,150,155,169,358} Varios estudios demostraron las ventajas de la detección rápida de los enterovirus en el LCR de pacientes con meningitis.^{278,328} Se han evaluado las ventajas de la realización de estos ensayos en forma rápida para evitar prácticas innecesarias, como hospitalizaciones, uso de antibióticos y procedimientos auxiliares, para mejorar la atención de los pacientes y reducir los costos.

Los virus del dengue, Hantavirus, metaneumovirus humano y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), entre otros se han detectado mediante la RT-PCR.^{77,168,260,302} Las técnicas de amplificación basadas en RNA para la detección de rRNA en bacterias, parásitos y hongos pueden ser ventajosas más allá de la detección de los genes rDNA por la PCR tradicional, ya que la presencia de RNA está más asociada con la presencia de un organismo viable.

PCR DE AMPLIO ESPECTRO

La especificidad de un grupo de cebadores se determina por diversos factores. Algunos de ellos son técnicos, como el grado con el que los cebadores se hibridan con sus dianas (avidez), que se determina por la composición de la mezcla de reacción (concentración salina) y la complementariedad de los cebadores con respecto a sus secuencias diana (100% de complementariedad = apareamiento perfecto). La especificidad de una PCR también puede reflejar la singularidad de la secuencia complementaria con la que se hibridan los cebadores. En muchos casos, es deseable elegir una secuencia sumamente singular (rúbrica), si se está intentando detectar un microorganismo único. Por ejemplo, se ha demostrado que el gen que codifica el antígeno específico de *Coccidioides* es útil para la detección de *Coccidioides* y para diferenciar este organismo de otros hongos.³⁴⁶ El fracaso en la producción de una prueba específica de especies pueden derivar en una reactividad cruzada indeseable con especies muy relacionadas. Esto es lo que sucede con dos de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos disponibles en el mercado y aprobadas por la FDA diseñadas para detectar *N. gonorrhoeae*, que se sabe que pueden dar reacciones cruzadas con ciertas especies comensales de *Neisseria*.^{84,86}

Por otro lado, puede existir interés en detectar un gran grupo de microorganismos en vez de un único tipo. Los cebadores de tal prueba se diseñan para detectar todos los microorganismos del grupo de interés, mientras se intenta excluir la mayor cantidad de microorganismos que no estén en ese grupo. Esto se consideraría una PCR de "amplio espectro". Por ejemplo, un grupo de cebadores que detectaran sólo uno de los muchos enterovirus capaces de causar meningitis sería de poco valor para el diagnóstico o la exclusión de meningitis enteroviral. En este caso, las regiones que están conservadas entre todos los enterovirus clínicamente relevantes serían posibles sitios para el cebador y el templado de la sonda. Tanto los cebadores específicos como los de amplio espectro son útiles, según el interrogante clínico particular que se dirija para la prueba. Existen muchas ventajas para el uso de cebadores de amplio espectro, pero también hay limitaciones.

La razón más importante y la principal ventaja del uso de un grupo de cebadores para la PCR de amplio espectro es que se puede detectar alguno de los miembros de un gran grupo en una única reacción. Cuando se obtiene una reacción positiva, se puede fijar el amplicón por métodos múltiples para determinar qué miembro del grupo particular está presente. Esto puede

realizarse mediante sondas múltiples como *Southern blot* o ensayo inmunoenzimático (EIA), por secuenciación del amplicón o por análisis de micromatrices.^{97,131,213} El análisis de la curva de fusión posamplificación es un método nuevo para realizar la diferenciación limitada seguida a una PCR en tiempo real y de amplio espectro (véase "Amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real", más adelante).³¹⁴ La limitación de esta técnica es que cuanto mayor sea el grupo del ensayo diseñado para la detección, es más probable que la reacción también detecte microorganismos relacionados desde el punto de vista filogenético, pero que no necesariamente son parte del grupo de interés. Por ejemplo, se usa una PCR de amplio espectro para la detección de todas las micobacterias clínicamente importantes, pero también amplificará el mismo segmento de DNA de muchas otras bacterias ricas en G-C (guanina-citosina) que están muy relacionadas con este grupo. Estas limitaciones se pueden abordar con buenos resultados mediante el uso de sondas de alta especificidad; sin embargo, algunas limitaciones de este tipo de aplicación persisten. Cuando se amplifican microorganismos múltiples hay un consumo anticipado de los cebadores de PCR. Además, a menudo es difícil obtener información útil de la secuenciación de DNA porque resultará una secuencia mezclada carente de sentido, a menos que se pueda identificar una secuencia conservada en el grupo de interés que no esté presente en los microorganismos contaminantes.

APLICACIONES CLÍNICAS

Algún grupo de microorganismos relacionados, miembros de los que tienen interés clínico, son candidatos para la PCR de amplio espectro. Como ya se mencionó, los cebadores de amplio espectro han sido útiles para detectar los enterovirus que causan meningitis aséptica.^{272,276,324} Una limitación de algunos ensayos de amplio espectro para la detección de enterovirus es la reactividad cruzada de los rinovirus.¹⁸⁶ Esto no debería constituir un problema importante si se analiza sólo LCR, pero puede haber reacciones falsas positivas si se analizan, por ejemplo, secreciones respiratorias.

Posiblemente las moléculas diana más usadas para las PCR de amplio espectro han sido los genes que codifican las subunidades ribosómicas (rDNA) parasitarias, fúngicas y bacterianas.^{124,136,399} Estos genes son útiles para la PCR de amplio espectro, así como para la categorización taxonómica de microorganismos porque tienen tanto regiones variables como altamente conservadas. Las regiones conservadas son sitios excelentes para los cebadores de amplio espectro, mientras que las regiones variables que se extienden entre ellas pueden usarse como sitios diana para sondas específicas de especie o pueden contribuir para la secuenciación de DNA. Estas aplicaciones se han utilizado para determinar la causa de meningitis bacteriana, endocarditis infecciosa y bacteriemia en pacientes con endocarditis infecciosa y otras infecciones bacterianas.^{103,268,279,295,309} Como en el caso del cultivo, la presencia de bacterias contaminantes es un problema para la interpretación de los resultados de una PCR de amplio espectro.^{17,15}

No es sorprendente que este tipo de propuestas hayan sido usadas por diferentes grupos para la identificación de micobacterias.^{46,129,134} El análisis posamplificación más común ha sido la secuenciación de DNA; sin embargo, también se obtuvieron buenos resultados para la identificación con sondas múltiples y análisis de micromatrices.

Los sitios diana del rDNA constituyen la base de muchos de los sistemas de identificación basados en secuencias usados comúnmente. El sistema de identificación microbiano MicroSeq,

disponible en el mercado, usa los cebadores de amplio espectro para dirigirlos al 16S rDNA bacteriano y a la región D2 rDNA fúngica (Applied Biosystems, Foster City, CA). Después de la amplificación de la PCR del hongo o bacteria desconocidos, se obtiene la secuencia y se la compara con una base de datos que mantiene y actualiza el proveedor. Esta base de datos ha sido evaluada por diversos grupos con respecto a su utilidad en la identificación molecular de una variedad de patógenos, desde bacterias hasta dermatofitos.^{49,129,131,219,236,268,372}

Se han usado otros genes diana que, como los genes 16S rDNA, contienen regiones variables y regiones altamente conservadas, para la identificación de microorganismos. Estas diáns alternativas para la identificación mediante PCR de amplio espectro incluyen la RNA polimerasa (*rpoB*), las proteínas del choque térmico (*hsp*) y el factor de elongación Tu (*tuf*).^{73,173,213} La caracterización de microorganismos, en particular de micobacterias, mediante el gen *rpoB* presenta un interés peculiar, ya que el análisis de este gen también proporciona información con respecto a la resistencia de las micobacterias a la rifampicina.^{10,96,228,313}

PCR MÚLTIPLE

La PCR múltiple es un método alternativo a la PCR de amplio espectro para la detección de patógenos múltiples.^{19,105,285} En los ensayos simples o múltiples, hay grupos de cebadores múltiples que se usan en una PCR múltiple, cada uno de los cuales suele dirigirse a un patógeno particular. Ensayos múltiples más complejos pueden usar combinaciones de grupos de cebadores específicos de especie y de amplio espectro, por ejemplo. La ventaja de las reacciones múltiples es que se pueden detectar numerosos patógenos en una reacción única. En algunos casos, uno de los grupos de cebadores incluidos en las reacciones de amplificación puede estar dirigido contra un gen humano, como β -globina o ácido nucleico que ha sido agregado a la muestra; éstos funcionan como controles de amplificación internos para la reacción.²²⁹ La amplificación de un control interno es importante para asegurar que la reacción de amplificación no estaba inhibida y ayuda a garantizar la exactitud de los resultados negativos. El ensayo PCR competitivo cuantitativo es un método para obtener un resultado cuantitativo y es un tipo de reacción múltiple.^{298,314} Las limitaciones de la PCR múltiple son en gran parte secundarias a las interacciones entre los diferentes oligonucleótidos, que comprenden la sensibilidad de la reacción, en particular cuando se compara con las reacciones de amplificación individual. El diseño de ensayos múltiples altamente eficientes que tengan interacciones de oligonucleótidos mínimas es complicado.

APLICACIONES CLÍNICAS

Muchos ensayos múltiples se diseñan para detectar microorganismos diferentes que causan el mismo tipo de enfermedad. Por ejemplo, se han desarrollado ensayos múltiples para detectar *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*, las causas más comunes de meningitis bacterianas.^{13,320} Se describieron ensayos múltiples para la detección de los agentes virales de la meningitis y la meningoencefalitis.^{200,270,281} PCR múltiples son particularmente útiles cuando el número de patógenos posibles es limitado. Los ensayos múltiples también se han usado para detectar y diferenciar los poliovirus que infectan a seres humanos, las bacterias que causan infección del oído medio, los agentes de la neumonía bacteriana típica y de la atípica, y las causas de las infecciones del aparato respiratorio.^{51,18,121,143,261,341}

Por intermedio de Prodesse® (Wankesha, WI), se encuentran disponibles comercialmente diversos ensayos múltiples. Ejemplos de estas pruebas son los ensayos múltiples que detectan los virus respiratorios comunes (Hexaplex®) y los causantes de la neumonía bacteriana atípica (Pneumoplex®).³¹⁷ El Adenoplex® detecta la amplia variedad de subtipos de adenovirus que infectan a los seres humanos.

PCR ANIDADA

La PCR anidada es una modificación de la PCR diseñada para aumentar la sensibilidad de la reacción del ensayo. Esta modificación consta de dos grupos de cebadores dirigidos contra la misma diana.^{352,136} El primer grupo de cebadores se desarrolla de la manera usual, mientras que el segundo grupo son cebadores situados internamente o anidados con respecto al primer grupo. La propuesta tradicional para PCR anidada fue realizar un número de ciclos de PCR, por lo general menos que los que contendría una instancia completa, y luego abrir el vaso de reacción y agregar el segundo grupo, anidado, de cebadores.^{90,136,288} Como se puede imaginar, el mayor problema de esta metodología es la contaminación con amplicón en el laboratorio y la consecuente pérdida de especificidad del ensayo como prueba clínica. Recientemente se han informado ensayos descritos como reacciones PCR anidadas de una única etapa, donde ambos grupos de cebadores se agregan en el vaso de reacción inicial y se realiza una PCR extendida. Éstos se han realizado en un formato homogéneo o en tiempo real (véase más adelante) y han demostrado un incremento de la sensibilidad sin contaminación con amplicón.³⁷⁷ Las ventajas de estos tipos de aplicaciones más allá de las reacciones no anidadas en el laboratorio de rutina todavía tienen que probarse, pero podrían usarse en el futuro para detectar moléculas en muy bajas cantidades.

APLICACIONES CLÍNICAS

La PCR anidada se usó en numerosos ensayos de PCR en un intento por mejorar la sensibilidad del ensayo y resultó valiosa para la detección de microorganismos que pueden estar en escasa cantidad en la sangre y los tejidos, como *Rickettsia*, *Bartonella* y microorganismos similares.^{214,377} También se diseñó para la detección de herpesvirus y enterovirus a partir de LCR y se usó en el examen directo de la sangre como un modo de determinar la causa de la bacteriemia.^{69,96,125,174,322} Los cebadores de la PCR anidada también pueden usarse en una reacción múltiple para detectar herpesvirus diferentes, como virus del herpes simple (HSV) y CMV.²⁴² Esta modalidad también se usó para detectar *M. tuberculosis*, que puede plantear problemas para los sistemas de detección basados en la amplificación de ácidos nucleicos cuando hay escasa cantidad de bacilos.²⁴³

Análisis posamplificación

Después de que se completa la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, debe analizarse el producto de amplificación. Los métodos de análisis del producto amplificado van desde la simple determinación del tamaño del amplicón y la presencia de algún otro producto de amplificación mediante electroforesis en gel hasta la determinación de cada nucleótido que compone el amplicón mediante la secuenciación de DNA. Algunos métodos de análisis posamplificación, como los ensayos de protección de hibridación y los polimorfismos conformaciona-

les de doble hebra no se tratan aquí, mientras que otros, como el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se tratan más adelante en la sección sobre tipificación microbiana.

Métodos tradicionales de detección

ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS EN GEL/SOUTHERN BLOT

La electroforesis en gel es una de las formas más simples de adquirir información acerca del amplicón. Se pueden usar diferentes tipos de geles para la electroforesis en gel, pero a menudo se usa un gel simple de agarosa. Este gel es rectangular y tiene huecos o pocillos cerca de un extremo. Se lo coloca dentro de una caja de gel y se cubre con buffer; hay sistemas de electroforesis en gel más nuevos de un único uso que no necesitan la adición de buffer. Para realizar la electroforesis en gel, los productos de amplificación se mezclan con una carga de colorante, que es un líquido teñido, viscoso y denso. Esto ayuda al usuario a visualizar la colocación de la mezcla en el interior del pocillo cuando se procesa con pipeta. Después de la carga, se pasa una corriente continua a través del contenido de la caja de gel y el DNA cargado negativamente migra hacia el ánodo. Los trozos más grandes de DNA se retrasan por la matriz de gel comparados con las porciones más pequeñas de DNA. Por lo tanto, la separación de DNA mediante electroforesis en gel se debe en gran parte al tamaño. Un grupo de moléculas de DNA de diferentes tamaños conocidos, que por lo general se describen como "escalera" (*ladder*), se colocan en el primer carril carriles y se desplazan en forma simultánea con las muestras. Mediante una comparación visual de la migración de los amplicones de los carriles de las muestras (el área debajo del pocillo) y la migración de las moléculas de DNA de tamaño variable de la escalera, el operador puede estimar el tamaño de las moléculas de DNA amplificadas.

La presencia de una banda única del tamaño esperado es una buena evidencia preliminar de la especificidad de la reacción de amplificación. Pero los interrogantes persisten: "¿Cómo se puede estar seguro de que el producto amplificado es el producto deseado y no el producto de amplificación no específico que justo por casualidad es del mismo tamaño?". La respuesta a esta pregunta usando los métodos tradicionales se alcanzó mediante el uso de sondas específicas de oligonucleótidos y realizando un *Southern blot*. Resumiendo, después de la electroforesis en gel, el producto amplificado se transfirió a papel de nitrocelulosa y se agregó una sonda de oligonucleótido radiomarcado. Luego de un tiempo de hibridación apropiado y de etapas siguientes etapas de lavado para eliminar la sonda no unida, se expuso el papel a una película de rayos X. Si el amplicón esperado estaba presente, la sonda radiomarcada hibridaría a su secuencia complementaria en el amplicón y produciría un área de exposición sobre la película de rayos X. Si el amplicón hubiese sido el resultado de amplificación no específica, la sonda no se uniría y se eliminaría por lavado, y la película de rayos X no contendría un área de exposición en desarrollo. Este procedimiento requirió dos o tres días para completarse, fue técnicamente complicado y su aceptación en el laboratorio clínico no fue satisfactoria.

DETECCIÓN ENZIMÁTICA DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

La tecnología de enzimoimmunoensayo como método para detectar el producto de amplificación representó un gran avance en la detección rápida de productos de amplificación específicos.³³⁹ La reacción enzimática para la detección de productos amplificados se realiza en placas de 96 pocillos. Se pueden

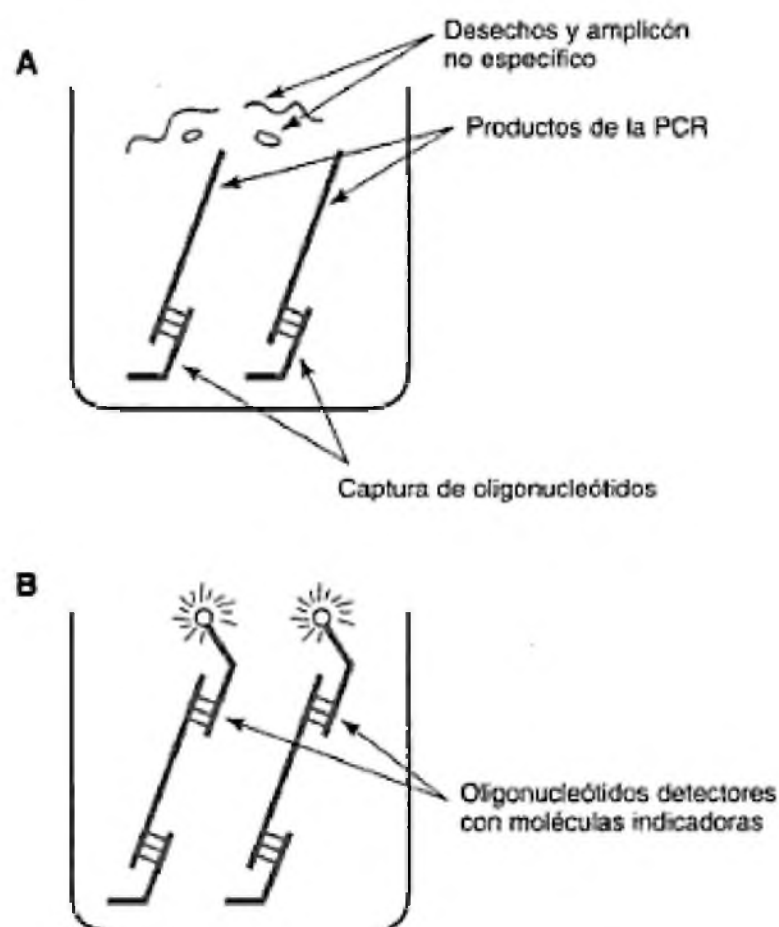


Figura 4-11 Existen muchos métodos para detectar un amplicón usando enzimas. (A) Aquí, se usa una sonda de captura para retener el amplicón específico, así se pueden eliminar por lavado restos celulares y algún material amplificado no específico. (B) Luego, el amplicón retenido se detecta con otro oligonucleótido y se genera una señal usando una de las muchas enzimas del sistema.

usar diferentes métodos de marcación y detección de sondas de oligonucleótidos hibridados. Sin embargo, el resultado final es que la sonda hibridada que no ha sido eliminada por lavado genera una señal de luz o de color³³⁶ (fig. 4-11). El uso de una sonda de oligonucleótido aumenta la especificidad de la reacción, mientras que el enlace con una reacción enzimática aumenta la sensibilidad de la reacción.³³⁸ La cantidad de señal generada es proporcional a la cantidad de amplicón presente. Cuando se usa con estándares calibrados, se puede obtener información cuantitativa.

APLICACIONES CLÍNICAS

Muchos de los sistemas disponibles en el mercado usan una reacción colorimétrica para la detección de los productos amplificados. Hubo una conversión rápida desde el Southern blot muy laborioso y que insuñe mucho tiempo hasta la detección enzimática que siguió a la introducción de esta técnica. Este método de detección se usa en varios sistemas comerciales y con una variedad de productos químicos de amplificación de ácidos nucleicos. Los datos de carga viral cuantitativa, que se generan con regularidad usando estos sistemas, se obtienen mediante esta técnica.

Hibridación inversa

El *Southern blot*, aunque eficaz, es laborioso e insuñe mucho tiempo. Además, las sondas múltiples o la secuenciación

del amplicón serían necesarios si el producto de amplificación fuese secundario a una PCR de amplio espectro. Una propuesta muy eficaz es inmovilizar todas las sondas de interés en una tira de nitrocelulosa y luego aplicar el amplicón a la tira y determinar qué sonda hibrida con el amplicón. Esto se denomina hibridación inversa, porque el amplicón se aplica a la sonda que está inmovilizada en la tira de nitrocelulosa, que es lo opuesto a cómo se realiza el *Southern blot*. El ensayo también tiene la ventaja de que usa una reacción cromogénica, en vez de radiactividad para detectar la hibridación (fig. 4-12).

APLICACIONES CLÍNICAS

La técnica de hibridación inversa está disponible en el mercado como línea de ensayos con sondas (LipA[®]) (Innogenetics, Gent, Belgium, and Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) o tiras de transferencia en manchas (*dot blot*) puntos (Roche Molecular Diagnostics, Indianápolis, IN). Este tipo de técnica se utilizó para diferenciar los distintos subtipos genéticos del virus de la hepatitis C (genotipificación del HCV), una prueba que provee información importante de pronóstico y tratamiento.^{311,368,373,387} Se encontró que el INNO-LiPA HCV II[®] (Bayer) era comparable con la secuenciación de DNA.³⁷⁷ La hibrida-

Línea marcadora		
Control conjugado - 1	—	Control conjugado
Género MYC - 2	—	Género <i>Mycobacterium</i>
Complejo MTB - 3	—	Complejo MTB
MKA-1 - 4	—	<i>M. kansasii</i> I
MKA-2 - 5	—	<i>M. kansasii</i> II
MKA-3 - 6	—	<i>M. kansasii</i> III, IV, V
MXE - 7	—	<i>M. xenopi</i>
MOO - 8	—	<i>M. goodii</i>
MGV - 9	—	<i>M. goodii</i>
MSI - 10	—	<i>M. simiae</i>
MMU - 11	—	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
MCE - 12	—	<i>M. celatum</i>
MAIS - 13	—	Complejo MAIS
MAV - 14	—	<i>M. avium</i>
MIN-1 - 15	—	<i>M. intracellulare</i> 1
MIN-2 - 16	—	<i>M. intracellulare</i> 2
MCS - 17	—	<i>M. scrofulaceum</i>
MML - 18	—	<i>M. mageritense</i>
MHP - 19	—	<i>M. haemophilum</i>
MCH-1 - 20	—	<i>M. chelonae</i> I, II, III, IV
MCH-2 - 21	—	<i>M. chelonae</i> III
MCH-3 - 22	—	<i>M. chelonae</i> I
MFO - 23	—	Complejo <i>M. fortuitum</i>
MSM - 24	—	<i>M. smegmatis</i>

Figura 4-12 La tira de hibridación inversa muestra que es posible identificar las micobacterias de mayor importancia clínica usando PCR seguida por la hibridación inversa del amplicón. Algunos ensayos similares son útiles para determinar los genotipos de HCV y HIV encontrados con más frecuencia. (Fotografía del ensayo de hibridación inversa de *Mycobacteria* V2 INNO-LiPA, Innogenetics, Ghent, Bélgica).

ción inversa también resultó útil para la detección de las mutaciones más comunes presentes en el genoma del HIV que le confieren resistencia a los agentes antirretrovirales.^{38,67,306,334} El LiPA® es mucho más fácil de realizar que la secuenciación de DNA, con análisis posprueba más simples. Sin embargo, a diferencia de la secuenciación de DNA, la hibridación inversa tiene en cuenta una contribución de sólo las secuencias para las cuales hay sondas y no permite evaluar mutaciones nuevas, que podrían ser tanto silenciosas como clínicamente importantes.²⁸⁰ La hibridación inversa también se usó para detectar al HPV e identificar los subtipos que están asociados con un riesgo elevado de displasia y posterior carcinoma.^{175,193,216,293,271,353} Además de las aplicaciones virológicas, la tecnología de hibridación inversa se utilizó para identificar micobacterias, hongos de importancia médica y mutaciones asociadas con resistencia micobacteriana a la rifampicina.^{1,13,33,66,147,212,217,221,224,294,304,338,342} Aunque son sumamente exactos, los LiPA® micobacterianos fúngicos y para rifampicina son costosos y no están disponibles en los Estados Unidos.

Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA para el análisis de un producto amplificado es ahora un método común de análisis posamplificación. Aunque útil, es una técnica más complicada que la hibridación con sondas simple y a menudo requiere que el operador tenga experiencia en alineamiento de secuencias, edición de programas informáticos y bases de datos genéticos. Es muy valiosa cuando se analiza un grupo de microorganismos para determinar las áreas de conservación y variabilidad dentro del amplicón obtenidas por PCR de amplio espectro. El análisis de esas regiones variables se convierte luego en una herramienta útil para la identificación de microorganismos.^{27,103,111,119,187,197,278,309,359,368,373} También ha resultado eficaz para el análisis de mutaciones genéticas dentro de los genomas virales, que pueden ser polimorfismos de nucleótido único (SNP) y conferir resistencia a un fármaco antiviral.^{50,133,179,201}

SECUENCIACIÓN TRADICIONAL DE DNA

La secuenciación tradicional de DNA, una herramienta usada alguna vez sólo en laboratorios de investigación, se ha convertido en una práctica habitual en muchos laboratorios de microbiología molecular y de patología molecular. Esta técnica, que usa la secuenciación tradicional de Sanger o secuenciación por terminación, funciona mediante la incorporación de didesoxinucleótidos en una hebra creciente de DNA. Cuando se incorpora un didesoxinucleótido en la hebra de DNA, ésta ya no puede extenderse. El análisis de los fragmentos de DNA que resultan, que son tan numerosos como los nucleótidos que

componen la hebra, proporciona información de la secuencia. En el pasado, esto se hacía con grandes volúmenes de gel vertidos entre dos placas de vidrio y moléculas indicadoras radiactivas. Hoy en día, estos métodos han sido modificados para usar moléculas indicadoras marcadas con fluorescencia con un sistema de gel más práctico para el usuario o bien con electroforesis capilar (fig. 4-13). La secuencia de regiones largas de DNA, de más de cien pares de bases de longitud, puede determinarse fácilmente por estos métodos.

APLICACIONES CLÍNICAS

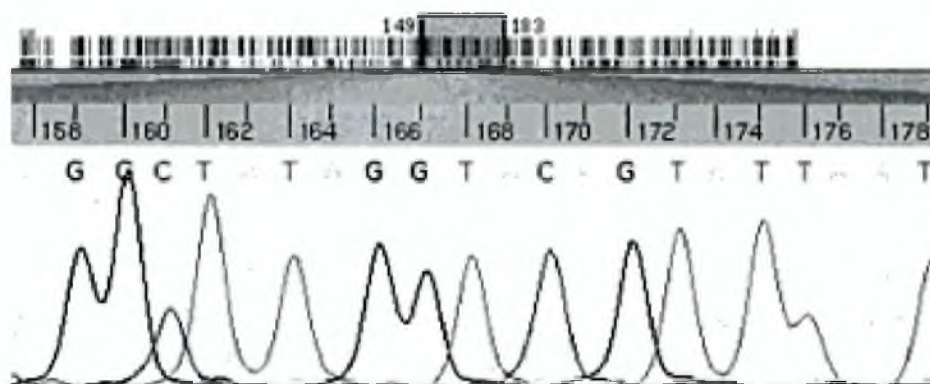
Una de las aplicaciones de la secuenciación de DNA en el laboratorio de microbiología molecular es la genotipificación del HIV.^{44,290} Esto se ha hecho para determinar, en un paciente particular, la presencia de mutaciones adquiridas en el genoma del HIV que podrían conferir resistencia a los agentes antirretrovirales. Es un ensayo complicado y que consiste en la extracción del RNA del HIV, seguida de cuatro ensayos de RT-PCR, cada uno de los cuales se continúa con la secuenciación Sanger. Aunque la determinación de nucleótidos está en gran parte automatizada en muchos de estos sistemas, todavía se necesitan algunos análisis de secuencia manuales de las secuencias generadas. La secuenciación de DNA también se usó para demostrar mutaciones asociadas con la resistencia en CMV y para determinar el genotipo de HCV.^{133,138,179,201,237}

La secuenciación de DNA también se aplicó con buenos resultados para la identificación de bacterias, micobacterias, *Nocardia*, y hongos. Los genes que codifican las subunidades ribosómicas de esos microorganismos son los más usados para la identificación basada en la secuencia. Uno de los usos más comunes de esta propuesta ha sido para identificar las causas de la endocarditis bacteriana.^{163,171,170,172,222,269} Sin embargo, la identificación basada en la secuencia se utilizó para determinar el agente causal de otras diversas infecciones, incluidas la sinusitis y las infecciones urinarias.^{37,122} Esta técnica está revolucionando la forma en que se identifican microorganismos de crecimiento lento, como micobacterias y nocardia.^{48,129,171,219,250,254} También se la utilizó para la identificación de hongos patógenos.^{130,131,265} A pesar de que los genes del rDNA son los más usados para la identificación basada en la secuencia, otros genes también han sido valiosos para la caracterización de microorganismos, como los genes *rpoB*, *hap* y *mf*, entre otros.^{73,74,94,171,183,249,287}

SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS (PIROSECUENCIACIÓN)

La pirosecuenciación es un método relativamente nuevo de secuenciación de DNA, que es la secuenciación por síntesis, en contraposición con la secuenciación por terminación con dide-

Figura 4-13 Secuencia del HIV. Aquí se muestra una secuencia de DNA del HIV seguida de RT-PCR que se obtuvo mediante la secuenciación por terminación (la secuenciación tradicional de Sanger). Los métodos de secuenciación más usados por terminación son la electroforesis capilar y los métodos modernos con soportes de gel.



soxinucleótido o secuenciación de Sanger.^{228,291,292} Esta técnica se utilizó extensamente en el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) asociados con enfermedades genéticas y neoplasias, como también para la identificación y diferenciación de microorganismos.^{30,100,238} A diferencia de la secuenciación tradicional por terminación, se basa en la incorporación de nucleótidos en la hebra de DNA recién sintetizada. En resumen, la molécula de DNA amplificada por PCR, en la que una de sus hebras contiene una biotina terminal que se une al cebador, se inmoviliza en el pocillo de la microplaca. El proceso crea una hebra simple. El cebador de secuenciación y los reactivos se agregan a continuación de la adición automatizada de cada uno de los cuatro nucleótidos. Si el nucleótido agregado es el próximo necesario para el crecimiento de la hebra, se genera pirofosfato (un subproducto natural de la incorporación de nucleótidos), que produce luz a través de reacciones enzimáticas. Mediante el registro que el instrumental obtiene de esta luz, se determina la secuencia (fig. 4-14).

Las limitaciones primarias de la secuenciación por síntesis son su capacidad para generar sólo secuencias relativamente cortas (~30 pb), los problemas que ocasiona una secuencia cuando está presente la estructura secundaria extensa y una incapacidad para caracterizar con exactitud regiones que contienen más de cuatro nucleótidos iguales en tándem (homopolímeros). Las ventajas son la facilidad de uso (la reacción de secuenciación sucede en una placa de 96 pocillos), que la secuencia generada está presente en el contexto, es decir en el medio, y que pueden usarse secuencias conocidas como una secuenciación control. La clave del uso de la pirosecuenciación para la identificación de microorganismos es conocer los genes específicos que proporcionan información suficiente para la diferenciación de los microorganismos de interés.

APLICACIONES CLÍNICAS

Se están introduciendo aplicaciones que usan secuenciación por síntesis en el laboratorio de microbiología clínica. Las aplicaciones en investigación incluyen la identificación y la tipificación de bacterias, como *Helicobacter pylori* y *Listeria monocytogenes*; también se han utilizado para diferenciar bacterias en grupos clínicamente importantes,^{143,230,247} así como para estudiar la resistencia a linezolid en los enterococos.³¹⁶ Otros usos útiles para la clínica serían la identificación rápida de bac-

terias que causan infecciones en recién nacidos y de bacterias que causan meningitis.

La pirosecuenciación ha sido útil para identificar hongos de importancia clínica, nocardias y micobacterias.¹⁰⁹ Medialmente una PCR de amplio espectro que usa como diana la porción de 16S rDNA que contiene la región A hipervariable demostramos con la pirosecuenciación una excelente diferenciación de la gran mayoría de micobacterias de importancia clínica a través del análisis de una región que se compone de sólo 30 pb.³⁴⁵ Varios grupos de trabajo han demostrado que la región A hipervariable es útil para la diferenciación genética de micobacterias.^{71,134,225} De modo similar, se han usado como diana porciones del gen de 16S rDNA que brinda información taxonómica para las especies *Nocardia* y se han obtenido resultados excelentes.^{47,213}

Esta técnica también ha sido valiosa para la diferenciación de los virus. Se ha desarrollado un ensayo para determinar el genotipo de HCV utilizando pirosecuenciación.⁷⁸ Este método se ha usado para diferenciar los poliomavirus obtenidos de tejidos humanos y líquidos corporales.¹⁸

Muchas de las aplicaciones de pirosecuenciación descritas por los laboratorios de microbiología clínica usan una PCR de amplio espectro para los microorganismos de interés, seguida por la investigación de una región variable compacta que brinda la información genética. Existen muchas posibles aplicaciones de la secuenciación por síntesis para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o para la caracterización de los microorganismos infectantes y el huésped. Estas aplicaciones pueden incluir la identificación de los agentes causantes de la infección y la detección de mutaciones genéticas asociadas con resistencias. Además, la caracterización de SNP u otros polimorfismos genéticos que pueden aumentar el riesgo de infección en el huésped también se puede determinar por esta técnica. Lamentablemente, todavía no se cuenta con equipos comerciales, de modo que los usuarios deben confiar en los ensayos artesanales o de elaboración casera, con lo que se limita la difusión de esta técnica.

ANÁLISIS DE MICROMATRICES

Una gran variedad de micromatrices, a menudo conocidas como "chips génicos" fueron usadas durante muchos años en las ciencias básicas para diversos propósitos, incluidas las

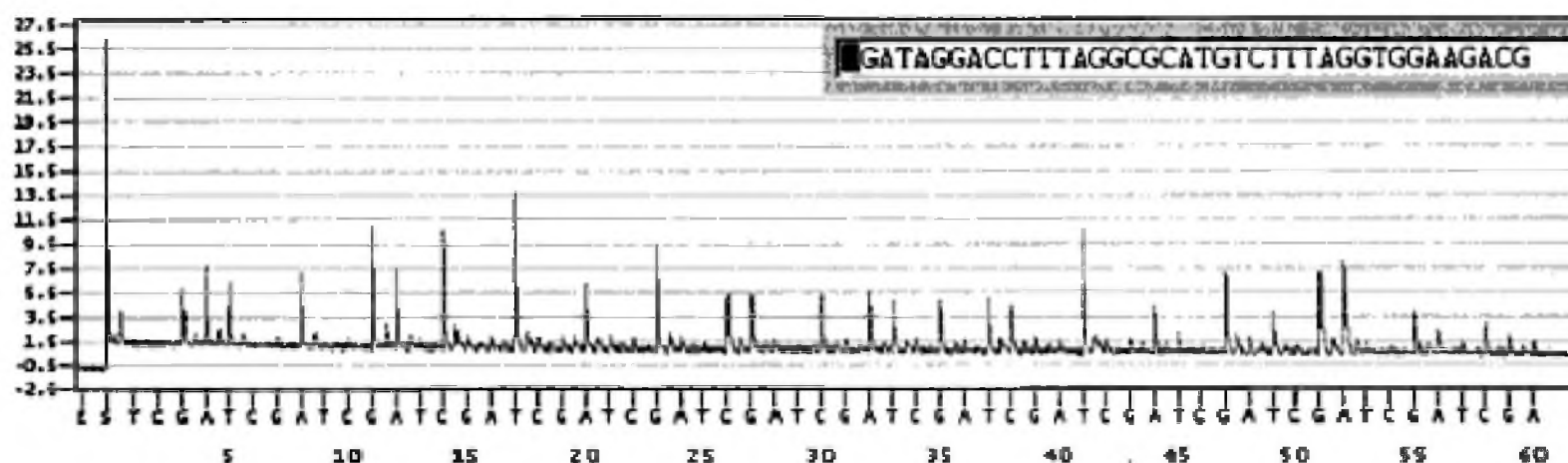


Figura 4-14 Secuencia de DNA por pirosecuenciación. Este pirograma fue generado a partir de una muestra clínica que contenía bacilos ácido-alcohol resistentes. Se realizó una PCR en tiempo real seguida por pirosecuenciación ante la posibilidad de una tuberculosis. La secuencia generada, que proviene de la región A hipervariable del gen 16S rDNA, identificó el aislamiento como *M. intracellulare*.

enfermedades infecciosas.^{12,24,31} Estos dispositivos detectan una multitud de señales en forma simultánea y pueden usarse para detectar diferencias genéticas (DNA) o diferencias en la expresión (mRNA).³¹ Determinan qué genes se expresan y cuáles están silenciados en respuesta a diferentes estímulos. Estos descubrimientos demostraron su valor en una amplia variedad de trastornos, desde infecciones hasta cáncer. Los productos de la amplificación de ácidos nucleicos, que pueden ser el resultado de PCR de amplio espectro o RT-PCR, se aplican a las micromatrices. Éstas constan de miles de sitios de hibridación, cada uno de los cuales provee información con respecto a la composición de nucleótidos del amplicón. La señal generada desde las micromatrices puede ser fluorescente o eléctrica. El principal avance de las micromatrices es su capacidad para analizar miles de reacciones de hibridación en forma simultánea. Esta característica también contribuye a una de sus mayores limitaciones, es decir, la cantidad de datos generados a partir de una sola micromatriz puede ser abrumadora para el usuario y por lo general requiere ordenadores y programas informáticos avanzados para el análisis de los datos. El costo del análisis de micromatrices también hace prohibitivo su uso de rutina por ahora. Aunque con seguridad las micromatrices se usarán en el estudio de enfermedades infecciosas, el futuro de esta técnica en el laboratorio de microbiología clínica todavía no está determinado.

APLICACIONES CLÍNICAS

Los formatos de micromatrices se han usado en diversos descubrimientos: para identificar bacterias, micobacterias, hongos y virus; para detectar los determinantes genéticos de la resistencia, para estudiar la respuesta del huésped a la infección y para descubrir nuevos fármacos que curen las infecciones.^{34,41,43,57,91,97,226,303} Con respecto al HIV, esta técnica ha sido provechosa para el estudio de la expresión génica viral y de los cambios en el perfil de expresión célula-huésped después de la infección.^{157,311,336,354,369}

A pesar de su valor para la investigación, las micromatrices todavía no han sido introducidas en el uso habitual del laboratorio de microbiología clínica y no están disponibles aún en el comercio para el diagnóstico de pacientes con infecciones. Su posible utilidad en el laboratorio de microbiología clínica está puesta de manifiesto en el título de un artículo reciente: "Chips con todo: micromatrices de DNA en enfermedades infecciosas".³¹ Queda por ver cómo y cuándo esta técnica se volverá accesible para el uso cotidiano.

Amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real

Dos avances tecnológicos derivaron en el desarrollo de la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real. El primero fue el desarrollo de métodos de intercambio de calor más rápidos (calentamiento y enfriamiento rápidos) de la cámara de reacción.²⁰³ La PCR tradicional, por ejemplo, sucede en un cicladador con bloque, en el cual el bloque se compone de metal o de algún otro material sólido. La velocidad a la que el bloque sólido puede calentarse o enfriarse a las temperaturas necesarias para la PCR limita la velocidad a la cual el ciclo puede avanzar. La introducción rápida de aire calentado y la eliminación de aire caliente (enfriamiento) que puede lograrse mediante instrumentos ventiladores en tiempo real permite que el ciclo de reacción avance con más rapidez. Los volúmenes de reacción más pequeños también contribuyen a que el intercambio

de energía térmica sea más rápido. El segundo avance técnico estuvo dado por el desarrollo de una mezcla de reacción homogénea,²⁰⁴ es decir, una mezcla en la cual las moléculas fluorogénicas que se usan para la detección de los productos amplificados están presentes dentro del mismo vaso de reacción en el cual ocurre la amplificación. Además, una contribución de la fluorescencia de esas moléculas se obtiene, habitualmente, mediante un instrumento una vez por ciclo de amplificación. Por lo general estos ensayos se denominan como PCR de tiempo real porque la amplificación se desarrolla durante la reacción PCR en "tiempo real". Este tipo de detección del amplicón representa un avance importante en la química de los ácidos nucleicos, porque es más rápida que los métodos tradicionales de detección del amplicón. Además, hay una reducción significativa en la probabilidad de contaminación del amplicón en el laboratorio, porque el vaso de reacción no tiene que ser abierto para analizar el amplicón. Se dispone de diversas plataformas para la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real.⁹⁵ Además de la PCR en tiempo real, la reacción NASBA ha sido modificada a un formato en tiempo real con la detección que usa señales moleculares (véase más adelante). Existe la posibilidad de modificar alguna tecnología de amplificación de ácidos nucleicos a formato de tiempo real.

Métodos de detección de productos de amplificación en tiempo real

Existe una variedad de moléculas fluorogénicas que pueden usarse para la detección de ácidos nucleicos amplificados en una reacción homogénea o en tiempo real. Éstas pueden ser no específicas y detectar cualquier ácido nucleico amplificado, o específicas, lo que significa que son oligonucleótidos e hibridan con una secuencia específica presente en el amplicón. Se tratarán tanto la detección no específica del amplicón usando verde SYBR como los tres métodos más usados de detección específica del amplicón. Éstos son el TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) o sondas de hidrólisis, las sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) y las balizas moleculares. También se dispone de otros tipos de moléculas detectoras, pero su tratamiento excede el alcance de este libro.

VERDE SYBR

El verde SYBR I es un colorante que se une al surco menor del DNA bicatenario y que emite muy poca fluorescencia en su estado no unido, pero produce una fluorescencia considerable cuando está unido al DNA (fig. 4-15). Esta propiedad lo hace útil para determinar la presencia de un producto DNA amplificado. Muchas moléculas de verde SYBR se pueden unir a un amplicón único, de modo que se convierte en un método sensible para la detección del amplicón. Además, es mucho menos costoso que las sondas específicas de oligonucleótidos que se marcan con fluoróforos. La detección de amplicones usando verde SYBR es útil para optimizar la PCR (determina la concentraciones óptimas de sondas y MgCl₂). También lo es para determinar si la amplificación ha sucedido antes de un método definitivo de análisis posamplificación, como la secuenciación de DNA o el análisis de micromatrices. Su desventaja principal es su inespecificidad. Estas moléculas detectoras se unirán a cualquier DNA de doble cadena, entre ellos los productos de amplificación no específicos y los dímeros de cebadores. Este método de detección carece de la especificidad lograda con el uso de una sonda de oligonucleótidos (descrita más adelante).

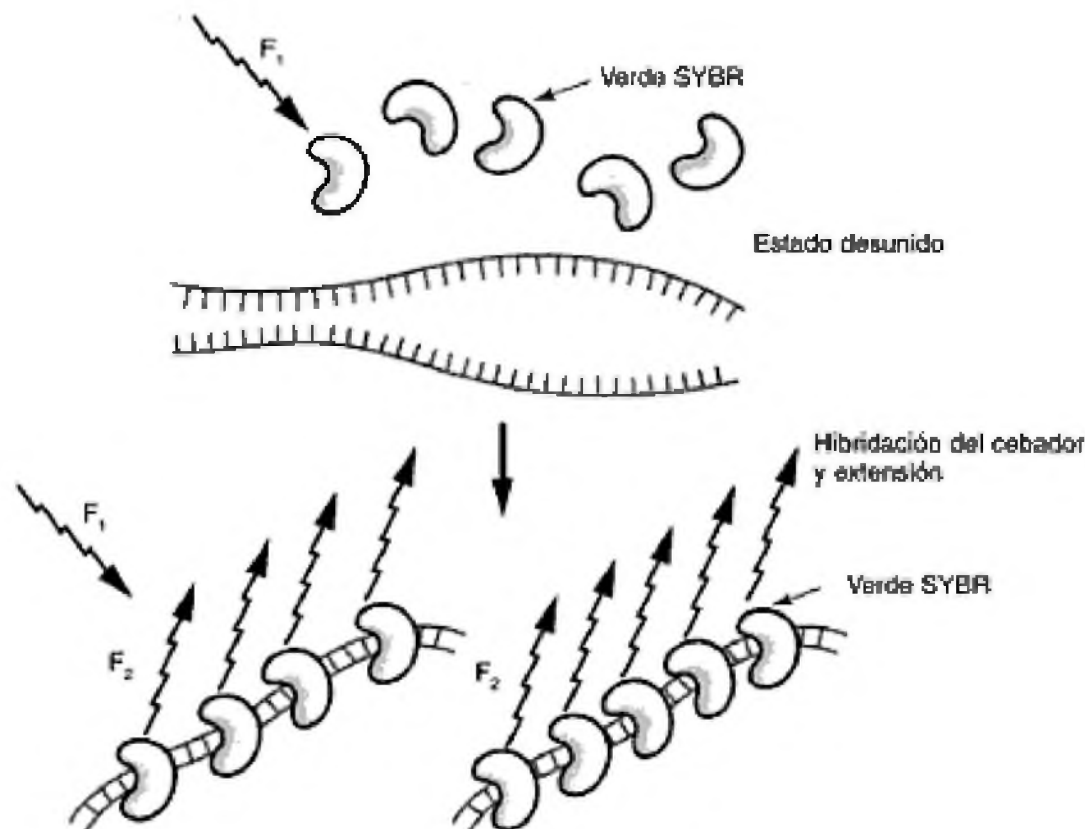


Figura 4-15 Química del verde SYBR. El colorante verde SYBR I se une al surco menor del DNA de doble cadena. Cuando el DNA es de cadena simple no hay surco menor, de modo que el verde SYBR no se une al DNA. Sin embargo, después de la hibridación del cebador y la extensión, el verde SYBR se puede unir y emitir luz (F_2) en respuesta a la excitación apropiada (F_1). El verde SYBR es un excelente método que mide la generación de amplicón no específico, porque la mayor cantidad de DNA producido por la PCR da por resultado mayor cantidad de sitios de unión y, por lo tanto, más fluorescencia.

Por esa razón, nunca debería usarse la detección con verde SYBR como único método de detección en un ensayo clínico.

SONDAS DE HIBRIDACIÓN

Pueden usarse diferentes tipos de sondas de oligonucleótidos marcadas por fluorescencia para la detección del amplicón en un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real. Las tres que trataremos son las más usadas y cubren los aspectos más importantes de la química de detección en tiempo real. Ellas son TaqMan® o sondas de hidrólisis, las sondas transportadoras de energía de resonancia fluorescente (FRET), y las balizas moleculares.

TaqMan o sondas de hidrólisis. Las propiedades químicas de detección de TaqMan o de las sondas de hidrólisis se basan en la actividad exonucleasa 5' a 3' de la DNA polimerasa. Esta función de DNA polimerasa hidroliza cualquier nucleótido que pueda unirse a la porción monocatenaria de la molécula de DNA por la cual la hebra complementaria está siendo sintetizada. En la naturaleza, esto ayuda a asegurar que se incorporen sólo los nucleótidos apropiados en la hebra de DNA recién sintetizada. TaqMan o las características químicas de las sondas de hidrólisis aprovechan esta propiedad de la DNA polimerasa para generar una señal detectable. La sonda de hidrólisis se marca con una molécula de fluoróforo y una del extintor. En ausencia de la diana específica, esta molécula se pliega en un cierto grado, que coloca al extintor muy cerca del fluoróforo de modo que la mayor cantidad de alguna señal fluorescente emitida se absorbe de inmediato. Cuando esta sonda se une a la porción complementaria del DNA que ha sido generada por los ciclos previos de PCR, se hidroliza por la DNA polimerasa (fig. 4-16). Esta hidrólisis facilita la difusión del fluoróforo lejos de la molécula extintora y la generación de luz que, por no estar extinguida, es detectable.

Sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Las sondas FRET funcionan mediante la transferencia de energía. En este sistema, se usan dos sondas detectoras en lugar de una. Estas sondas se hibridan una cerca de la otra en

el amplicón, con una brecha de dos a cinco nucleótidos entre ambas. La sonda que se ubica corriente arriba del par tiene una molécula de fluoresceína adosada al extremo 3' y puede denominarse molécula donadora. La segunda sonda en el grupo FRET está situada corriente abajo en relación con la primera sonda, tiene una molécula aceptora, por lo general LC640 o LC705 cuando se usa con el sistema LightCycler en el extremo 5' de la molécula, y puede llamarse molécula aceptora. Se pueden usar otras moléculas aceptoras, pero deben tener la propiedad de ser excitadas por la longitud de onda de la luz que emite la fluoresceína u otra molécula donadora y, a su vez, emitir luz

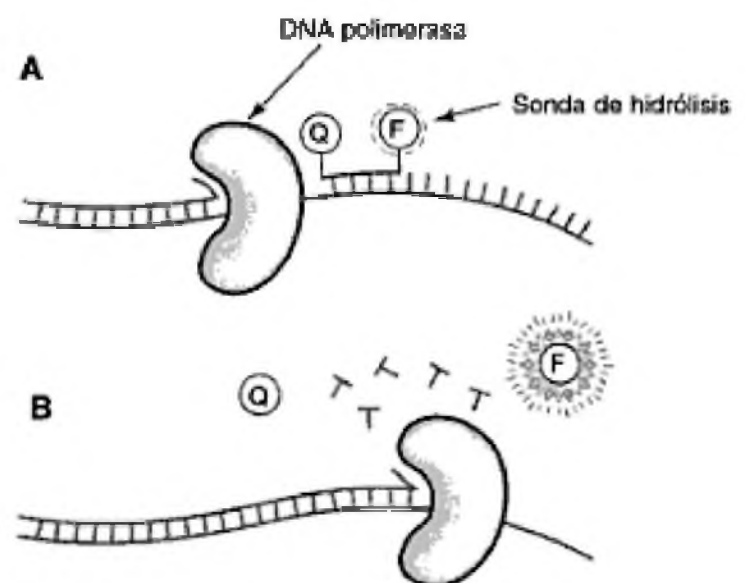


Figura 4-16 Química de la sonda de hidrólisis. (A) La proximidad de la molécula extintora (Q) a la molécula fluorescente (F), ambas adosadas a la sonda de hidrólisis intacta, deriva en una fluorescencia de fondo mínima. (B) La hidrólisis de esta sonda por la actividad de exonucleasa de la DNA polimerasa, como sucede en la extensión, provoca la difusión del fluoróforo desde la molécula extintora, de modo que la fluorescencia puede suceder cuando el fluoróforo se excita de modo apropiado.

de otra longitud de onda detectable. Además, el extremo 5' de la sonda que contiene el aceptor debe estar fosforilado para impedir la extensión de la sonda durante la PCR. La detección con las sondas FRET funciona de la siguiente manera: si está presente la secuencia de hibridación de la sonda apropiada en el amplicón, las sondas FRET se hibridarán con ella. Al mismo tiempo, la molécula donadora (la fluoresceína) es excitada por la energía luminosa que el equipo introduce en el sistema. Cuando la molécula donadora excitada vuelve a su estado de energía inicial, libera luz de una longitud de onda particular. Esta luz liberada excita a la molécula aceptora más cercana (LC640 o LC705), lo que completa la transferencia de energía de resonancia. La molécula aceptora es a su vez excitada a un estado de mayor energía. Cuando la molécula aceptora retorna a su estado de energía inicial, libera energía que es detectada por el sistema (fig. 4-17). La detección que usa la química basada en FRET es por su naturaleza muy específica, porque la única forma de recibir la señal de energía final es porque suceden cuatro reacciones independientes: la hibridación de los dos cebadores que producen la amplificación y la hibridación de cada una de las sondas que producen la detección (fig. 4-18).

Las sondas FRET también le permiten al usuario realizar un análisis de la curva de fusión posamplificación. Esto es posible por la naturaleza de la interacción de la sonda FRET y porque, a diferencia de las sondas Taqman, las sondas FRET no se hidrolizan durante la detección. El lector recordará que los enlaces de hidrógeno son responsables de la hibridación entre las sondas de oligonucleótidos y la hebra de DNA complementario. Cuando la energía térmica que se agrega al sistema excede la energía de los enlaces, éstos se romperán y la sonda "fundirá" el DNA complementario diana. El punto en el cual la mitad de las moléculas de sonda están unidas y la otra mitad está sin unir es el punto de fusión o T_M del oligonucleótido.

El análisis de la curva de fusión se realiza después que se completa la PCR. Al principio, la mezcla de reacción se enfría a un punto muy por debajo de la T_M de las sondas FRET individuales de modo que ambas hibridarán si está presente el DNA amplificado apropiado. En este punto, se introduce en el instrumento un impulso excitatorio de longitud de onda luminosa y se genera una señal a partir de la reacción de FRET que se produce entre las sondas yuxtapuestas. En el próximo paso, la mezcla de reacción se calienta lentamente mientras se toman medidas continuas de la fluorescencia. Cuando la mezcla de reacción alcanza y finalmente excede la T_M de las sondas FRET, habrá una pérdida precipitada de señal fluorescente (fig. 4-19). La primera derivada de la pendiente de esta curva es un

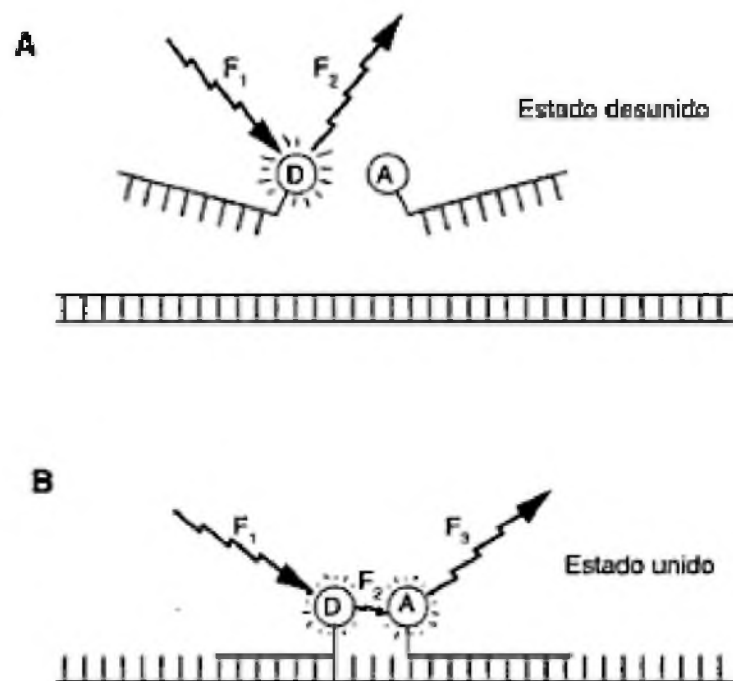
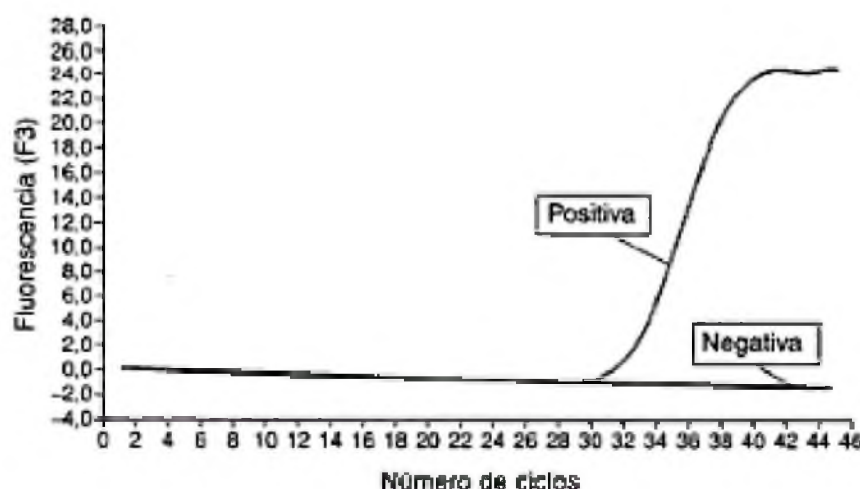


Figura 4-17 Transferencia de energía por resonancia fluorescente. Son necesarias dos sondas marcadas con un fluoróforo para lograr una transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). (A) La longitud de onda de excitación (F_1) del fluoróforo donador (D) eleva el estado de energía de la molécula y se produce una emisión (F_2). Esto no afecta al fluoróforo aceptor (A) cuando las sondas no están hibridadas porque no están muy cerca una de otra. (B) Cuando las dos sondas se hibridan y se aproximan como consecuencia de un apareamiento de bases de Watson y Crick, el fluoróforo donador está cerca del fluoróforo aceptor. La luz emitida por el fluoróforo donador excitado (F_2) actúa como energía de excitación para el fluoróforo aceptor, que a su vez emite una longitud de onda particular de luz propia (F_3). La presencia de la emisión (F_3) de la molécula aceptora es una evidencia de que ha ocurrido la hibridación de la sonda.

pico (fig. 4-19). La línea perpendicular que puede dibujarse a través del centro de este pico representa la derivada de T_M .

Existen al menos tres usos importantes para el análisis de la curva de fusión. Primero, debería haber una temperatura de fusión relativamente predecible para el amplicón esperado, que podría confirmarse usando estándares conocidos. La demostración de la temperatura de fusión adecuada le ayuda al usuario a confirmar que la identificación es correcta, en lugar de obtener mediante la amplificación y la detección una identificación errónea de un organismo relacionado desde el punto de vista

Figura 4-18 Reacciones positivas y negativas de PCR en tiempo real. Las reacciones positivas muestran un incremento exponencial en la fluorescencia, mientras que las reacciones negativas conservan sólo niveles basales bajos de fluorescencia.



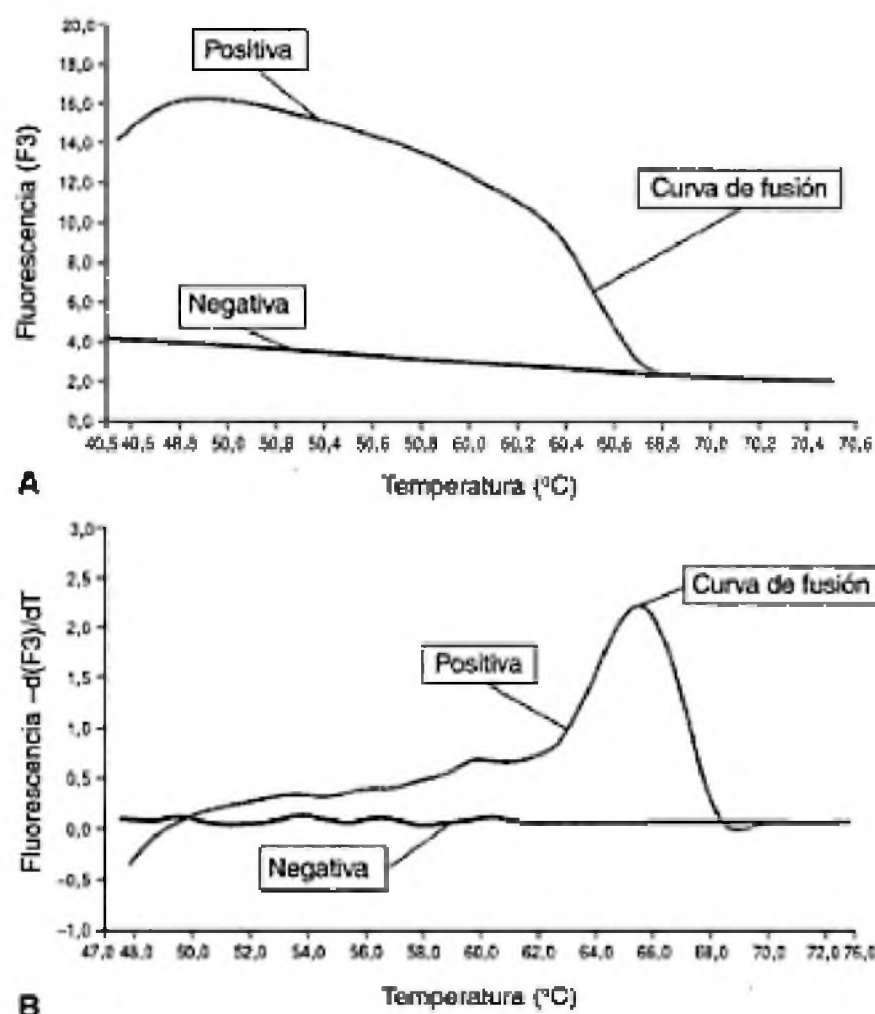


Figura 4-19 Curvas de fusión (A) y derivada de la curva (picos de fusión en B) de una muestra positiva y una negativa en una PCR en tiempo real que detecta *Staphylococcus aureus* de modo específico.

taxonómico. De este modo, el análisis de la curva de fusión posamplificación puede usarse para diferenciar organismos estrechamente relacionados. Por último, la detección de nucleótidos mal apareados entre las sondas FRET y su correspondiente sitio de hibridación de la sonda, similar a la usada para la diferenciación de microorganismos, puede usarse para detectar otros SNP clínicamente importantes, como los que pueden conferir resistencia a los antimicrobianos o aquellos en el huésped que pueden denotar sensibilidad relativa a la infección.

Balizas moleculares. El próximo tipo de molécula detectora que se tratará es la baliza molecular. Esta molécula, igual que la sonda TaqMan o la sonda de hidrólisis, contiene una molécula fluoróforo y una molécula extintora. Sin embargo, la baliza molecular es mayor que las sondas de hidrólisis típicas y no se hidroliza por la DNA polimerasa para lograr fluorescencia en presencia del amplicón apropiado. Esta molécula, en forma de "paleta" o "piruleta", tiene una configuración en tallo y bucle (fig. 4-20). La porción del bucle es la parte de la molécula complementaria a una parte específica del amplicón. El tallo es una estructura de ácidos nucleicos complementarios diseñada para mantener la molécula cerrada (en la configuración de paleta), en ausencia de un amplicón específico. Los dos extremos respectivos de la baliza molecular y de la molécula sonda son los sitios donde se adosan las moléculas de fluoróforo y extintora. El fluoróforo está yuxtapuesto con la molécula extintora cuando la baliza está cerrada (cuando no está en presencia del amplicón apropiado). Cuando la baliza está ante el amplicón apropiado, la termodinámica favorece la hibridación con el amplicón a pesar del estado cerrado, semiautolubridado. Cuando la baliza molecular se hibrida, el fluoróforo se separa del extintor y la fluorescencia puede ser detectada por el equipo. Las curvas de fusión pueden lograrse con balizas moleculares, pero es mucho

más difícil obtener la misma calidad de resultados de curva de fusión que la obtenida con las sondas FRET.

Puede parecer difícil para el microbiólogo molecular elegir qué tipo de molécula detectora usar para un ensayo de amplificación de ácido nucleico en tiempo real. Esto puede estar dictado en parte por el tipo de instrumental que hay en el laboratorio. Por ejemplo, si se adquiere un SmartCycler® o EasyQ®, sería preferible una baliza molecular, mientras que para el LightCycler® son preferibles las propiedades de la sonda FRET. Las plataformas ABI® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y Roche (COBAS) TaqMan 48® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) usan sondas de hidrólisis. Algunas plataformas, como la RotorGene® (Corbett, Corbett, Australia), son indistintas desde el punto de vista bioquímico y soportan cualquier química de sonda. Se pueden lograr los mismos fines (detección de microorganismos) mediante diversas maneras. El otro factor importante en la determinación del tipo de sonda para usar en un segmento particular de DNA es la composición de nucleótidos de ese segmento. Entre los factores que pueden influir en la selección de la sonda se incluyen el contenido G-C de la región y la presencia de estructura secundaria, entre otros.

APLICACIONES CLÍNICAS

La amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, en especial la PCR en tiempo real, ha contribuido de modo significativo a la implementación de ensayos en tiempo real para una amplia variedad de microorganismos de importancia clínica. La mayoría de los microorganismos detectados en el pasado por medio de la PCR tradicional se han detectado recientemente usando formatos en tiempo real. Estos ensayos se han usado para detectar patógenos con requerimientos nutriciona-

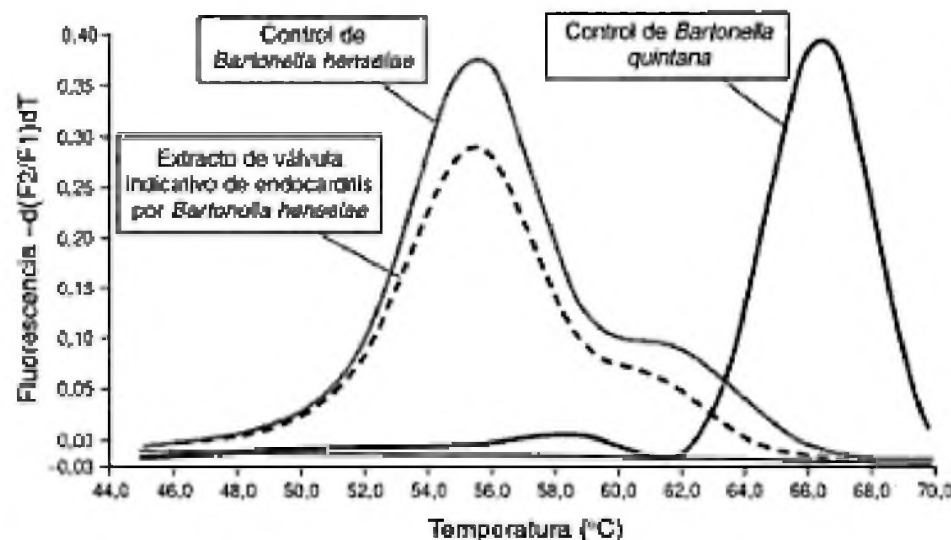


Figura 4-21 Análisis de la curva de fusión posamplificación. El análisis de esta curva puede usarse para diferenciar especies estrechamente relacionadas. En este ejemplo, el agente causal de la endocarditis con cultivos negativos, *Bartonella henselae*, se distingue de *Bartonella quintana* usando esta técnica.

trol de la infección. Por ejemplo, si se aísla *Pseudomonas aeruginosa* de cuatro bebés en la unidad de cuidados intensivos neonatales, el epidemiólogo del hospital puede desear saber si son las mismas especies bacterianas que han sido transferidas desde un punto de origen o si son especies diferentes y la infección ocurrió por simple azar. La determinación de que todas las bacterias son de la misma especie refuerza la evidencia de que hay un punto común de origen de transmisión y de que existe un problema en las técnicas o en la higiene del personal que puede corregirse.

Los métodos fenotípicos de tipificación de especies antecedieron a los métodos genotípicos, pero muchos de ellos carecen del alto grado de discriminación que se puede lograr con la tipificación genotípica. Algunos otros, como la tipificación por bacteriófagos, requieren un alto grado de especialización de los expertos y el mantenimiento de recursos considerables (colecciones de bacteriófagos). El perfil de sensibilidad bacteriana, aunque no tan definitivo como algunos de los métodos genotípicos de caracterización, es valioso, y usa información que a menudo es accesible porque las pruebas de sensibilidad se realizan para guiar la terapia. Es probable que las bacterias que tienen muy diferentes perfiles de sensibilidad antimicrobiana no sean idénticas y, por lo tanto, no se justifica la tipificación genotípica de especies, que es más costosa.

Los primeros intentos moleculares para demostrar parentesco entre grupos diferentes de bacterias se cumplieron con estudios de hibridación DNA-DNA simples. Los grupos de bacterias con altos grados de homología de DNA, como los determinados mediante estudios de hibridación DNA-DNA, se consideraron más relacionados que los grupos que tenían poca homología en el DNA cuando se los comparaba entre sí. Para la mayoría, estos estudios confirmaron la validez de la prueba fenotípica. Por ejemplo, los estudios de hibridación entre *Staphylococcus* y *Micrococcus*, que son de la misma familia, pudieron demostrar mayor homología que una comparación entre *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circular que están presentes en muchas bacterias y existen en forma independiente del DNA cromosómico. Son importantes porque pueden contener genes responsables de la virulencia, incluidos los que imparten resistencia a los antimicrobianos. También pueden difundirse de una bacteria a otra mediante la conjugación y, por lo tanto, diseminar esos genes. El desarrollo de las técnicas de electroforesis que permiten la separación de los plásmidos del DNA cromosómico y la diferenciación de los plásmidos entre sí hizo posible la caracterización de los plásmidos como una

forma primitiva de tipificación de especies. La caracterización de plásmidos fue uno de los primeros métodos usados para determinar el parentesco entre especies.

Se describieron muchos métodos genéticos para analizar el parentesco de los microorganismos. Entre los métodos que no se tratarán aquí pero que han sido útiles se incluyen la ribotipificación, el análisis de DNA polimorfo amplificado aleatorio (RAPD), y *spoligotyping*, entre otros. Los métodos de tipificación molecular pueden ser categorizados como aquellos que requieren amplificación de ácidos nucleicos para el proceso de tipificación (métodos basados en la amplificación) y aquellos que no (métodos basados en la no amplificación). En este capítulo se describirá un método basado en la no amplificación: la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), considerado por muchos el estándar para la tipificación microbiana. Se tratarán dos métodos de tipificación basados en la amplificación: PCR-RFLP, que combina las ventajas de la PCR con la tipificación por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, y Rep-PCR, una técnica relativamente nueva disponible en el mercado que usa, con el propósito de tipificar, elementos genéticos repetitivos que se encuentran naturalmente en las bacterias.

Tipificación no basada en la amplificación

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO

Existen numerosos métodos de tipificación de especies, con variaciones en el grado de discriminación de detección, en el costo y en la facilidad de uso. Muchos se basan en el uso de un grupo de enzimas llamadas endonucleasas de restricción. Éstas son enzimas que escinden naturalmente DNA bicatenario, basadas en secuencias particulares llamadas sitios de restricción. Distintas enzimas producen escisiones basadas en diferentes secuencias y una variedad de endonucleasas de restricción se encuentran disponibles en el mercado. Cuando las enzimas escinden el DNA, los dos extremos producidos pueden ser romos o tener prominencias llamadas extremos cohesivos. Cuando se extrae de los organismos el DNA del plásmido o el cromosómico bacteriano y se exponen a una o más endonucleasas de restricción, se escindirán de acuerdo con las endonucleasas de restricción usadas y el número de sitios de restricción presentes en el DNA. Los fragmentos de DNA que resulten variarán en tamaño y pueden separarse mediante electroforesis en gel y visualizarse por tinción con bromuro de etilo. Éste es un análisis RFLP. Es probable que los microorganismos con el mismo patrón RFLP estén estrechamente relacionados, mientras que aquellos con patrones RFLP muy diferentes lo estén

menos. Aunque los patrones RFLP son altamente reproducibles y muy exactos, es posible que surjan problemas en la determinación de cientos de fragmentos de DNA que pueden originarse después de la digestión que produce la enzima de restricción. La PFGE fue ideada como una manera de simplificar la tipificación RFLP.

La PFGE es considerada por muchos la forma estándar de la tipificación de especies, con la cual deberían compararse los nuevos métodos. Resumiendo, esta técnica comienza con la extracción del DNA cromosómico bacteriano de las especies de interés, que se exponen a una variedad de endonucleasas de restricción. El tipo de endonucleasa de restricción usada suele estar determinado por el tipo de bacteria que se analiza, basado en una investigación previa que ha demostrado la eficacia de estas enzimas. Como se expuso antes, las endonucleasas de restricción cortan el DNA cromosómico en diversos fragmentos, según el número de sitios de restricción de aquella hebra particular. Los fragmentos del DNA cromosómico se separan luego usando un tipo especializado de electroforesis. El perfil de restricción cromosómico resultante de la PFGE suele producir 5-20 fragmentos con tamaños que varían entre 10 y 800 kb^{136,340} (fig. 4-22). Estos fragmentos se visualizan, se fotografían y se someten a análisis de imagen. Luego se utilizan programas de computación para determinar si las hebras en análisis son distinguibles o indistinguibles y el grado de detección. El proceso ha sido denominado huellas del DNA (DNA fingerprinting) cuando se combina el proceso de RFLP con la transferencia Southern blot y la hibridación de sondas.³⁵⁰

Tipificación basada en la amplificación

Varios métodos posamplificación de análisis pueden usarse para la tipificación microbiana: el análisis del polimorfismo de conformación monocatenaria, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados, la PCR cebada arbitrariamente, el análisis de RFLP del producto de la PCR (PCR-RFLP) y el análisis de los elementos repetitivos presentes en genomas bacterianos obtenidos por PCR (rep-PCR). El detalle de estos métodos excedería el alcance de este libro, por lo que trataremos brevemente los dos tipos de análisis más recientes: PCR-RFLP y rep-PCR, como ejemplos de métodos basados en amplificación de tipificación microbiana.

PCR-RFLP

Al tiempo que las endonucleasas de restricción pueden usarse para ligar el DNA cromosómico de la bacteria, estas enzimas también pueden utilizarse para escindir el amplicón. La selec-

ción de la o las endonucleasas usadas con PCR-RFLP debe ser cuidadosa porque el amplicón es mucho más pequeño que el cromosoma bacteriano y es menos probable que contenga sitios de restricción azarosos. Las enzimas a menudo se eligen basándose en el conocimiento previo de los sitios de restricción que están presentes de modo variable en los amplicones y, por lo tanto, pueden usarse para la comparación de hebras. El tamaño del amplicón y el número de posibles sitios de restricción que puede contener imponen limitaciones a las capacidades diferenciadoras de esta tecnología.

El análisis de RFLP del producto obtenido por PCR se realiza por lo común mediante ensayos dirigidos contra el rDNA. Cuando se analiza por RFLP el producto obtenido por PCR de un ensayo dirigido al rDNA, se puede llamar ribotipificación-PCR. Incluso cuando se analiza el rDNA, es importante usar como dianas áreas particulares, para lograr información específica de tipo.^{163,178} PCR-RFLP se ha usado para tipificar todos los tipos de microorganismos, incluidas bacterias como especies de *Campylobacter* y *Borrelia* y hongos atípicos, como *Pneumocystis jirovecii*.^{25,154,191} Además de las comparaciones de especies, los patrones de PCR-RFLP se pueden usar para la identificación de microorganismos. Este tipo de aplicación se basa en el uso de cebadores de PCR altamente específicos. Esta técnica, por ejemplo, se ha usado para identificar bacterias con requerimientos nutricionales especiales, como especies de *Bartonella*, y parásitos difíciles de identificar, como anquilostomas y filarias.^{101,102,165,283} También ha sido valiosa para la diferenciación de especies de *Nocardia*, lo cual es importante desde el punto de vista clínico debido a las diferencias en la sensibilidad a los antimicrobianos dentro de este grupo.^{210,326} Los genes no ribosómicos que se pueden usar para PCR-RFLP son los genes de mantenimiento (*housekeeping*), como *rpoB*, o algún gen que pueda contener información específica de especie para un grupo particular de microorganismos (los genes que codifican las enzimas responsables de la hidrólisis del hipurato de *Campylobacter jejuni*).^{160,283,327}

rep-PCR

Los elementos repetitivos del DNA del genoma procarionte constituyen la base para el rep-PCR. Estos elementos repetitivos son los sitios de hibridación de los cebadores usados en el rep-PCR. Por amplificación de la PCR, estos cebadores, complementarios a las secuencias repetitivas intercaladas, generan fragmentos de DNA de tamaño variable que pueden separarse por electroforesis en gel (fig. 4-23). Los patrones electroforéticos pueden usarse para determinar el parentesco de las especies bacterianas que se comparan. Se puede usar un único grupo de



Figura 4-22 Aislamiento patológico de *Pasteurella multocida*. El análisis de una cepa patológica de *Pasteurella multocida* (aislamiento clínico) fue genéticamente indistinguible de dos cepas diferentes desde el punto de vista fenotípico de *P. multocida* obtenidas del gato del paciente afectado, pero es claramente distinguible de la especie control del laboratorio.

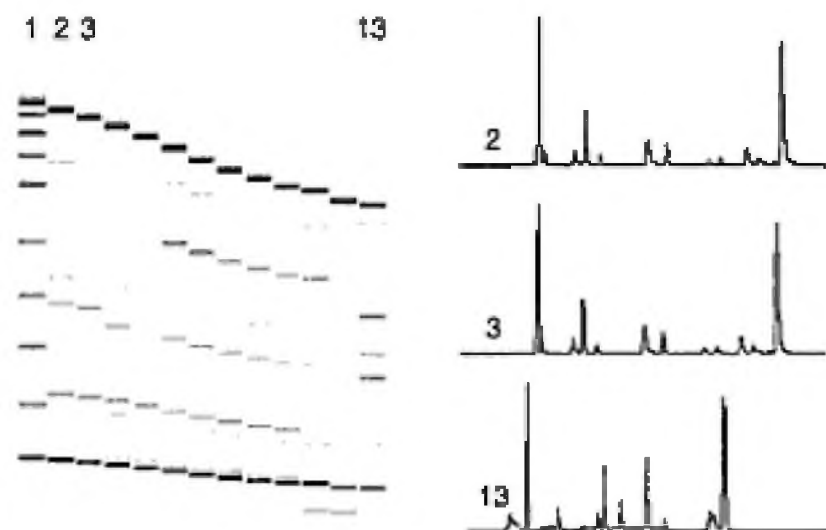


Figura 4-23 Rep-PCR de cepas aisladas de *Staphylococcus*. El análisis de los fragmentos (derecha) refleja los patrones de las bandas que se producen en el gel después de rep-PCR. La escala (carril 1) se usa como referencia comparativa. Los fragmentos de las cepas que se muestran en los carriles 2 y 3 son indistinguibles, mientras que son claramente diferentes de los producidos por la cepa que se muestra en el carril 13.

cebadores para una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, o más de un grupo dirigido a distintos elementos repetitivos. Rep-PCR se usó para tipificar *E. coli* enterohemorrágica aislada para investigar la transmisión animal a hombre.^{92,99,110} Como otro tipo de técnicas, se utilizó para pesquisar bacterias grampositivas y gramnegativas resistentes a agentes antimicrobianos y de importancia para la epidemiología hospitalaria.^{21,64,312,344} La información generada mediante rep-PCR también puede utilizarse para la identificación de microorganismos. Esta tecnología, por ejemplo, se usó para identificar microorganismos y analizar la diversidad con los géneros *Streptomyces* y para identificar especies de *Bartonella*.^{106,209}

APLICACIONES CLÍNICAS DE LA TIPIFICACIÓN MICROBIANA

Las comparaciones genéticas de microorganismos se han usado para investigar brotes o epidemias en hospitales, ciudades e incluso países.^{33,114,182,202,223,263,378} Es común que para investigar brotes hospitalarios se empleen métodos de tipificación genética. Se sospecha una posibilidad de brote cuando la frecuencia de aislamiento de un microorganismo patógeno excede la proporción usual de recuperación basal. Esto puede ser en un lugar en particular, como por ejemplo el número de MRSA aislados de sangre en el hospital en general o en una sala en particular, o puede ser el número de *Salmonellas* aisladas informadas para un recuento del departamento de salud.

Debido a la fragilidad de los recién nacidos prematuros, estas técnicas suelen emplearse para investigar brotes en las unidades de cuidados intensivos neonatales.^{180,223,298} Los métodos de tipificación molecular también se usan para investigar las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos.^{93,140,153,298} En algunos casos, se los utilizó para determinar el punto de origen de un brote. Los brotes y la transmisión de *M. tuberculosis* se estudian a menudo usando métodos de tipificación molecular.^{76,181,296,318,329,380}

En los Estados Unidos, los epidemiólogos están colaborando en todo el país para presentar la información, obtenida de la tipificación estandarizada de especies de bacterias que causan enfermedades transmitidas por alimentos, en una base de datos pública nacional en un programa denominado PulseNet. Se presentan los patrones de huellas del DNA por PFGE de participantes de los 50 estados. PulseNet se diseñó como un sistema de alarma temprano para las enfermedades transmisibles por alimentos. Se puede obtener más información acerca de

este esfuerzo nacional para pesquisar y reducir en forma rápida estas enfermedades en www.cdc.gov/pulsenet.

Conclusión

El número de aplicaciones moleculares para la detección y caracterización de todo tipo de microorganismos aumenta cada año y son muchos los comerciantes interesados en la aprobación de sus productos por parte de la FDA. Estas aplicaciones incluyen numerosos métodos de amplificación de señal, que en muchos casos pueden no ser tan sensibles como la PCR, pero que son simples de usar, pueden ser menos costosos y sobre ellos no pesa la sombra de la posible contaminación del amplificación. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos y los métodos para detectar los productos de amplificación han evolucionado rápidamente en la década pasada, que culmina en las aplicaciones de la PCR en tiempo real y de técnicas similares. Por último, el uso de la tipificación genética de microbios para demostrar el parentesco entre los microorganismos continúa proveyendo información útil con respecto a la transmisión de enfermedades infecciosas. Los métodos estándares, como la PFGE, siguen siendo útiles, pero los ensayos basados en la amplificación, como la rep-PCR, ahora disponible en el mercado, encontrarán probablemente su nicho debido a su utilidad, la facilidad de uso y el breve tiempo de realización.

REFERENCIAS

1. Abe C, et al. [Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by line probe assay (LIPA)]. *Kekkaku* 2000;75(10):575-581.
2. Acog Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Number 45, August 2003. Cervical cytology screening (replace committee opinion 152, March 1995). *Obstet Gynecol* 2003;102:417-427.
3. Ahmadian A, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 2000;280:103-110.
4. Akduman D, et al. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:281-283.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Ed. New York: Garland, 2002.
6. Alderborn A, Kristoffersson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* 2000;10:1249-1258.
7. Arbyn M, et al. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:240-293.

8. Arnoldi J, et al. Specie-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1992;66:618-623.
9. Ayano S, et al. Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol* 2004;29:206-209.
10. Asch N, et al. Emergence of rifampin-resistant *Mycobacterium equi* with several type of mutations in the *rpoB* gene among AIDS patients in northern Thailand. *J Clin Microbiol* 2003;41:2337-2340.
11. Baumner AJ, et al. RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Biosensors Bioelectronics* 2003;18:405-413.
12. Baghurst PA. Chip with everything. *Aust N Z J Public Health* 2002;26:106-107.
13. Balgunesch M, Lalitha MK, Nathaniel R. Rapid diagnosis of acute pyogenic meningitis by a combined PCR dot-blot assay. *Mol Cell Probes* 2000;14:61-69.
14. Barnes DM, et al. In situ hybridization for *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsy specimens: quantitative evaluation of test performance in comparison with the CLONest and thioline stain. *J Clin Lab Anal* 1997;11:374-379.
15. Barfai Z, et al. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:3736-3739.
16. Bashir Ms. In situ hybridization for the identification of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol* 1994;47:862-864.
17. Bates P, Chabbert E, Lachaud L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J Clin Microbiol* 2003;41:2272.
18. Beck RC, Kohli DJ, Tushy MJ, et al. Detection of polyoma virus in brain tissue of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by real-time PCR and pyrosequencing. *Diag Mol Pathol* 2004;13:15-21.
19. Bej AK, Mahlabani MH, Miller R, et al. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1991;4:353-365.
20. Bell A, Ranford-Castworthy L. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002;18:338.
21. Borlas J, et al. In situ hybridization and direct fluorescence antibodies for the detection of *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue from patients with reactive arthritis. *J Clin Pathol* 1998;51:803-806.
22. Bialek R, et al. PCR assays for identification of *Coxiella burnetii* based on the nucleotide sequence of the antigen 23kDa-antigen. *J Clin Microbiol* 2004;42:778-783.
23. Biddick R, et al. Evidence of transmission of *Bordetella pertussis*. *Bordetella pertussis* and *Bordetella pertussis* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003;228:57-62.
24. Boddington R, Rogall T, Floh T, Blocker H, Botger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990;28:1751-1759.
25. Bouché C, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 2004;42:45-51.
26. Borna HU, et al. Differential in situ hybridization for herpes simplex virus typing in routine skin biopsies. *J Virol Meth* 1995;53:37-45.
27. Bove K, Hegdal E, Berge M. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers. *Microbiol Res* 1999;154:23-26.
28. Buzetti M, et al. Comparison between hybrid capture II and polymerase chain reaction results among women at low risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol* 2000;10:466.
29. Buzette S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:505-511.
30. Byles C, et al. Evaluation of viral resistance to reverse transcriptase inhibitors (RTI) in HIV-1-infected patients before and after 6 months of single or double antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis* 2001;5:177-182.
31. Bryant PA, et al. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004;4:100-111.
32. Calzavara AM, et al. Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated cytomegalovirus DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:3509-3513.
33. Cao V, et al. Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agent Chemother* 2002;46:3739-3743.
34. Cavenion A. "FBI have a genome with chips, please." *J Cell Sci* 2000;113(Pt20):3543-3544.
35. Cavusoglu C, et al. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4435-4438.
36. Chan JK, et al. A study of the association of Epstein-Barr virus with Burkitt's lymphoma occurring in a Chinese population. *Histopathology* 1995;26:239-245.
37. Chang WN, et al. Septic cavernous sinus thrombosis due to *Streptococcus constellatus* infection. *J Formos Med Assoc* 2003;102:733-736.
38. Chapin KC, Blake P, Wilson CD. Performance characteristics and utilization of rapid antigen test, DNA probe, and culture for detection of group A streptococci in an acute care clinic. *J Clin Microbiol* 2002;40:4207-4210.
39. Chapin K, Musgnag M. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:4324-4327.
40. Chessman SJ, et al. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Mol Biochem Parasitol* 2003;131:85-91.
41. Chernik K, Posaels F. Molecular diagnosis of non-tuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:77-83.
42. Chernoff DN. The significance of HIV viral load assay precision: a review of the package insert specifications of two commercial kits. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chicago)* 2002;1:134-140.
43. Chopra P, Misra LS, Singh Y. New drug targets for *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* 2003;117:1-9.
44. Clarke JR. Molecular diagnosis of HIV. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2:233-9.
45. Clarke LM, Sierra MS, Daidone BJ, et al. Comparison of the Syva MicroTrak enzyme immunoassay and Gen-Probe PACE 2 with cell culture for diagnosis of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in a high-prevalence female population. *J Clin Microbiol* 1990;31:968-971.
46. Clavel C, et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998;51:737-740.
47. Cleary TJ, et al. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorescent probe. *J Clin Microbiol* 2003;41:4783-4786.
48. Cloud JL, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Neisseria* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004;42:578-584.
49. Cloud JL, et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002;40:400-406.
50. Cohen DM. Antiviral Drug Resistance. *Ann NY Acad Sci* 1990;616:224-237.
51. Connor L, et al. Successful HCV genotyping of previously failed and low viral load specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay. *J Clin Virol* 2003;28:14-26.
52. Coombs RW, et al. Development and evaluation of a "real-time" RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus. RNA in CSF and throat swab samples. *J Med Virol* 2002;67:555-562.
53. Curson D, et al. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diag Microbiol Infect Dis* 1999;35:105-108.
54. Costa JM, et al. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma reactiva* after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2000;38:2929-2932.
55. Costa MC, et al. Dihydropteroate synthase (dhps) genotyping by PCR-RFLP analysis of *Pneumocystis jirovecii* repeated isolates from HIV-infected patients: a preliminary study. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(Suppl):607-608.
56. Cote S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3631-3635.
57. Cummings CA, et al. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* 2004;186:1484-1492.
58. Cummings KL, Tulehm RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:53-59.
59. Dai CY, et al. Clinical evaluation of the COBAS AmpliCor HIV monitor test for measuring serum HIV DNA and comparison with the Quantiplex branched DNA signal amplification assay in Taiwan. *J Clin Pathol* 2004;57:141-145.
60. Daly JA, Clifton NL, Seskin KC, Gooch WM III. Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, and *Enterobacter* spp. from pediatric patients with significant infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:80-82.
61. Darvin LH, et al. Comparison of Digene hybrid capture 2 and conventional culture for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:641-644.
62. Darvin LH, et al. Evaluation of the Hybrid Capture 2 CT/NG DNA test and the GenProbe PACE 2 tests from the same male urethral swab specimens. *Sex Transm Dis* 2002;29:576-580.
63. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Ann J Med* 1999;107:26B: 215-265.
64. Deere D, et al. Characterization of CMV-type beta-lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:681-688.
65. De Clercq P, et al. Efficiency of the hybrid capture 2 HPV DNA test in cervical cancer screening: a study by the French Society of Clinical Cytology. *Ann J Clin Pathol* 2003;120:492-499.
66. De Oliveira MM, et al. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. *J Microbiol Methods* 2003;53:335-342.
67. Derdikman L, et al. Performance of the VERSANT HIV-1 resistance assays (VIRA) for detecting drug resistance in therapy-naïve patients infected with different HIV-1 subtypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:119-124.
68. Desjardins LE, et al. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1984-1988.
69. Dhanraj T, et al. Detection of *Bordetella pertussis* DNA in patients with septicemic melioidosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:609-614.
70. Diemen DE, Libman MD, Lebel P. Confirmation by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 2002;40:4036-4039.
71. Dolmer P, et al. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J Clin Microbiol* 1996;34:866-869.
72. Duarte TA, Hindler JA, Berlin OG, Bruckner DA. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1987;25: 1442-1445.

73. Deantonio M, et al. *tpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia* and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol* 2001;42:497-504.
74. Deantonio M, Rausch D. *tpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 2002;40:1333-1338.
75. D'Amato DJ, Jynkas LA. Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of *Salmonella enterica* from foods. *J Applied Microbiol* 2003;95:1343-1350.
76. Durmaz R, et al. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microb Drug Resist* 2003;9:361-366.
77. Ebihara T, et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol* 2004;42:126-132.
78. Elahi K, et al. Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing. *J Virol Methods* 2003;109:171-176.
79. Elbeik T, et al. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the Bayer VERSANT HIV RNA 3.0 assay (tDNA). *J Clin Microbiol* 2004;42:563-569.
80. Elbeik T, et al. Comparative analysis of HIV-1 viral load assay on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor -version 1.5. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:330-339.
81. Elbeik T, Lofus RA, Beninger S. Health care industries' perspective of viral load assay: the VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2:275-285.
82. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JI. Recent advances in the polymerase chain reaction [Review]. *Science* 1991;252:1643-1651.
83. Fabre R, et al. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitol* 2004;128(Pt 1):15-21.
84. Farrell DJ. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cepi nested PCR and 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:386-390.
85. Farrell DJ, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* with both *ermB* and *mechA*-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2004;42:764-768.
86. Farrell DJ, Steerly TJ. Urinary screening for *Neisseria gonorrhoeae* in asymptomatic individuals from Queensland, Australia: an evaluation using three nucleic acid amplification methods. *Pathology* 2001;13:204-205.
87. Farrell DJ, Truby JM, Brown-ellor BA, et al. Rapid identification of *Neisseria* by Pyrosequencing IDSA. San Diego: XXXX, 2003.
88. Fedele CG, et al. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods* 1999;82:137-144.
89. Fessler E, et al. Quantitative detection of *Trichinella whipplei* DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:1119-1120.
90. Ferry C, Samuel D, Thiers V, et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C after liver transplantation. *J Clin Invest* 1992;89:1361-1365.
91. Fisher MA, Pukayis SB, Shizafek Tm. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* 2002;184:4023-4032.
92. Foley SL, et al. Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J Food Prot* 2005;67:651-657.
93. Fontaine M, Guillot E. Study of 16S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *PEMIS Microbiol Lett* 2003;226:237-243.
94. Fouad AF, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:3223-3231.
95. Foy CA, Parkes HC. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2001;47:990-1000.
96. Frias C, et al. Usefulness of adding multiplex nested-polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid samples to routine diagnostic testing for herpesvirus encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:670-672.
97. Fukushiro M, et al. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2003;41:2605-2615.
98. Gambosa F, et al. Comparative evaluation of two commercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:151-157.
99. Garcia A, Pira JG. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1502-1507.
100. Garcia CA, et al. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene. *Gene* 2000;253:249-257.
101. Gasser RB, et al. Rapid detection of closely-related filarial parasites using genetic markers in spcr rDNA. *Acta Trop* 1996;62:143-150.
102. Gasser RB, Stewart LE, Speare R. Genetic markers in ribosomal DNA for hook-worm identification. *Acta Trop* 1996;62:15-21.
103. Gauduchon V, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003;41:763-766.
104. Gaydos CA, et al. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:304-309.
105. Gehr DJ, Ihl JR, Gustafson CA, Persing Dh. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1768-1772.
106. Geoprey M. *Chlamydia trachomatis* detected in human placenta. *J Clin Pathol* 1997;50:852-853.
107. Gerner JJ, et al. Comparison of the VERSANT HCV RNA qualitative assay (transcription-mediated amplification) and the COBAS AMPLICOR hepatitis C virus test version 2.0 in patients undergoing interferon-ribavirin therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:615-618.
108. Geza G, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective randomized, open-label trial. *Blood* 2003;101:5053-5060.
109. Ghazizadeh H, et al. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 2004;47(1-2):29-33.
110. Gleaves CA, et al. Multicenter evaluation of the Bayer VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay: analytical and clinical performance. *J Clin Virol* 2002;25(2):203-216.
111. Goldenberger D, et al. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997;35:2733-2739.
112. Gonzalez R, Hannon BA. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987;8:69-77.
113. Goullain K, et al. Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA by real-time PCR for occurrence of CMV disease in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2003;69:401-407.
114. Graham PL III, et al. Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:677-682.
115. Guho N, et al. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *PEMIS Microbiol Lett* 2003;219:87-91.
116. Guralo PA, Fran MR. Use of the Gen-Probe PACE system for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urethral samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;3:217-221.
117. Guas PR, et al. Detection of SARS coronavirus in plasma by real-time RT-PCR. *N Engl J Med* 2003;349:2466-2469.
118. Greenlee DJ, et al. Quantitation of CMV by real-time PCR in transfusable RBC unit. *Transfusion* 2002;42:403-408.
119. Grelson K, et al. PCR probes for the 16S rRNA gene of most species of atypical bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-351.
120. Grijalva M, et al. Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart* 2003;89:263-268.
121. Grondahl B, et al. Rapid identification of nine microorganism causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999;37:1-7.
122. Grude N, et al. Identification of *Aerococcus urinae* in urine samples. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:976-979.
123. Gu Z, et al. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:4646-4641.
124. Gunus B, et al. Evaluation of non-invasive clinical samples in chronic chlamydial prostates by using in situ hybridization. *Scan J Urol Nephrol* 1997;43:149-51.
125. Guney C, et al. Laboratory diagnosis of enteroviral infection of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:557-562.
126. Halbh-Hen NP, et al. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assay in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 2003;41:357-360.
127. Hadjipantelis E, et al. Aspecific enterovirus polymerase chain reaction in patients with aseptic meningitis: a sensitive test limited by amplification inhibitors. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:882-884.
128. Hall GS, Fran Rippin K, Washington JA. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30:3001-3004.
129. Hall L, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;41:1447-1453.
130. Hall L, Woldifiel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2004;42:622-626.
131. Hall L, Woldifiel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2003;41:5099-5102.
132. Hansson MS, et al. High frequency of competitive inhibition in the Roche Cobas AMPLICOR multiplex PCR for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:4393.
133. Hanspach K, et al. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation: pitfalls of phenotypic diagnosis by in vitro selection of all UL97 mutant train. *J Infect Dis* 2003;187:139-143.
134. Han XY, et al. Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable region of the 16S ribosomal RNA gene. *Am J Clin Pathol* 2002;118:796-801.
135. Hanzawa R, Murayama SY, Yamaguchi H. In-situ detection of *Aperitylus fraxigena*. *J Med Microbiol* 2000;49:285-290.
136. Hagg TN, Snkar G, Duck CS, Sommer SS. Specific amplification of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1184-1184.
137. Harder TC, et al. New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:4413-4419.

138. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 8):685-691.
139. Haudhofer AC, et al. Genotyping of hepatitis C virus-comparison of three assays. *J Clin Virol* 2003;27:276-285.
140. Hayashi Y, et al. A novel diagnostic method of *Parasitocystis carinii* in situ hybridization of ribosomal ribonucleic acid with biotinylated oligonucleotide probes. *Lab Invest* 1990;63:578-580.
141. Hayden RT, et al. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue sections. *Diag Mol Pathol* 2001;10:15-23.
142. Heim A, et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003;70:228-239.
143. Hendisha PH, Parlin L, Ylikoki J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:125-132.
144. Henriques Normark B, et al. Clonal analysis of *Streptococcus pneumoniae* non-susceptible to penicillin at day-care center with index cases, in a region with low incidence of resistance: emergence of an invasive type 35B clone among carriers. *Microb Drug Resist* 2003;9:337-344.
145. Hult B, et al. A fatal case of West Nile virus infection in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis* 2003;37:129-131.
146. Higgins JA, et al. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Microbiol Methods* 2001;47:323-337.
147. Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:2663-2666.
148. Hogardt M, et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:818-825.
149. Hong IS, et al. Comparative analysis of a liquid-based Pap test and concurrent HPV DNA assay of residual samples: a study of 608 cases. *Acta Cytol* 2002;46:828-834.
150. Huang C, et al. First isolation of West Nile virus from a patient with encephalitis in the United States. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1367-1371.
151. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. *AgarProbes*. *J Clin Microbiol* 1993;31:419-412.
152. Imhof A, et al. Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:558-60.
153. Ip M, et al. A longitudinal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Hong Kong teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:126-129.
154. Iriarte P, Owen RJ. PCR-RFLP analysis of the large subunit (23S) ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Let Appl Microbiol* 1996;23:163-166.
155. Jacques J, et al. New reverse transcription-PCR assay for rapid and sensitive detection of enterovirus genomes in cerebrospinal fluid specimens of patients with aseptic meningitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:5726-5728.
156. Jaubou R, Harin I, Jaureguierry G. Evidence by in situ hybridization for stage-specific expression of the ATP/ADP translocator mRNA in *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 1995;80:568-571.
157. Janket ML, et al. Differential regulation of host cellular genes by HIV-1 viral proteins R (Vpr): cDNA microarray analysis using isogenic virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:1126-1132.
158. Jansen GJ, et al. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 2000;38:814-817.
159. Jantos CA, et al. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic specimens from patients with coronary heart disease. *Clin Infect Dis* 1999;28:988-992.
160. Jank V, et al. Phenotypic and genotypic differentiation of *Campylobacter* spp. isolated from Austrian broiler farms: a comparison. *Avian Pathol* 2003;32:33-37.
161. Jauregui LH, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2001;39:2065-2071.
162. Jebbink J, et al. Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus: comparison of TaqMan probes and molecular beacons. *J Mol Diagn* 2003;5:15-20.
163. Jensen MA, Webster JA, Struss N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:945-952.
164. Jiang J, Jemencak JJ, Richards AL. Real-time PCR duplex assay for *Bacteroides parvazensis* and *Bacteroides reagents*. *Ann NY Acad Sci* 2003;990:302-310.
165. Joflet C, et al. Identification of *Bartonella* (Reichardtella) species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995;33:1879-1883.
166. Joo NT, Yoshimori RB, Mason OR, et al. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1161-1165.
167. Kaiser K, Rabendiren M, Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Parasitocystis carinii* hominis. *J Microbiol Methods* 2001;45:113-118.
168. Kantakamalakul W, et al. Prevalence of rubella virus and Human virus infection in commercial rodents and shrews trapped in Bangkok. *J Med Association Thailand* 2003;86:1008-1014.
169. Kares S, et al. Real-time PCR for rapid diagnosis of enteric and chlamydia infections using LightCycler. *J Clin Virol* 2004;29:99-104.
170. Kempf VA, Trebesius K, Auteneth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000;38:830-838.
171. Khamis A, et al. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Acidip* and *Bosea* species, including a strategy for choosing discriminative partial sequences. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6740-6749.
172. Kholonova I, et al. Identification of the bacterial etiology of culture-negative endocarditis by amplification and sequencing of a small ribosomal RNA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:9-11.
173. Kim BJ, et al. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 2004;42:1308-1312.
174. Kitagawa Y, et al. Rapid diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia by nested polymerase chain reaction. *Am Surg* 1996;224:665-671.
175. Kleier B, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999;37:2508-2517.
176. Koon J, et al. Evaluation of self-collected samples in contrast to practitioner collected samples for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* by polymerase chain reaction among women living in remote areas. *Sex Transm Dis* 2002;29:647-654.
177. Koopelman MH, et al. Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. *Transfusion* 2004;44:97-100.
178. Kostman JR, Edlund TD, Lipuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* determined by polymerase chain reaction subtyping. *J Clin Microbiol* 1992;30:2084-2087.
179. Koutouli C, et al. Elucidation of cytomegalovirus disease recurrence in an HIV-1-positive patient. *J Gastroenterol* 2003;38:643-646.
180. Kuboyama RH, De Oliveira HB, Moretti-Brauchini ML. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:490-494.
181. Kulaga S, et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in an immigrant population: evidence against a founder effect. *Am J Epidemiol* 2004;159:507-513.
182. Kumar R, et al. Changing pattern of biotypes, phage types and drug resistance of *Salmonella typhi* in Ludhiana during 1980-1999. *Ind J Med Res* 2001;113:175-180.
183. Kwok AY, et al. Species identification and phylogenetic relationships based on partial *rpoB* gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49(Pt 3):1181-92.
184. Kwon D, Chae C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet Pathol* 1999;36:308-313.
185. Lancioni RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;61:67-99.
186. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Comparison of the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assay for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:5006-5010.
187. Lang S, et al. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect* 2004;48:269-275.
188. Lanoit B, et al. BOX-pCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*: amended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereofuscus*, *S. fradiae*, *S. viridolus*, *S. coloratus*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeocephalus*. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:84-92.
189. Larsen HH, et al. Development of a rapid real-time PCR assay for quantitation of *Parasitocystis carinii* f. sp. *carinii*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2889-2891.
190. Lau LF, et al. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1290-1296.
191. Lee SH, et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from Korea by 16S rDNA sequence analysis and PCR-RFLP analysis of *ori* (5S)-*ori* (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;10(Pt 2):857-863.
192. Leslie DE, et al. An assessment of the Roche Amplicor *Chlamydia trachomatis*/ *Neisseria gonorrhoeae* multiplex PCR assay in routine diagnostic use on a variety of specimen types. *Commun Dis Intell* 2003;27:373-379.
193. Levy JE, Kleier B, Quinn WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002;40(Pt 3):331-335.
194. Lewis JS, Fakile O, Pons E, et al. Direct DNA probe assay for *Neisseria gonorrhoeae* in pharyngeal and rectal specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:2783-2785.
195. Li JJ, et al. Localization of human herpes-like virus type 8 in vascular endothelial cells and perivascular spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma lesions by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1996;148:1741-1748.
196. Lin MH, et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4121-4125.
197. Loeffler J, et al. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:207-212.
198. Louns K, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2003;41:4448-4450.
199. Loy JK, et al. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3439-3445.
200. Longu O, et al. Differentiation of *Nocardia* from rapidly growing *Mycobacterium* species by PCR-RFLP analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;18:13-18.
201. Lorch NS, et al. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;45:2775-2780.
202. MacDonald DM, et al. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salmon. British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiol Infect* 2004;132:283-289.
203. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190-212.

204. Mackay IM, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:100-105.
205. Maenzke J, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 2004;42:981-986.
206. Maniero G, Zonaro A, Albertini A, et al. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem* 1991;37:422-429.
207. Manz W, et al. In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 1995;141:29-39.
208. Mao W, et al. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:2293-2299.
209. Markoulakis P, et al. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4426-4432.
210. Managan-Villamil J, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1295-1298.
211. Managan-Villamil J, Farrell JJ, Reint J, et al. *Nocardia abscessus*: mediastinal involvement and superior vena-cava syndrome. Speciation by pyrosequencing. Poster presentation. Infectious Diseases Society of America. 41st Annual Meeting, October 9-12, 2003, San Diego.
212. Mania C, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3735-3742.
213. Manzano F, et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* 2001;39:2541-2547.
214. Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol* 2003;41:717-722.
215. McNical AM, Farquharson MA. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* 1997;182:250-261.
216. Melchers WJ, et al. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus type. Clinical evaluation and follow-up. *Am J Pathol* 1999;155:1473-1478.
217. Mokuadji J, et al. Evaluation of a polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay for the detection and identification of medically important fungi in bronchoalveolar lavage fluids. *Med Mycol* 2003;41:65-74.
218. Meliani L, et al. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(Suppl):651.
219. Meljmann A, et al. Evaluation of RIDDM, MicroSeq, and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* 2003;293:359-370.
220. Moriotti J, et al. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:1410-1413.
221. Mijs W, et al. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:794-802.
222. Miller B, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis—a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis* 2001;33:673-680.
223. Miller AC, et al. Clonal relationships in a shelter-associated outbreak of drug-resistant tuberculosis: 1983-1997. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:872-878.
224. Miller N, Infante S, Cleary T. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 2000;38:1915-1919.
225. Miranda-Novales G, et al. An outbreak due to *Streptococcus marcescens* in a neonatal intensive care unit typed by 2-day pulsed field gel electrophoresis protocol. *Arch Med Res* 2003;34:237-241.
226. Mitterer G, et al. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 16S ribosomal DNA sequences. *J Clin Microbiol* 2004;42:1048-1057.
227. Misdarress KJ, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in swab specimens by the Hybrid Capture II and BACe 2 nucleic acid probe tests. *Sex Transm Dis* 1999;26:303-308.
228. Mokrousov I, et al. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;47:2231-2235.
229. Mospocho S, et al. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enteroviruses in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:532-536.
230. Monstein H, Nikpour-Badr S, Jonasson J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *FEMS Microbiol Lett* 2001;199:103-107.
231. Monshies C, et al. Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2004;42:421-425.
232. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-65.
233. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
234. Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1988;26:2120-2123.
235. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991;30:7661-7666.
236. Niner B, et al. Identification of dematiophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *J Clin Microbiol* 2003;41:826-830.
237. Nolle FS, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J Clin Microbiol* 2003;41:1558-1564.
238. Nordstrom T, et al. Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Anal Biochem* 2000;282:186-193.
239. Oliveira K, et al. Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003;41:889-891.
240. Oliveira K, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2002;40:247-251.
241. Oliveira K, et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001;39:4138-4141.
242. O'Neill HD, et al. Real-time nested multiplex PCR for the detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella zoster virus. *J Med Virol* 2003;71:557-560.
243. Ortega-Lopez G, et al. Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection in aqueous and viscous of patients with uveitis. *Arch Med Res* 2003;34:116-119.
244. Padilla E, et al. Evaluation of a fluorescence hybridization assay using peptide nucleic acid probes for identification and differentiation of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in liquid cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:140-145.
245. Palladino S, et al. Use of real-time PCR and the LightCycler system for the rapid detection of *Parasarcocystis coccidia* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:233-236.
246. Pan S, Cole CL. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. *Infect Immun* 1995;63:3994-3999.
247. Pancholi J, Wu P, Della-Latta P. Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:231-242.
248. Park CS, Kim J, Montone KT. Detection of *Aspergillus* ribosomal RNA using biotinylated oligonucleotide probes. *Diagn Mol Pathol* 1997;6:255-260.
249. Patel JB, et al. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 2000;38:246-251.
250. Pauls RL, et al. A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting. *Am J Clin Pathol* 2003;120:560-566.
251. Pereira MC, et al. Ultrastructural distribution of poly (A) + RNA during *Trypanosoma cruzi* endosome interaction in vitro: a quantitative analysis of the total mRNA content by in situ hybridization. *J Eukaryot Microbiol* 2000;47:264-270.
252. Perez-Cano R, et al. Factor related to the chronicity and evolution of hepatitis C infection in patients co-infected by the human immunodeficiency virus. *Clin Microbiol Infect* 2002;4:589-597.
253. Perron C, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J Med Virol* 2002;67:246-252.
254. Persing D. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-1285.
255. Peter JB, Sewell IS. Molecular-based methods for quantifying HIV viral load. *AIDS Patient Care STDs* 2004;18:75-79.
256. Petráň B. 16S rDNA sequencing in the species identification of non-tuberculous mycobacteria. *Scand J Infect Dis* 2003;35:519-520.
257. Pham AS, et al. Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *Am J Clin Pathol* 2003;119:38-44.
258. Platak M, Luk KC, Williams B, Lifson JD. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechnique* 1993;14:70-81.
259. Poon LL, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assay. *Clin Chem* 2004;50:67-72.
260. Poon LL, et al. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003;28:233-238.
261. Post JC, et al. Development and validation of a multiplex PCR-based assay for the upper respiratory tract bacterial pathogens *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Mol Diagn* 1996;1:29-39.
262. Pranyachatigul C, et al. Development and evaluation of a one-tube seminested PCR assay for the detection and identification of *Penicillium nitroreducens*. *Mycoses* 2003;46:447-454.
263. Preliminary Foodnet Data On The Incidence Of Foodborne Illnesses-Selected Sites, United State, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:340-343.
264. Probst AM, Fritzer CR. Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water. *Mol Cell Probes* 1999;13:261-268.
265. Pryce TM, et al. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Med Mycol* 2004;5:369-381.
266. Pryce TM, et al. Real time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:487-496.
267. Qian KE, et al. Hepatitis C virus mixed genotype infection in patients on haemodialysis. *J Viral Hepat* 2000;7:153-160.
268. Qian Q, et al. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3578-3582.

269. Qin X, Urdahl KB. Pcr And Sequencing Of Independent Genetic Targets For The Diagnosis of Culture Negative Bacterial Endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;30:145-149.
270. Querida C, et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000;38:3061-3067.
271. Quint WG, et al. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPP1(4) PCR and HPV genotyping. *J Pathol* 2000;194:51-58.
272. Quirós E, Piedrola G, Maroto MC. Detection of enteroviral RNA by a new single-step PCR. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:415-419.
273. Qureshi MM, et al. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol* 2003;29:149-155.
274. Rafteran HF, et al. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and real-time fluorescence PCR. *J Clin Virol* 2002;25:155-164.
275. Itakawaka M, et al. Direct detection and identification of African trypanosomes by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2002;40:4295-4297.
276. Ranners C, et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000;283:2680-2685.
277. Rantakokko-Jalava K, et al. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:4304-4311.
278. Rantakokko-Jalava K, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32-39.
279. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4211-4217.
280. Re MC, et al. Analysis of HIV-1 drug resistant mutations by line probe assay and direct sequencing in a cohort of therapy naïve HIV-1 infected Italian patients. *BMC Microbiol* 2001;1:30.
281. Real SJ, Mitchell JL, Fink CG. LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2001;39:3056-3059.
282. Reischl U, et al. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:2853-2860.
283. Renesto F, et al. Use of *tpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 2001;39:430-437.
284. Riffard S, et al. Distribution of *trp*-related sequences in 39 species (48 serogroups) of *Legionellaceae*. *Epidemiol Infect* 1998;117:501-506.
285. Rigby S, et al. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2002;40:2182-2186.
286. Rindi L, et al. A real-time PCR assay for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2003;55:797-800.
287. Ringaert H, et al. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999;37:852-857.
288. Robert TC, Storch GA. Multiple PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:268-269.
289. Rodriguez-Barcadas MC, et al. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1089-1093.
290. Romanelli F, Ponceroy C. Human immunodeficiency virus drug resistance testing: state of the art in genotypic and phenotypic testing of antiretrovirals. *Pharmaceuticals* 2000;20:151-157.
291. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11:3-11.
292. Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem* 2000;286:282-288.
293. Rondini S, et al. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium avium* DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:4231-4237.
294. Rossau R, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif[®] TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2093-2098.
295. Rothman RE, et al. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002;186:1677-1681.
296. Ruddy MC, et al. Outbreak of isoniazid resistant tuberculosis in north London. *Thorax* 2004;59:279-285.
297. Ruiz M, et al. Direct detection of Rifampin- and Isoniazid-resistant mycobacterial tuberculosis in Auramine-Rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1585-1589.
298. Sainan L, et al. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:317-321.
299. Salomon R. Introduction to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Diag Mol Pathol* 1995;4:82-84.
300. Sanchez JL, Storch GA. Multiplex, quantitative, real-time PCR assay for cytomegalovirus and human DNA. *J Clin Microbiol* 2002;40:2381-2386.
301. Sanchez-Pecador R, Stempion MS, Urdul MS. Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 beta-lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *J Clin Microbiol* 1988;26:1931-1938.
302. Sa-Ngasang A, et al. Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:205-209.
303. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;98(22):12712-12717.
304. Scarpato C, et al. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3222-3227.
305. Schachler J, et al. Ability of the digene hybrid capture II test to identify *Citomegalia macchamii* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3668-3671.
306. Schinazi RF, Schüchter-Wirtz S, Stuyver C. Early detection of mixed mutations selected by antiretroviral agents in HIV-infected primary human lymphocytes. *Antivir Chem Chemother* 2001;12(Suppl 1):61-65.
307. Schnadtrah J, et al. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions: comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol* 2004;29:120-126.
308. Schulz A, et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1529-1535.
309. Schuurman T, et al. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004;42:734-740.
310. Seunck S, Verstraete W, Siciliano SD. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint local sources. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4942-4951.
311. Shaheduzzaman S, et al. Effects of HIV-1 Nef on cellular gene expression profiles. *J Biomed Sci* 2002;9:82-96.
312. Shannun KP, French GL. Increasing resistance to antituberculous agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital 1995-2000. *J Antimicrob Chemother* 2004;51:818-825.
313. Sharma M, et al. Rapid detection of mutations in *tpoB* gene of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by line probe assay. *Ind J Med Res* 2003;17:76-80.
314. Shrestha NK, et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:5121-5126.
315. Shrestha NK, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system. *J Clin Microbiol* 2002;40:2659-2661.
316. Sinitoir A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in *Enterococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3620-3622.
317. Singh DV. Hexaplex PCR for rapid detection of virulence factors. *Exp Rev Mol Diagn* 2003;3:781-784.
318. Skornikova OI, et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to rifampicin and isoniazid by molecular biological method. *Bull Exp Biol Med* 2003;136:271-275.
319. Smith AB, et al. Rapid detection of influenza A and B virus in clinical specimens by LightCycler real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003;28:51-58.
320. Smith K, Diggle MA, Clarke SC. Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 2):115-117.
321. Soffi Ibrahim M, et al. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3835-3839.
322. Song JH, et al. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1999;37:1439-1441.
323. Southern SA, Graham DA, Herrington CS. Discrimination of human papillomavirus types in low and high grade cervical squamous neoplasia by in situ hybridization. *Diag Mol Pathol* 1998;7:114-121.
324. Spiess B, et al. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:1811-1818.
325. Springer B, et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacterial molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:296-303.
326. Stenroos VA, et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomyces*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Thermomonas* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:817-827.
327. Steinhilberer I, et al. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotype and molecular methods. *J Appl Microbiol* 2001;90:470-475.
328. Stelzucht KA, et al. The impact on enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 1):529-526.
329. Stender H. PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:649-655.
330. Stender H, et al. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:830-837.
331. Stender H, et al. Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterial species in smears of mycobacterial cultures. *J Clin Microbiol* 1999;37:2760-2765.
332. Stocher M, et al. Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCR, complemented with a single multiple internal control. *J Clin Virol* 2004;29:171-178.

333. Stryer L. Biochemistry. 5th Ed. New York: Freeman, 2003.
334. Sommer M, et al. Evaluation of the LiPA HIV-1 RT assay version 1: comparison of sequence and hybridization based genotyping systems. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 3):S65-S72.
335. Sullis PM, et al. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4477-4482.
336. Sul Y, et al. Microarray analysis of cytokine and chemokine genes in the brain of macaques with SHIV-encephalitis. *J Med Primatol* 2003;32:229-239.
337. Tabrizi SN, et al. Evaluation of real time polymerase chain reaction assays for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples tested positive in the Roche Cobas AmpliCor assay. *Sex Transm Infect* 2004;80:66-71.
338. Teng YW, Procop GW, Poring DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43:2021-2038.
339. Tazi L, et al. Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:461-466.
340. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
341. Tong CY, et al. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999;52:257-263.
342. Tounsi E, Maronni A, Muzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 2003;41:4418-4426.
343. Tortoreto AM, et al. The European Confederation of Medical Mycology (EcMM) survey of candidemia in Italy: and fungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:679-682.
344. Totsdale PA, et al. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Bras J Infect Dis* 2001;7:32-43.
345. Tsuchi MJ, Procop GW. The rapid identification of routine clinical *Mycobacteria* by Pyrosequencing™. 42nd ICAAC Meeting, San Diego, CA, 2002.
346. Umensch TR, et al. Characterization of a putative nuclear receptor from *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:259-269.
347. Unerslund H, et al. Pyrosequencing as a method for grouping of *Listeria monocytogenes* strains on the basis of single-nucleotide polymorphisms in the *infB* gene. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5339-5342.
348. Urdan MS, Horn T, Falte TJ, et al. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser* 1991; 24:197-200.
349. Van Der Eijk AA, et al. Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent. *J Clin Virol* 2004;39:92-94.
350. Van Der Pol B, et al. Evaluation of the digene hybrid capture II assay with the Rapid Capture System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:3558-3564.
351. Van Der Pol B, et al. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CTNG test for *Neisseria gonorrhoeae* by retesting specimens with equivocal results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3002-3008.
352. Van Donge HR, et al. Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by using real-time PCR technology with 3'-inner genome binder-DNA probes. *J Clin Microbiol* 2003;41:4630-4635.
353. Van Doorslaer LJ, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PCMY line blot assay and the SPF10 line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:979-983.
354. Van T Wout AB, et al. Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4+ T-T-cell lines. *J Virol* 2003;77:1392-1402.
355. Vasef MA, Ferlito A, Weiss LM. Nasopharyngeal carcinoma with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus. *Ann Oto Rhin Laryn* 1997;106:348-356.
356. Velasquez JN, et al. In situ hybridization: a molecular approach for the diagnosis of the neosporidian parasite *Encephalitozoon leucon*. *Hum Pathol* 1999;30:54-58.
357. Verocini-Maciold MA, et al. Diagnosis of enterovirus infection in the first 2 months of life by real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2003;37:1-6.
358. Verstrepen WA, Braynsels P, Merrens AM. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 1):S39-S43.
359. Voldstedlund M, et al. Different polymerase chain reaction-based analyses for culture-negative endocarditis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2003;35:757-759.
360. Vukovic D, et al. Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in Belgrade, Central Serbia. *J Clin Microbiol* 2003;41:4372-4377.
361. Wagar E. Direct hybridization and amplification applications for the diagnosis of infectious diseases. *J Clin Lab Anal* 1996;10:312-325.
362. Wagner HE, et al. Longitudinal analysis of Epstein-Barr viral load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real-time polymerase chain reaction. *Transplantation* 2002;74:656-664.
363. Wang Z, et al. Effects of human immunodeficiency virus type 1 on astrocyte gene expression and function: potential role in neurodegeneration. *J Neurovirol* 2004;10 (Suppl 1):25-32.
364. Ward CL, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004;29:179-186.
365. Wasson K, Barry PA. Molecular characterization of *Encephalitozoon intestinalis* (Microsporid) replication kinetics in a murine intestinal cell line. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50:169-174.
366. Watkins-Riedel T, et al. Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42: 99-103.
367. Weinberg A, Schüssel D, Giller R. Molecular methods for cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40:4202-4206.
368. Westergren V, Bassiri M, Engstrand L. Bacteria Detected By Culture And 16s Rna Sequencing In Maxillary Sinus Samples From Intensive Care Unit Patients. *Laryngoscope* 2000;110:270-273.
369. Whaley DM, et al. Detection and differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 by a duplex LightCycler PCR that incorporates an internal control PCR reaction. *J Clin Virol* 2004;30:32-38.
370. Wilson DA, et al. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *J Clin Microbiol* 2003;41:3327-3330.
371. Wolf DM, et al. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:3922-3928.
372. Wu PC, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* 2003;41:1996-2001.
373. Xu J, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis: rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 2003;94:197-206.
374. Yang L, Wels JH, Eichwald E, et al. Heritable susceptibility to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis is dominant and is associated with persistence of high numbers of spirochetes in tissues. *Infect Immun* 1994;62:492-500.
375. Yao JD, et al. Multicenter evaluation of the VERSANT hepatitis B virus DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):800-806.
376. Young KK, Restick RM, Meyers TW. Detection of hepatitis C virus by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993;31: 882-886.
377. Zeiniger Z, et al. Diagnosis of *Branella endocarditis* by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):919-925.
378. Zeana C, et al. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24: 275-279.
379. Zerbi P, et al. Amplified in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *Mycobacterium* species on formalin-fixed, paraffin-embedded archival biopsy and autopsy samples. *Am J Clin Pathol* 2001;116:770-775.
380. Zimmerman RL, et al. Ultra fast identification of *Aspergillus* species in pulmonary cytology specimens by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2000;5:427-429.
381. Zurita M, Bieher D, Mansour TE. Identification, expression and in situ hybridization of an eggshell protein gene from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1989;37: 11-17.

Bacteriología médica: taxonomía, morfología, fisiología y virulencia

Taxonomía: clasificación, nomenclatura e identificación bacterianas

Denominación de las bacterias
Identificación fenotípica de las bacterias
Criterios filogenéticos para la
clasificación de las bacterias

Morfología y fisiología bacterianas básicas

Forma y tamaño de las bacterias
Estructura nuclear, replicación,
transcripción y traducción del DNA
Citoplasma
Membrana citoplasmática
Estructura de la pared celular bacteriana
Pared celular de las bacterias grampositivas
Pared celular de las bacterias gramnegativas
Pared celular de las bacterias ácido-alcohol
resistentes
Endosporas bacterianas
Estructuras de la superficie bacteriana
Cápsulas
Flagelos
Fimbrias (pili)

Intercambio genético y recombinación
en las bacterias

Requerimientos para el metabolismo
y el crecimiento bacterianos

Carbono
Dihóxido de carbono
Oxígeno
Nitrógeno

Factores de crecimiento

Cinética del crecimiento celular
bacteriano

Metabolismo bacteriano general
y generación de energía

Fermentación
Utilización del piruvato

Factores de virulencia bacterianos y patogenicidad

Definiciones y conceptos
Requerimientos para la patogenicidad
Factores de virulencia de los
microorganismos
Adhesinas
Agresinas
Exotoxinas y endotoxinas
Superantígenos bacterianos

Pasados más de tres siglos desde que Leeuwenhoek observara por primera vez las bacterias y los protozoos con su microscopio primitivo, se ha acumulado una gran cantidad de conocimiento acerca del mundo bacteriano. Los microorganismos se encuentran en todos los ambientes, incluidos el suelo, el agua y el aire. Son capaces de participar en todas las funciones vitales que se observan en las formas de vida superiores más complejas y están en asociación con el ambiente inerte y con las demás formas vivientes. Por sus actividades en estos ambientes, son una parte integrante del equilibrio de la vida. Los procesos genéticos y bioquímicos que ocurren en todas las formas de vida se han dilucidado usando microorganismos y sólo ahora se están apreciando por completo sus innumerables funciones en los ciclos del medioambiente. Por razones de espacio, los siguientes capítulos se ocupan de un número relativamente pequeño de microorganismos capaces de causar patologías y enfermedades en los seres humanos.

Hacia finales del siglo XIX, Louis Pasteur derribó de modo experimental el mito de la generación espontánea y Robert Koch, entre otros, demostró que los microorganismos podían causar enfermedades infecciosas, como carbunco y tuberculosis. Aunque las técnicas actuales permiten apreciaciones más directas de la virulencia y la patogenicidad microbianas, haciendo que los postulados originales de Koch sean casi inaplicables, estos principios fundamentales todavía son la base que explica la conexión inequívoca entre microorganismos y enfermedades infecciosas. Los **postulados de Koch** se reseñan en el recuadro 5-1.

Taxonomía: clasificación, nomenclatura e identificación bacterianas

La taxonomía de las bacterias se refiere de modo específico a tres conceptos básicos: clasificación, nomenclatura e identificación. La **clasificación** es el proceso de división sistemática de los organismos en grupos; la especie es el nivel de división mínimo y el más definitivo. La clasificación también se refiere al agrupamiento de las especies descritas en géneros mediante familias, órdenes, clases y filos. Históricamente, surgieron especies nuevas a partir del reconocimiento de cepas que tienen características fenotípicas diferentes de microorganismos similares (p. ej., otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*). Estos aislamientos se comparan luego con otros organismos usando una gran batería de pruebas fenotípicas. Las aplicaciones actuales de las técnicas moleculares (p. ej., hibridación del DNA, secuenciación del DNA y amplificación basada en la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) han permitido a los

taxonomistas identificar secuencias microbianas características y otros elementos que establecen el parentesco genético entre diferentes microorganismos. Se podría proponer una nueva taxonomía basada en comparaciones sistemáticas de rasgos fenotípicos, quimiotaxonómicos y genéticos. El proceso de denominación de los microorganismos se establece mediante reglas de nomenclatura.

Denominación de las bacterias

Los intentos por codificar la taxonomía y la nomenclatura de las bacterias comenzaron formalmente a principios del siglo XX con los trabajos de Chester, Buchanan y otros.^{12,18,23,100} En ese momento se reunieron los comités de microbiólogos interesados en organizar la taxonomía bacteriana, para decretar leyes relacionadas con la validación de los nuevos nombres y establecer procedimientos con el fin de cambiar la nomenclatura (véase recuadro 5-2). Estos debates dieron lugar a la publicación del *Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias* en 1948. La revisión secuencial de este documento fue publicado por el International Committee of Systematic Bacteriology en 1958, 1973 y 1992.^{123,126} Las prioridades y las reglas para la denominación de una bacteria se establecieron en principio el 1º de mayo de 1953; el 1º de enero de 1980 se publicó la primera "Lista aprobada de nombres bacterianos" en el *International Journal of Systematic Bacteriology* (ISB).¹²⁴ Esta lista fue luego enmendada y publicada nuevamente en 1989.¹²⁵ Las ediciones trimestrales del ISB (ahora llamado *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, IJSEM) difunden listas con los nombres de las nuevas especies (listas de validación). Las descripciones de las bacterias nuevas pueden publicarse en IJSEM o en otras revistas extranjeras y norteamericanas. Si la descripción se publica en una revista que no sea IJSEM, el nombre y la referencia a la bibliografía que contiene su descripción pueden aparecer después en una lista de validación de IJSEM. Al comienzo del nuevo milenio han aparecido 4 314 nombres de especies procariontes en la "Lista aprobada de nombres bacterianos" de IJSEM, o en las Listas de validación de IJSEM.^{124,125} Hace poco, se han propuesto nombres para especies actualmente no cultivables, pero que han sido caracterizadas por métodos moleculares (véase más adelante).^{98,99} Cualquier investigador puede proponer designaciones de nuevas especies o revisiones de las existentes, y los criterios para la publicación incluyen el nombre de las especies nuevas (de acuerdo con las reglas citadas en el recuadro 5-2), la descripción detallada de las características genéticas, bioquímicas y morfológicas del microorganismo, y la designación de un cultivo vivo como la "cepa de referencia". Esta cepa de referencia se deposita en las colecciones de cultivos de referencia (p. ej., la *American Type Culture Collection* [ATCC] y la *National Type Culture Collection* [NTCC]) así las nuevas especies estarán disponibles para otros investigadores. Se pone en tela de juicio la validez de los nombres de especies nuevas mediante la publicación de una "solicitud para una opinión" de la Judicial Commission of the International Union of Microbiological Societies. Esta comisión por lo general remite la solicitud a comités más pequeños que se ocupan de grupos específicos de microorganismos, como *Enterobacteriaceae* o *Pasteurellaceae*.

Identificación fenotípica de las bacterias

Los procedimientos de identificación fenotípica continúan siendo el principal método de identificación de la mayoría de

Recuadro 5-1 Postulados de Koch

1. Un microorganismo dado debe estar presente en todos los casos de una enfermedad infecciosa determinada.
2. Los microorganismos pueden ser aislados en muestras asociadas con ese estado de enfermedad.
3. La inoculación del microorganismo aislado a animales susceptibles produce una enfermedad similar.
4. El mismo microorganismo asociado con la enfermedad puede ser aislado en muestras representativas de animales infectados de modo experimental.

Recuadro 5-2 Reglas de la nomenclatura de las bacterias

1. Existe sólo un nombre correcto para un microorganismo. Cuando hay más de uno para la misma especie, tiene prioridad el legitimado con más antigüedad. De modo ocasional, nombres propuestos y aceptados pueden ser cambiados para indicar las terminaciones latinizadas adecuadas (p. ej., *Alloisococcus otitis* ha sido cambiado a *Alloisococcus otitidis*).³¹²
2. Los nombres que induzcan a error o a confusión deben rechazarse.
3. Todos los nombres están en latín o "latinizados" (terminaciones dadas que concuerden en los términos de uso adecuado y género [masculino, femenino, neutro]), sin hacer caso del origen.
4. La primera palabra del nombre (nombre del género) está siempre en mayúscula.
5. La segunda palabra (especie o epíteto específico) se escribe con minúscula.
6. El nombre del género y de la especie, mencionados juntos como la especie, están subrayados o en itálica cuando aparecen impresos.
7. El nombre correcto de una especie o las designaciones taxonómicas superiores se determinan por la publicación válida, la legitimidad del nombre con respecto a las reglas de nomenclatura y la prioridad de publicación.
8. Los nombres del género y la especie que aparecen en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM* (formalmente *International Journal of Systematic Bacteriology, IJSB*) pueden ser cambiados de acuerdo con las siguientes reglas.
 - a. Cuando se transfiere una especie de un género a otro, el epíteto de especie se retiene (p. ej., *Campylobacter pylori* se convirtió en *Helicobacter pylori*).
 - b. Si se encuentra que una cepa de referencia en realidad pertenece a otro género, el género de la cepa de referencia no se considera válido.
 - c. Si un microorganismo se incluye en dos o más géneros o tiene dos o más designaciones de especie, el nombre del género/especie que contiene la cepa de referencia correcta se considera el nombre válido.

las cepas aisladas en el laboratorio de microbiología clínica (véase recuadro 5-3). El esfuerzo principal de identificación está en el género y la especie, sin procurar describir la jerarquía a la que pertenece un microorganismo dado. En la actualidad, los esquemas taxonómicos, como los publicados en el volumen 4 (1984-1989) de la edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, la edición de 1994 del *Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey*, y varios manuales y revistas de laboratorio muestran agrupamientos de bacterias en categorías no jerárquicas basadas estrictamente en características fenotípicas.^{60,77,129,133,137} En el prefacio de la edición de 1994 del *Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey*, J. G. Holt, el director en jefe, establece que "el ordenamiento del libro es estrictamente fenotípico; no se intenta ofrecer una clasificación natural. El orden elegido es utilitario y procura ayudar a la identificación de las bacterias".⁶⁰ En este contexto, una definición operativa de una especie es un conjunto de cepas que comparten muchas características fenotípicas. Una cepa bacteriana se deriva de un único microorganismo aislado en cultivo, y la cepa de referencia de una especie representa un ejemplo invariable de la especie en cuestión y es parte de una colección de cultivos (p. ej., ATCC). Las especies están asignadas a los géneros definidos morfológica y bioquímicamente, que a su vez, están asignados a familias, cada una de las cuales también tiene características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas determinadas. Dado que las controversias y decisiones taxonómicas son arbitradas por un comité, el conocimiento individual y los sesgos introducidos en esta instancia hacen que la clasificación fenotípica por encima de las categorías de especies sea algo arbitraria.¹²⁴ Las reglas de nomenclatura implican una clasificación jerárquica; sin embargo, estos esquemas de clasificación no jerárquica han sido aceptados por años, como convención taxonómica. En consecuencia, los nombres de las familias tienen las terminaciones latinizadas *-aceae* (la familia *Enterobacteriaceae*, la familia *Neisseriaceae*), los nombres de los órdenes tienen terminaciones *-ales* (orden *Eubacteriales*) y el nombre de las tribus terminan en *-eae* (p. ej., la tribu *Proteae*). La incorporación a una base de datos de ordenador de la información fenotípica de los sistemas de identificación disponibles en el mercado ha proporcionado una organización sistemática de gran cantidad de datos fenotípicos acumulados. No existe duda de que estos datos continua-

rán acumulándose para servir al laboratorio clínico como el principal método de identificación de las bacterias. Sin embargo, la aparición de técnicas genéticas contundentes y sofisticadas ha convertido la clasificación bacteriana jerárquica no sólo en una posibilidad sino en un hecho inevitable.

Criterios filogenéticos para la clasificación de las bacterias

Dado que la secuencia de nucleótidos de DNA es única para especies individuales de microorganismos, el análisis del parentesco de los ácidos nucleicos microbianos fue reconocido como una posible herramienta para descifrar la taxonomía y la nomenclatura bacterianas. En un principio, el DNA fue analizado por su contenido en G + C% (porcentaje de guanina + citosina). Sin embargo, este análisis está limitado por el hecho de que dos organismos con secuencias divergentes de DNA pueden tener contenidos similares de G + C%.¹⁴⁰ Con posterioridad, se encontró que la hibridación DNA-DNA generaba información más útil. El DNA bicatenario puede separarse en sus dos hebras constitutivas mediante la exposición al calor o a concentraciones salinas altas. El enfriamiento o la disminución de la concentración salina hará que las dos hebras se vuelvan a unir o se hibriden en las formas de doble hebra por apareamiento específico de bases (véase más adelante). El grado en que las dos hebras simples de DNA se vuelven a unir es una medida indirecta de su parentesco.¹³¹ Usando esta técnica, se encontró que los microorganismos con cerca del 15% o más de errores de apareamiento en la secuencia no se volvían a unir en condiciones ideales; así, los DNA de microorganismos poco relacionados no se hibridarán. Como consecuencia, la hibridación DNA-DNA ha sido más útil para la comparación de especies o subespecies de microorganismos. En este contexto, una especie bacteriana puede definirse como un grupo de bacterias que muestran un parentesco de DNA mayor del 70-75% con 5% o menos de divergencia en las secuencias de nucleótidos.^{131,133}

En la década de 1970, los genetistas comenzaron a investigar las secuencias de RNA ribosómico como un método para demostrar el parentesco microbiano. Este trabajo se centró en la molécula de 16S rRNA, que es una parte de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (véase más adelante). Esta molécula de 1 500 a 1 800 nucleótidos de longitud se aísla con faci-

Recuadro 5-3 Métodos para la caracterización de microorganismos en el laboratorio de microbiología clínica

1. **Morfología celular**— Incluye el tamaño celular, la forma celular y la distribución de las células unas con respecto a otras.
2. **Características de tinción**— Se refiere por lo común a las tinciones de Gram y la ácido-alcohol resistente, pero puede incluir la descripción de otras características microscópicas, como la presencia de esporas, gránulos metacromáticos o vacuolas.
3. **Movilidad**— La movilidad puede observarse en el microscopio con una preparación húmeda o por inoculación en medios de movilidad semisólidos.
4. **Presencia o ausencia de esporas**— La presencia de esporas es particularmente útil para identificar *Bacillus*, *Clostridium* y especies relacionadas. Las esporas por lo general se pueden distinguir en las tinciones de Gram en preparaciones húmedas, pero las tinciones específicas para esporas son a veces útiles.
5. **Características de crecimiento**.
 - a. **Rapidez de crecimiento**— La mayoría de los microorganismos aislados en el laboratorio clínico se desarrollan dentro de 1 a 2 días. Sin embargo, ciertas bacterias (p. ej., actinomicetos, micobacterias) y hongos pueden tomar un tiempo considerablemente más largo.
 - b. **Morfología de las colonias en el medio de crecimiento**— Las bacterias varían en su aspecto en medios de cultivo sólidos. Con experiencia, la morfología de las colonias en varios medios acoplada con algunas pruebas rápidas (p. ej., oxidasa, catalasa) a menudo es suficiente para la caracterización del género de microorganismos que se desarrollan a partir de muestras clínicas.
 - c. **Condiciones atmosféricas óptimas para el desarrollo**— Los microorganismos se pueden caracterizar por sus requerimientos para el oxígeno y, según ese requerimiento, se pueden clasificar como aerobios (requieren O_2), facultativos (pueden crecer en presencia o ausencia de O_2) o anaerobios (crecimiento óptimo en ausencia de O_2). El crecimiento de la mayoría de los microorganismos también se estimula por dióxido de carbono, y el crecimiento de los capnófilos depende del CO_2 (p. ej., especies de *Neisseria*). Otros microorganismos, como especies de *Campylobacter*, pueden necesitar atmósferas con tensión de O_2 levemente disminuida: son los microaerófilos.
 - d. **Temperatura óptima de crecimiento**— La mayoría de los microorganismos aislados en los laboratorios clínicos tienen un desarrollo óptimo a 35–37 °C. La capacidad para crecer a varias temperaturas puede ser útil para caracterizar algunos microorganismos (p. ej., *Campylobacter*, ciertas micobacterias tuberculosas).
 - e. **Morfología de las colonias en medios diferenciales, selectivos y no selectivos**— Los laboratorios clínicos inoculan muestras en medios no selectivos y selectivos para lograr las condiciones óptimas de aislamiento de microorganismos a partir de una muestra. Los medios selectivos usan agentes antimicrobianos (p. ej., colistina y ácido nalidixico en agar [CNA]) o colorantes y sales biliares (p. ej., agar de MacConkey; agar de azul de metileno-eosina) para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y permitir el de otros. Además, algunos medios selectivos son también diferenciales, lo que significa que las colonias que se desarrollan en un medio dado tienen una apariencia que muestra una o varias característica o características fenotípicas clave. Estas características claves sugieren la posible identidad de los microorganismos (p. ej., las colonias incoloras de las especies *Shigella* no fermentadoras de la lactosa frente a las colonias rojas de *E. coli* fermentadoras de la lactosa en agar de MacConkey).
6. **Características bioquímicas**— Junto con la morfología colonial y celular y el aspecto de las colonias en medios diferenciales y selectivos, las pruebas enzimáticas y bioquímicas forman la base para la mayoría de los procedimientos realizados en los laboratorios de microbiología clínica. En general, las características bioquímicas se refieren a la formación de distintos productos finales bioquímicos de sustratos definidos, la producción de ácido a partir de varios hidratos de carbono y la presencia de ciertas enzimas bacterianas determinadas por sustratos cromogénicos u otros métodos.
7. **Pruebas serológicas**— Las pruebas serológicas para la identificación bacteriana involucran la detección de antígenos mediante inmunanálisis enzimáticos o fluorescentes (cap. 3). Los métodos de identificación serológica también pueden usarse para confirmar identificaciones obtenidas por otros procedimientos. Por ejemplo, las especies de *Salmonella* pueden identificarse como tales por pruebas bioquímicas, pero la serotipificación de cepas aisladas de *Salmonella* para antígenos flagelares y somáticos por lo general se realiza por aglutinación en portaobjetos con antiseros específicos de grupo y tipo.
8. **Análisis de los productos finales metabólicos o de componentes estructurales del microorganismo**— El análisis de los productos finales metabólicos se realiza indirectamente con todos los sistemas de identificación bacteriana, en los cuales un producto final metabólico produce un cambio detectable en un indicador de algún tipo. Sin embargo, estos análisis también pueden ser realizados por otros métodos, como el análisis de cromatografía gaseosa de líquidos de cultivo con caldos agotados después de la extracción con varios solventes orgánicos. Esta técnica es útil para la identificación de género y especie de bacterias anaerobias. Los estudios quimioanalíticos (p. ej., análisis de peptidoglucanos y membrana externa de la pared celular, composición lipídica de la pared celular, detección de componentes del transporte electrónico, como citocromos y menaquinonas por cromatografía lipídica de alta presión o cromatografía de gas-líquido) también son útiles pero no habituales en la mayoría de los laboratorios. El análisis de la pared celular se ha usado con buenos resultados en algunos laboratorios hospitalarios como un método para la diferenciación e identificación de las micobacterias y los microorganismos relacionados.
9. **Análisis de genética molecular**— Los métodos moleculares incluyen el contenido de G + C%, la hibridación DNA-DNA y la secuenciación de bases de DNA. Aunque no se los usa de modo rutinario en los laboratorios hospitalarios, permiten el desarrollo de pruebas con sondas utilizadas en muchos laboratorios para la identificación de micobacterias, clamidias, hongos sistémicos y algunas bacterias. Las técnicas de amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa, amplificación del desplazamiento de la hebra y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos) también están siendo usadas en laboratorios clínicos para la detección directa de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* y para las determinaciones de carga viral en pacientes con infecciones por HIV-1 y hepatitis C.

lidad de los microorganismos bacterianos y cumple el mismo papel funcional y estructural en todas las células bacterianas. Los RNA ribosómicos de la subunidad pequeña han permanecido altamente conservados durante la evolución; las mutaciones en esta secuencia de bases altamente conservada suelen ser letales y los microorganismos con estas mutaciones no sobreviven ni se propagan. Además, como estas moléculas son una parte integral de un complejo, es decir, de la estructura que contiene la proteína (el ribosoma bacteriano), la transferencia horizontal de los rRNA a otros organismos es rara. Mediante el

análisis de secuencias de nucleótidos del 16S rRNA se pudieron determinar las relaciones filogenéticas y la evolución de diversos organismos a partir de tipos antecesores comunes.¹³² El análisis de la secuencia del RNA ribosómico es el más útil para determinar el parentesco entre microorganismos en categorías inferiores al género, aunque esta técnica ha sido usada para validar la existencia de diferencias fenotípicas entre géneros y especies muy relacionadas. Las cepas de la misma especie por lo general muestran similitudes mayores del 97% en las secuencias del rRNA.¹³¹

Desde su inicio, los estudios de secuenciación del RNA de la subunidad pequeña han tenido gran impacto en la sistemática bacteriana. Hacia finales de la década de 1970, los análisis del 16S rRNA de diversos grupos bacterianos (bacterias metanogénicas [productoras de metano], bacterias halófilas, bacterias termoacidófilas, etc.) revelaron que esos microorganismos eran completamente diferentes de otras bacterias y de los eucariontes y definieron la división del mundo bacteriano en dos dominios —*Archaea* y *Bacteria*— y reforzaron la separación filogenética de los eucariontes en un tercer dominio: *Eukaryota*. El desarrollo de la secuenciación del DNA a fines de esa década y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la transcriptasa inversa a mediados de la década de 1980 permitieron la amplificación y la secuenciación del rDNA de la subunidad pequeña. Un estudio extenso y la catalogación de esas secuencias en las décadas de 1980 y 1990 forman las bases del esquema de clasificación filogenético propuesto.³⁵

La publicación posterior de la segunda edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* marcó una divergencia completa con la primera edición en su esquema de clasificación filogenética. El mundo procarionte se dividió en dos dominios —*Archaea* y *Eubacteria*.¹³⁴ Los microorganismos eucariontes se ubican en el dominio *Eukaryota*. *Archaea* y *Bacteria* evolucionaron probablemente de un organismo antecesor, como se evidenció por similitudes en las secuencias de aminoácidos de grandes moléculas reguladoras y estructurales y enzimas, incluidas las adenosíntrifosforas y los factores de elongación que funcionan en la síntesis de proteínas.¹³⁵ *Archaea* incluye dos ramas principales: *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*. La *Euryarchaeota* incluye las bacterias metanogénicas, las bacterias reductoras de sulfato, las bacterias halófilas (requieren sal) y las termoacidófilas (con un crecimiento óptimo a 50-60 °C a pH menor de 5) aerobias, y las bacterias hipertermófilas anaerobias. *Crenarchaeota* son todas termófilas (con un crecimiento óptimo a 50-60 °C), organismos que son heterótrofos reductores de azufre u organismos aerobios capaces de oxidar azufre u otros sustratos orgánicos o inorgánicos. Aunque *Archaea* son similares a *Eubacteria* en tamaño, estructura nucleotídica, crecimiento celular y división, difieren en varios aspectos. El tamaño del genoma de *Eubacteria* ($0.6-12 \times 10^6$ pares de bases) puede ser más de tres veces el de *Archaea* ($1-4 \times 10^6$ pares de bases). *Archaea* tienen paredes celulares compuestas de proteína y carecen del peptidoglucano mureína encontrado en *Eubacteria*. Aunque ambos grupos tienen ribosomas 70S, los de *Archaea* son insensibles a la inhibición de la síntesis proteica por estreptomiceína o cloranfenicol, pero, como *Eukaryota*, son sensibles a la inhibición por toxina diftérica. Características opuestas se obtienen en *Eubacterias*. Resumiendo, *Archaea* comprende las bacterias que son "extremófilas" del medioambiente; no contiene patógenos humanos.

De acuerdo con la guía de la segunda edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, los microorganismos del dominio *Eubacteria* (o dominio *Bacteria*, como lo señala Bergey) se dividen en 23 divisiones o filos.³⁵ La mayoría de estos filos se componen de especies medioambientales, como las bacterias fotosintéticas o las termófilas. Los patógenos humanos se distribuyen en siete filos diferentes. La mayoría de las bacterias gramnegativas de importancia clínica pertenecen al filo *Proteobacteria*, que está dividido en cinco clases, designadas α -, β -, γ -, δ - y ϵ -*Proteobacteria*. Todas las bacterias entéricas, la mayoría de las especies no fermentativas, cocos y cocobacilos gramnegativos de requerimientos nutricionales especiales, y los *Campylobacter* pertenecen a varias clases dentro del filo *Proteobacteria*. El filo *Firmicutes* incluye tres

clases que comprenden clostridios, eubacterias, micoplasmas peptococos, ureaplasmas, esporas aerobias que forman bacilos gramnegativos (p. ej., *Bacillus* y géneros relacionados) y el estafilococo. El filo *Actinobacteria* incluye los actinomicetos aerobios y anaerobios y los microorganismos relacionados, los cocos grampositivos y otros géneros de bacilos grampositivos facultativos. Los filos *Chlamydiae* y *Spirochaetes* contienen las clamidias y las bacterias espiraladas (p. ej., *Borrelia*, *Treponema* y *Leptospira*). El filo *Bacteroidetes* contiene microorganismos del grupo *Bacteroides* (*Bacteroides*, *Porphyromonas* y *Prevotella*), flavobacterias, spingobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores relacionados. El filo *Fusobacteria* está compuesto por las fusobacterias y el género *Streptobacillus*. En el recuadro 5-4 se proporciona un resumen completo del nuevo esquema de clasificación de los microorganismos asociados con los seres humanos y sus enfermedades que aparecerá en la próxima edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*.³⁵

A pesar del énfasis actual en los métodos moleculares para la clasificación, los criterios fenotípicos continúan siendo la forma principal de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología clínica. Con los métodos señalados en el recuadro 5-3, junto con varios esquemas de identificación y bases de datos asistidas por ordenador, la mayoría de las bacterias aisladas en el laboratorio clínico pueden incluirse en un sistema taxonómico que permite la denominación de un nombre de género y de especie. Esta vía de acceso verifica el papel que cumple el laboratorio de microbiología clínica en proveer a los médicos con exactitud y rapidez las identificaciones de los microorganismos y determinar su sensibilidad a los antimicrobianos. Los médicos, a su vez, usan esta información para seleccionar las intervenciones terapéuticas más apropiadas, controlar la respuesta clínica del paciente y evaluar su evolución.

Con el fin de proporcionarle al lector la información básica suficiente para entender los capítulos siguientes con respecto a los patógenos bacterianos específicos y las enfermedades que causan, la próxima sección se ocupa de la morfología general, la fisiología y los mecanismos de virulencia de las bacterias. Esta presentación proveerá la información necesaria para entender los matices de la morfología, las propiedades tintoriales, el crecimiento y las características metabólicas y bioquímicas de los microorganismos tratados en los capítulos siguientes. La morfología y la fisiología básicas de hongos, parásitos y virus se presentan en los capítulos 20, 21 y 22, respectivamente.

Morfología y fisiología bacterianas básicas

Las bacterias son procariontes, mientras que los hongos, los protozoos y otros organismos son eucariontes. Las células eucariontes contienen un núcleo con una membrana que encierra múltiples cromosomas, mientras que las células procariontes tienen un cromosoma único (nucleoide) que no está encerrado en una membrana nuclear. Las células eucariontes también tienen diversos orgánulos subcelulares con funciones especializadas, como las mitocondrias (los lugares de la respiración aerobia) y los cloroplastos (los lugares de la fotosíntesis en las plantas verdes). En efecto, estos orgánulos subcelulares evolucionaron probablemente a partir de procariontes que ingresaron en las células eucariontes y desarrollaron relaciones simbióticas con ellas; después de un tiempo, debido a la pérdida de las funciones metabólicas asociadas con la vida libre,

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición

DOMINIO BACTERIA				
Filo XII	<i>Proteobacteria</i> III. nov.			
Clase I	"α-Proteobacteria"	Orden II	<i>Rickettsiales</i>	
			Familia I	<i>Rickettsiaceae</i>
				Género I
				<i>Rickettsia</i>
			Familia II	<i>Ehrlichiaeae</i>
				Género I
				<i>Ehrlichia</i>
		Orden IV	"Sphingomonadales"	
			Familia I	"Sphingomonadaceae"
				Género I
				<i>Sphingomonas</i>
		Orden V	<i>Caulobacteriales</i>	
			Familia I	<i>Caulobacteriaceae</i>
				Género III
				<i>Brevundimonas</i>
		Orden VI	"Rhizobiales"	
			Familia I	<i>Rhizobiaceae</i>
				Género II
				<i>Agrobacterium</i>
			Familia II	<i>Bartonellaceae</i>
				Género I
				<i>Bartonella</i>
			Familia III	<i>Brucellaceae</i>
				Género I
				<i>Brucella</i>
				Género III
				<i>Ochrobactrum</i>
			Familia VII	"Bradyrhizobiaceae"
				Género II
				<i>Alluvia</i>
			Familia IX	"Methylobacteriaceae"
				Género I
				<i>Methylobacterium</i>
				Género III
				<i>Roseomonas</i>
Clase II	"β-Proteobacteria"	Orden I	"Burkholderiales"	
			Familia I	"Burkholderiaceae"
				Género I
				<i>Burkholderia</i>
			Familia II	"Ralstoniaceae"
				Género I
				<i>Ralstonia</i>
			Familia IV	<i>Alcaligenaceae</i>
				Género I
				<i>Alcaligenes</i>
				Género II
				<i>Achromobacter</i>
				Género III
				<i>Bordetella</i>
				Género IV
				<i>Taylorella</i>
		Orden IV	Familia V	<i>Comamonadaceae</i>
				Género I
				<i>Comamonas</i>
			"Neisseriales"	
				Familia I
				<i>Neisseriaceae</i>
				Género I
				<i>Neisseria</i>
				Género II
				<i>Allysiella</i>
				Género VI
				<i>Eikenella</i>
				Género IX
				<i>Kingella</i>
		Orden V	"Nitrosomonadales"	
			Familia II	<i>Spirillaceae</i>
				Género I
				<i>Spirillum</i>
Clase III	"γ-Proteobacteria"	Orden II	"Xanthomonadales"	
			Familia I	"Xanthomonadaceae"
				Género I
				Género VII
				<i>Xanthomonas</i>
		Orden III		<i>Stenotrophomonas</i>
			"Cardiobacteriales"	
			Familia I	<i>Cardiobacteriaceae</i>
				Género I
				<i>Cardiobacterium</i>
				Género II
				<i>Suttonella</i>

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición (cont.)

DOMINIO BACTERIA
Filo XII

Proteobacteria fil. nov.

Orden IV	"Thiotrichales"	Familia III	"Francisellaceae"	Género I	<i>Francisella</i>
Orden V	"Legionellales"	Familia I	<i>Legionellaceae</i>	Género I	<i>Legionella</i>
		Familia II	"Coxiellaceae"	Género I	<i>Coxiella</i>
				Género II	<i>Rickettsiella</i>
Orden VIII	<i>Pseudomonadales</i>	Familia I	<i>Pseudomonadaceae</i>	Género I	<i>Pseudomonas</i>
				Género V	<i>Chryseomonas</i>
				Género VI	<i>Flavimonas</i>
				Género X	<i>Oligella</i>
		Familia II	<i>Moraxellaceae</i>	Género I	<i>Moraxella</i>
				Género II	<i>Acinetobacter</i>
				Género III	<i>Psychrobacter</i>
Orden IX	"Alteromonadales"	Familia	"Alteromonadaceae"	Género X	<i>Shewanella</i>
Orden X	"Vibrionales"	Familia I	<i>Vibrionaceae</i>	Género I	<i>Vibrio</i>
				Género V	<i>Photobacterium</i>
Orden XI	"Aeromonadales"	Familia I	<i>Aeromonadaceae</i>	Género I	<i>Aeromonas</i>
		Familia II	<i>Succinivibrionaceae</i>	Género I	<i>Succinivibrio</i>
				Género II	<i>Anaerobiospirillum</i>
				Género III	<i>Ruminobacter</i>
				Género IV	<i>Succinimonas</i>
Orden XII	"Enterobacteriales"	Familia I	<i>Enterobacteriaceae</i>	Género I	<i>Enterobacter</i>
				Género IV	<i>Brenneria</i>
				Género VI	<i>Budvicia</i>
				Género VII	<i>Butiauxella</i>
				Género VIII	<i>Calymmatobacterium</i>
				Género IX	<i>Cedecea</i>
				Género X	<i>Citrobacter</i>
				Género XI	<i>Edwardsiella</i>
				Género XII	<i>Erwinia</i>
				Género XIII	<i>Escherichia</i>
				Género XIV	<i>Ewingella</i>
				Género XV	<i>Hafnia</i>
				Género XVI	<i>Klebsiella</i>
				Género XVII	<i>Kluyvera</i>
				Género XVIII	<i>Leclercia</i>
				Género XIX	<i>Leminorella</i>
				Género XX	<i>Moellerella</i>
				Género XXI	<i>Morganella</i>
				Género XXII	<i>Obesumbacterium</i>
				Género XXIII	<i>Pantoea</i>
				Género XXVI	<i>Plesiomonas</i>
				Género XXVIII	<i>Proteus</i>

(Continúa)

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición (cont.)

DOMINIO BACTERIA				
Filo XII		<i>Proteobacteria</i> III. nov.		
			Género XXIX	<i>Providencia</i>
			Género XXX	<i>Rahnella</i>
			Género XXXII	<i>Salmonella</i>
			Género XXXIII	<i>Serratia</i>
			Género XXXIV	<i>Shigella</i>
			Género XXXVI	<i>Tamarella</i>
			Género XXXVII	<i>Trochovibrio</i>
			Género XL	<i>Yersinia</i>
			Género XLI	<i>Yokenella</i>
	Orden XIII	"Pasteurellales"		
		Familia I	<i>Pasteurellaceae</i>	
			Género I	<i>Pasteurella</i>
			Género II	<i>Actinobacillus</i>
			Género III	<i>Haemophilus</i>
			Género V	<i>Mannheimia</i>
Clase IV	" δ -proteobacterias"			
	Orden II	"Desulfovibrionales"		
		Familia I	"Desulfovibrionaceae"	
			Género I	<i>Desulfovibrio</i>
			Género II	<i>Bilophila</i>
Clase V	" ϵ -proteobacterias"			
	Orden I	"Campylobacteriales"		
		Familia I	<i>Campylobacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Campylobacter</i>
			Género II	<i>Acrobacter</i>
		Familia II	"Helicobacteriaceae"	
			Género I	<i>Helicobacter</i>
			Género II	<i>Volinella</i>
Filo XIII		<i>Firmicutes</i> III. nov.		
Clase I	"Clostridia"			
	Orden I	<i>Clostridiales</i>		
		Familia I	<i>Clostridiaceae</i>	
			Género I	<i>Clostridium</i>
			Género VIII	<i>Sarcina</i>
		Familia II	"Lachnospiraceae"	
			Género I	<i>Lachnospira</i>
		Familia III	"Peptostreptococcaceae"	
			Género I	<i>Peptostreptococcus</i>
			Género IV	<i>Helcococcus</i>
		Familia IV	"Eubacteriaceae"	
			Género I	<i>Eubacterium</i>
		Familia V	<i>Peptococcaceae</i>	
			Género I	<i>Peptococcus</i>
		Familia VII	"Acidimicrobiaceae"	
			Género I	<i>Acidimicrobium</i>
			Género XIII	<i>Veillonella</i>
Clase II	Mollicutes			
	Orden I	<i>Mycoplasmatales</i>		
		Familia I	<i>Mycoplasmataceae</i>	
			Género I	<i>Mycoplasma</i>
			Género IV	<i>Ureaplasma</i>
	Orden V	Incertae sedis		
		Familia I	"Erysipelothricaceae"	
			Género I	<i>Erysipelothrix</i>
			Género II	<i>Holdenmania</i>

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición (cont.)

Filo XII				
<i>Firmicutes</i> fil. nov.				
Clase III	"Bacilli"			
		Orden I		
		<i>Bacillales</i>		
		Familia I	<i>Bacillaceae</i>	
			Género I	<i>Bacillus</i>
			Género II	<i>Amphibacillus</i>
			Género III	<i>Exiguobacterium</i>
			Género IV	<i>Gracilibacillus</i>
			Género V	<i>Halobacillus</i>
			Género VI	<i>Saccharococcus</i>
			Género VII	<i>Salibacillus</i>
			Género VIII	<i>Virgibacillus</i>
		Familia II	<i>Planococcaceae</i>	
			Género I	<i>Planococcus</i>
			Género III	<i>Korarchaeum</i>
		Familia III	<i>Caryophanaceae</i>	
			Género I	<i>Caryophanum</i>
		Familia IV	" <i>Listeriaceae</i> "	
			Género I	<i>Listeria</i>
			Género II	<i>Brochothrix</i>
		Familia V	" <i>Staphylococcaceae</i> "	
			Género I	<i>Staphylococcus</i>
			Género II	<i>Gemella</i>
			Género III	<i>Maurococcus</i>
			Género IV	<i>Salinococcus</i>
		Familia VI	" <i>Sporolactobacillaceae</i> "	
			Género I	<i>Sporolactobacillus</i>
			Género II	<i>Marinococcus</i>
		Familia VII	" <i>Paenibacillaceae</i> "	
			Género I	<i>Paenibacillus</i>
			Género III	<i>Aneurinibacillus</i>
			Género IV	<i>Brevibacillus</i>
		Familia VIII	" <i>Alicyclobacillaceae</i> "	
			Género I	<i>Alicyclobacillus</i>
	Orden II			
		"Lactobacillales"		
		Familia I	<i>Lactobacillaceae</i>	
			Género I	<i>Lactobacillus</i>
			Género II	<i>Pediococcus</i>
		Familia II	" <i>Aerococcaceae</i> "	
			Género I	<i>Aerococcus</i>
			Género II	<i>Abiotrophia</i>
			Género III	<i>Dolosigranulum</i>
			Género IV	<i>Eremococcus</i>
			Género V	<i>Flacklamia</i>
			Género VI	<i>Globicatella</i>
			Género VII	<i>Ignavigranum</i>
		Familia III	" <i>Carnobacteriaceae</i> "	
			Género I	<i>Carnobacterium</i>
			Género III	<i>Alloisococcus</i>
			Género V	<i>Dolosigranulum</i>
		Familia IV	" <i>Enterococcaceae</i> "	
			Género I	<i>Enterococcus</i>
			Género II	<i>Melissococcus</i>
			Género III	<i>Tetragenococcus</i>
			Género IV	<i>Vagococcus</i>

(Continúa)

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición (cont.)

Filo XIII		<i>Firmicutes</i> fil. nov.		
		Familia V	"Leuconostocaceae"	
			Género I	<i>Leuconostoc</i>
			Género II	<i>Oenococcus</i>
			Género III	<i>Weissella</i>
		Familia VI	<i>Streptococcaceae</i>	
			Género I	<i>Streptococcus</i>
			Género II	<i>Lactococcus</i>
Filo XIV		<i>Actinobacteria</i> fil. nov.		
Clase I	Actinobacteria			
	Subclase V	<i>Actinobacteridae</i>		
	Orden I	<i>Actinomycetales</i>		
	Suborden I	<i>Actinomycetinae</i>		
		Familia I	<i>Actinomycetaceae</i>	
			Género I	<i>Actinomyces</i>
			Género II	<i>Actinobaculum</i>
			Género III	<i>Arcanobacterium</i>
			Género IV	<i>Mobiluncus</i>
	Suborden VI	<i>Micrococquinae</i>		
		Familia I	<i>Micrococaceae</i>	
			Género I	<i>Micrococcus</i>
			Género II	<i>Arthrobacter</i>
			Género V	<i>Kocuria</i>
			Género VII	<i>Nesterenkonia</i>
			Género IX	<i>Rothia</i>
			Género X	<i>Stomatococcus</i>
		Familia II	<i>Brevibacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Brevibacterium</i>
		Familia III	<i>Cellulomonadaceae</i>	
			Género I	<i>Cellulomonas</i>
			Género II	<i>Oerskovia</i>
		Familia IV	<i>Dermabacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Dermabacter</i>
			Género II	<i>Brachybacterium</i>
		Familia V	<i>Dermatophilaceae</i>	
			Género I	<i>Dermatophilus</i>
			Género II	<i>Dermacoccus</i>
			Género III	<i>Kytococcus</i>
		Familia VI	<i>Intrasporangiaceae</i>	
			Género IV	<i>Sanguibacter</i>
		Familia VII	<i>Jonesiaceae</i>	
			Género I	<i>Jonesia</i>
		Familia VIII	<i>Microbacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Microbacterium</i>
			Género II	<i>Agrococcus</i>
			Género III	<i>Agromyces</i>
			Género IV	<i>Aureobacterium</i>
			Género VI	<i>Cryobacterium</i>
	Suborden VII	<i>Corynebacterinae</i>		
		Familia I	<i>Corynebacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Corynebacterium</i>
		Familia II	<i>Dietziaceae</i>	
			Género I	<i>Dietzia</i>
		Familia III	<i>Gordoniaceae</i>	
			Género I	<i>Gordonia</i>
			Género II	<i>Sclerotinia</i>
		Familia IV	<i>Mycobacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Mycobacterium</i>

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, segunda edición (cont.)

Filo XIV		Actinobacteria fil.		
		Familia V	<i>Nocardiaceae</i>	
		Género I		<i>Nocardia</i>
		Género II		<i>Rhodococcus</i>
		Familia VI	<i>Tetramurellaceae</i>	
		Género I		<i>Tetramurella</i>
	Suborden VIII	<i>Micromonosporaceae</i>		
		Familia I	<i>Micromonosporaceae</i>	
		Género I		<i>Micromonospora</i>
	Suborden IX	<i>Propionibacteriaceae</i>		
		Familia I	<i>Propionibacteriaceae</i>	
		Género I		<i>Propionibacterium</i>
		Género IV		<i>Propionisera</i>
		Familia II	<i>Nocardiothraupis</i>	
		Género I		<i>Nocardiothraupis</i>
	Suborden XI	<i>Streptomyces</i>		
		Familia I	<i>Streptomyces</i>	
		Género I		<i>Streptomyces</i>
	Suborden XII	<i>Streptosporangium</i>		
		Familia II	<i>Nocardiothraupis</i>	
		Género I		<i>Nocardiothraupis</i>
		Familia III	<i>Thermomonosporaceae</i>	
		Género I		<i>Thermomonospora</i>
		Género II		<i>Actinomyces</i>
	Orden II	<i>Bifidobacteriales</i>		
		Familia I	<i>Bifidobacteriaceae</i>	
		Género I		<i>Bifidobacterium</i>
		Género II		<i>Gardnerella</i>
		Familia II	Filiación desconocida	
		Género V		<i>Taricella</i>
Filo XVI		Chlamydiae fil. nov.		
Clase I	"Chlamydiae"	<i>Chlamydiales</i>		
	Orden I	Familia I	<i>Chlamydiaceae</i>	
		Género I		<i>Chlamydia</i>
Filo XVII		Spirochaetes fil. nov.		
Clase I	"Spirochaetes"	<i>Spirochaetales</i>		
	Orden I	Familia I	<i>Spirochaetaceae</i>	
		Género I		<i>Borrelia</i>
		Género IX		<i>Treponema</i>
		Familia II	"Serpulinae"	
		Género II		<i>Serpulina</i>
		Familia III	<i>Leptospiraceae</i>	
		Género I		<i>Leptospira</i>
Filo XX		Bacteroidetes fil. nov.		
Clase I	"Bacteroidetes"	<i>Bacteroidetes</i>		
	Orden I	Familia I	<i>Bacteroidaceae</i>	
		Género I		<i>Bacteroides</i>
		Familia III	"Porphyromonadaceae"	
		Género I		<i>Porphyromonas</i>
		Familia IV	"Prevotellaceae"	
		Género I		<i>Prevotella</i>

(Continúa)

Recuadro 5-4 Clasificación jerárquica de las bacterias de importancia clínica del <i>Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey</i> , segunda edición (cont.)				
Filo XIV		<i>Bacteroidetes</i> fil. nov.		
Clase II	"Flavobacteria"	Familia I	<i>Flavobacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Flavobacterium</i>
			Género II	<i>Bergeyella</i>
			Género III	<i>Captinocytophaga</i>
			Género V	<i>Chryseobacterium</i>
			Género XIV	<i>Weeksella</i>
Clase III	"Sphingobacteria"	Familia II	"Myroidaceae"	
			Género I	<i>Myroides</i>
		"Sphingobacteriales"		
		Familia I	<i>Sphingobacteriaceae</i>	
			Género I	<i>Sphingobacterium</i>
		Familia III	"Flexibacteriaceae"	
			Género I	<i>Flexibacter</i>
Filo XXI		<i>Fusobacteria</i> fil. nov.		
Clase I	"Fusobacteria"	"Fusobacteriales"		
	Orden I	Familia I	"Fusobacteriaceae"	
			Género I	<i>Fusobacterium</i>
			Género VI	<i>Streptobacillus</i>

desarrollaron rasgos o atributos que beneficiaron a los organismos "huéspedes". Las células eucariontes y las procariontes difieren sustancialmente en muchas otras características, las cuales se resumen en el cuadro 5-1.

Forma y tamaño de las bacterias

Las células bacterianas son de diversas formas y tamaños. La mayoría de las bacterias tienen 0,2-2 μm de diámetro y 1-6 μm de longitud, aunque muchos microorganismos medioambientales pueden medir hasta 100 μm . *Epulopiscium fishelsoni*, la bacteria más grande que se haya descrito, vive en el intestino de un pez y mide 600 μm por 80 μm .⁵ Las bacterias tienen cuatro morfologías básicas: células esféricas o **cocos**; células en forma de bastones o **bacilos**; células en forma de espiral o **espirilos**; y células en forma de coma o **vibrios**. La disposición de los cocos en pares, cadenas o racimos define los grupos de microorganismos llamados **diplococos**, **estreptococos** y **estafilococos**, respectivamente (fig. 5-1). Los microorganismos en forma de bastones pueden ser regulares en morfología, pueden ser algo más cortos ("cocobacilares") o pueden aparecer en forma de clava o pesa ("corineformes"). Las células en forma de coma por lo general definen una característica básica de ciertas especies (p. ej., especies de *Vibrio*). Lo mismo es válido para otras bacterias espiraladas (p. ej., *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Borrelia* y especies de *Treponema*), en las que la forma en espiral puede ser laxa (cerca de cuatro espirales por organismo) o más comprimida (14 a 20 espirales por organismo). Además de su forma, tamaño y disposición celular, las bacterias pueden diferenciarse según sus características de tinción con la **tinción de Gram**. Usando esta técnica, la mayoría de las bacterias pueden clasificarse como grampositivas o gramnegativas. La tinción de Gram ayuda a diferenciar bacte-

rias de acuerdo con las estructuras de la pared celular, como se verá más adelante en este capítulo. La estructura de una célula bacteriana generalizada (tanto grampositiva como gramnegativa) se representa en la figura 5-2.

Estructura nuclear, replicación, transcripción y traducción del DNA

Las características heredables de todo organismo viviente están determinadas por la estructura del material genético. El material genético de una célula individual está compuesto por **ácido desoxirribonucleico (DNA)** organizado en cromosomas únicos o múltiples. Por lo general, el material genético se menciona como el **genoma** del organismo. En la gran mayoría de los procariontes, el **genoma** está compuesto por un cromosoma circular, único, cerrado en forma covalente de DNA de doble hebra (dsDNA); en algunos microorganismos (p. ej., *Borrelia burgdorferi*, los estreptomicetos) está presente el DNA lineal.²⁹ En *Archaea* y *Bacteria*, este cromosoma circular no está unido por una membrana, sino que está libre en el citoplasma en una porción central aislada de la célula bacteriana llamada **nucleoide**.²⁹ El DNA celular bacteriano tiene un peso molecular de casi 10^6 kDa, mide de 300 a 14 000 μm de longitud y está presente en la célula en un estado **superenrollado** (la molécula de doble hebra gira sobre sí misma como una banda de goma enrollada). Los genes individuales se acomodan en el cromosoma en forma lineal. El nucleoide representa alrededor del 10% del volumen celular, aunque el DNA es sólo el 2-3% del peso seco de la célula. En *Escherichia coli*, el cromosoma contiene aproximadamente 5×10^6 pares de bases y su longitud es casi 1 000 veces la longitud de la célula bacteriana en la que está contenida. A diferencia de los procesos similares en las células eucariontes, la replicación del DNA y la transcripción del DNA en el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) suceden

Cuadro 5-1 Propiedades de las células eucariotes y procariontes

CARACTERÍSTICAS	CÉLULAS PROCARIONTES (EUBACTERIAS)	CÉLULAS EUCARIONTES
Grupos principales	Bacterias, algas azul-verdosas	Algas, hongos, protozoos, plantas, animales
Pared celular	Contiene peptidoglucano, lípidos, proteínas	Ausente; cuando está presente contiene quitina o celulosa (plantas verdes)
Estructura nuclear		
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Cromosomas	DNA de doble hebra circular, cerrado, único	Múltiples, cromosomas lineales
Ploidía	Haploide	Diploides, haploide (hongos)
Transcripción/traducción	Continua, con mRNA de vida corta y formación de polirribosoma (polisoma)	Discontinuas; mRNA de larga vida transcrito en el núcleo y traducido en el citoplasma
Histonas	Ausentes	Presentes
Citoplasma		
Ribosomas	Presentes; 70S (50S + 30S)	Presentes; 80S (60S + 40S)
Mitochondrias	Ausentes	Presentes
Complejo de Golgi	Ausente	Presentes
Retículo endoplasmático	Ausente	Presente
Membrana citoplasmática	Presente; fosfolípidos, no esteroides (excepto para especies de <i>Mycoplasma</i>)	Presente; fosfolípidos y esteroides (colesterol, ergosterol)
Triglicéridos	Ausente	Presentes
Movilidad	Flagelos (simples)	Flagelos (complejos); pseudópodos; otros órganos de locomoción complejos
Generación de energía	Asociada con la membrana citoplasmática	Mitochondrias
Reproducción sexual	Ausente (innecesaria)	Presente (puede alternar con ciclos de reproducción asexual)
Recombinación/intercambio de genes	Intercambio de genes plasmídicos o cromosómicos mediante transformación, transducción o conjugación	Cigoto diploide formada a partir de células germinales haploides; la meiosis da lugar a la recombinación genética

de modo continuo. El cromosoma también parece estar adherido a la cara interna de la membrana celular en ciertos puntos. En los **eucariotes**, el material genético se organiza en varios **cromosomas** dentro del núcleo. Los cromosomas están, a su vez, asociados con varias proteínas básicas llamadas **histonas**, que ayudan a estabilizar la estructura cromosómica. Los cromosomas de los eucariotes están separados del resto del material celular por una **membrana nuclear**, que se compone de una bicapa lipídica similar en composición a la membrana celular. La membrana nuclear también contiene poros que permiten el pasaje de moléculas pequeñas hacia adentro y afuera del núcleo.

Los ácidos nucleicos de todas las bacterias, como los de otros organismos, están formados de **polinucleótidos** (un polímero que se compone de nucleótidos) que constan de tres componentes (fig. 5-3): 1) un azúcar cíclico de cinco carbonos (ribosa en RNA; desoxirribosa en DNA), 2) una base, purina (adenina, guanina) o pirimidina (citocina, timina, uracilo), unida al átomo de carbono 1' de la pentosa por un enlace N-glucosídico y 3) un fosfato (PO_4) unido al carbono 5' de la pentosa por un enlace fosfodiéster. La mitad de las desoxirribosas están unidas mediante grupos fosfatos alternados para formar una cadena que tiene un enrollamiento helicoidal característico y las bases están dirigidas hacia el eje central de la espiral. Tal estructura forma una hebra simple de ácido nucleico (ssDNA).

La estructura del DNA de doble hélice resulta de la interacción entre dos hebras simples complementarias de ácido nucleico. La complementariedad está asociada con la secuen-

cia de bases en una hebra simple y los puentes de hidrógeno que se encuentran entre las bases específicas en la hebra complementaria (fig. 5-4). Las bases **purina** son **adenina (A)** y **guanina (G)** y las bases **pirimidina** son **citocina (C)**, **timina (T)** y **uracilo (U)** (fig. 5-3). La purina adenina se apareará sólo con la pirimidina timina, mientras que la purina guanosina se apareará específicamente con la pirimidina citocina. Las cadenas antiparalelas de ssDNA se mantienen juntas por tres enlaces de hidrógeno entre C y G y dos puentes de hidrógeno entre A y T (véase fig. 5-4). El DNA nativo existe como una hélice de doble hebra, mientras que el RNA existe en forma de hebra simple como **RNA mensajero (mRNA)** y en formas de doble hebra parciales en las moléculas de **RNA ribosómico (rRNA)** y **RNA de transferencia (tRNA)**. En todas las especies de RNA, el uracilo está presente en lugar de la timina (véase fig. 5-3). La secuencia de las bases purina y pirimidina en el DNA constituye el código genético, con codones específicos (tres secuencias de pares de bases) que codifican aminoácidos específicos. El RNA mensajero de hebra simple (mRNA) se sintetiza a partir del DNA de doble hebra durante el **proceso de transcripción** por una **RNA polimerasa dependiente de DNA**, en el que una hebra complementaria de mRNA se sintetiza con la hebra codificante del dsDNA como molde. Luego, el mRNA se asocia con los **ribosomas**, que son los lugares de síntesis proteica.

Los eucariotes y los procariontes contienen un gran número de ribosomas. En los procariontes, los ribosomas tienen 70S mientras que en los eucariotes tienen 80S. La "S" hace refe-

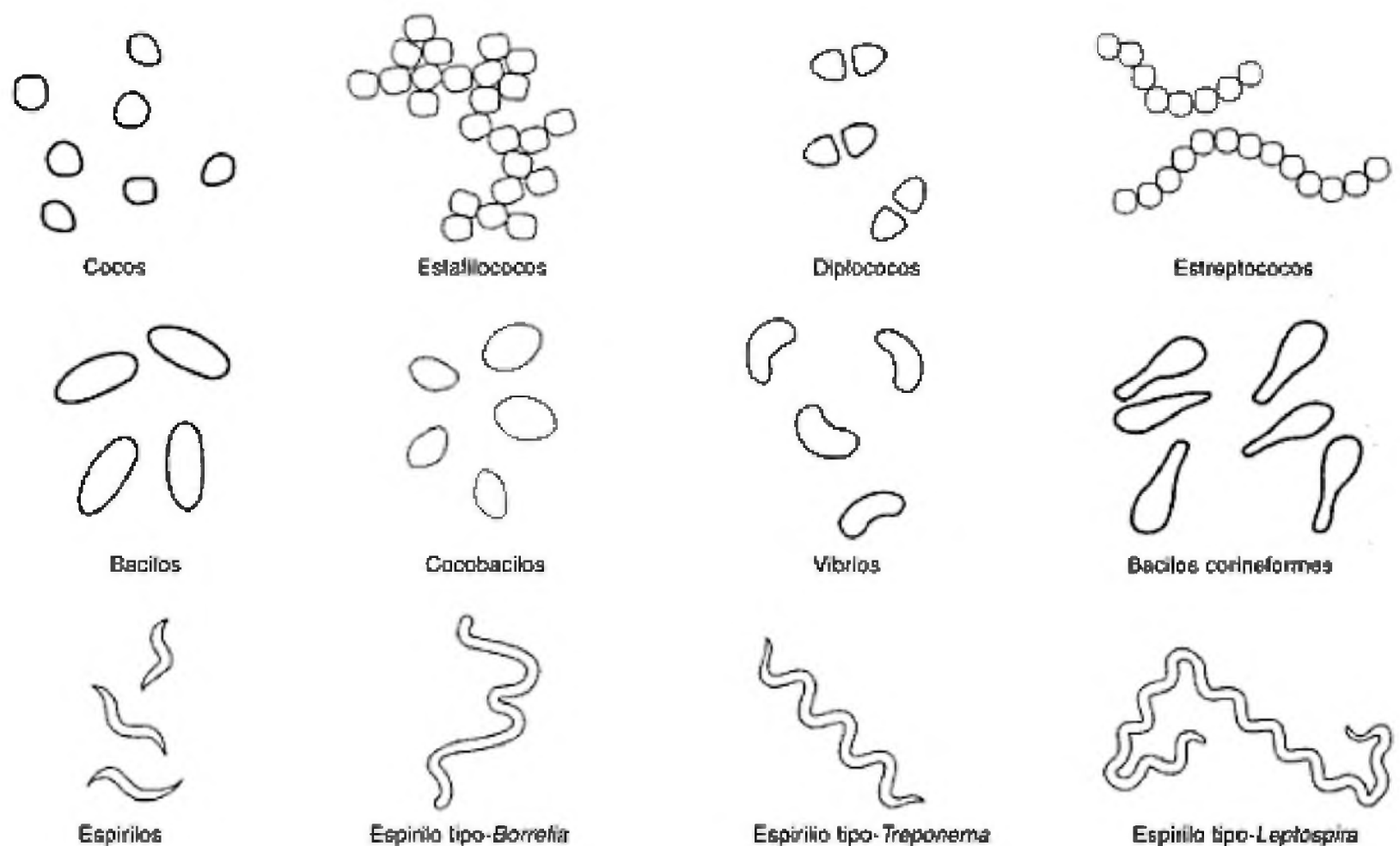


Figura 5-1 Morfología básica de distintas bacterias.

rencia a una unidad Svedberg, medida indirecta del tamaño del ribosoma determinado por su velocidad de sedimentación cuando se lo somete a una fuerza ultracentrífuga. El ribosoma bacteriano de 70S tiene un peso molecular de alrededor de 80 kDa y existe en un estado disociado como dos subunidades llamadas 30S y 50S. La subunidad 30S contiene las especies 16S RNA, mientras la subunidad 50S contiene los RNA 23S y 5S; juntas, las subunidades también contienen cerca de 50 proteínas ribosómicas. El ácido ribonucleico ribosómico (rRNA) comprende el 70% del total de RNA celular. El RNA celular remanente se encuentra como ácido ribonucleico de transferencia (tRNA, 16%) y ácido ribonucleico mensajero (mRNA, 14%).

Mientras se acoplan con un mRNA que fue transcrito de un DNA, las subunidades ribosómicas 50S y 30S forman el ribosoma intacto de 70S encontrado en las células bacterianas. Los agregados de ribosomas-mRNA, llamados **polirribosomas** o **polisomas**, contienen todos los componentes del sistema sintetizador de proteínas; los polisomas son esencialmente cadenas de ribosomas de 70S (monómeros) unidos al RNA mensajero (mRNA). Las histonas o proteínas de tipo histona que sirven para estabilizar los polipéptidos nacientes sintetizados por los polisomas se han encontrado recientemente sólo en pequeñas cantidades en asociación con el DNA de *Escherichia coli*, mientras que es bien conocida la presencia de proteínas poliamina (p. ej., putrescina o espermidina) asociadas con DNA bacteriano. El mRNA es "decodificado" en asociación con varios ribosomas en un complejo polisoma-mRNA, en el cual el **apareamiento de bases endón-anticodón** sucede a través de moléculas de tRNA durante el proceso de **traducción**. Las moléculas del RNA de transferencia contienen **anticodones**

específicos que corresponden a los codones del mRNA y también portan el aminoácido correspondiente enlazado en forma covalente. El complejo aminoácido-tRNA interactúa con el ribosoma de modo que se forma un enlace peptídico entre el aminoácido en el tRNA y el peptidil-tRNA naciente. La interacción del aminoácido-tRNA, los ribosomas, el trifosfato de adenosina (ATP) y varios cofactores deriva en la formación de una cadena polipeptídica específica. Así, el código genético presente en el DNA se traduce en moléculas de proteínas o enzimas que, a su vez, catalizan la síntesis y la degradación de todos los otros componentes celulares. La síntesis de nuevas moléculas de DNA, llamada **replicación**, sucede por el desenrollamiento y desprendimiento de la molécula de dsDNA por una enzima **DNA girasa**, y la síntesis de las hebras complementarias de DNA por una **DNA polimerasa dependiente de DNA**. Cada molécula nueva de dsDNA contiene una hebra simple del DNA original. La relación entre la replicación de DNA, la transcripción del RNA y la traducción del código genético en proteínas se resume en la figura 5-5.

Además de su utilidad para determinar el parentesco genético entre las bacterias (véase más adelante), la secuenciación de moléculas de RNA ha revelado secuencias de nucleótidos que son únicas para especies individuales. Como estas secuencias únicas también están altamente conservadas y existen en copias múltiples dentro de los ribosomas de una célula bacteriana, los oligonucleótidos sintéticos que se pueden hibridar con esas secuencias únicas pueden utilizarse para detectar e identificar bacterias. Tal propuesta forma la base de la tecnología de sondas de ácidos nucleicos para la detección directa de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en muestras clínicas.^{25,61,74,102} Estas sondas también pueden aplicarse a microor-

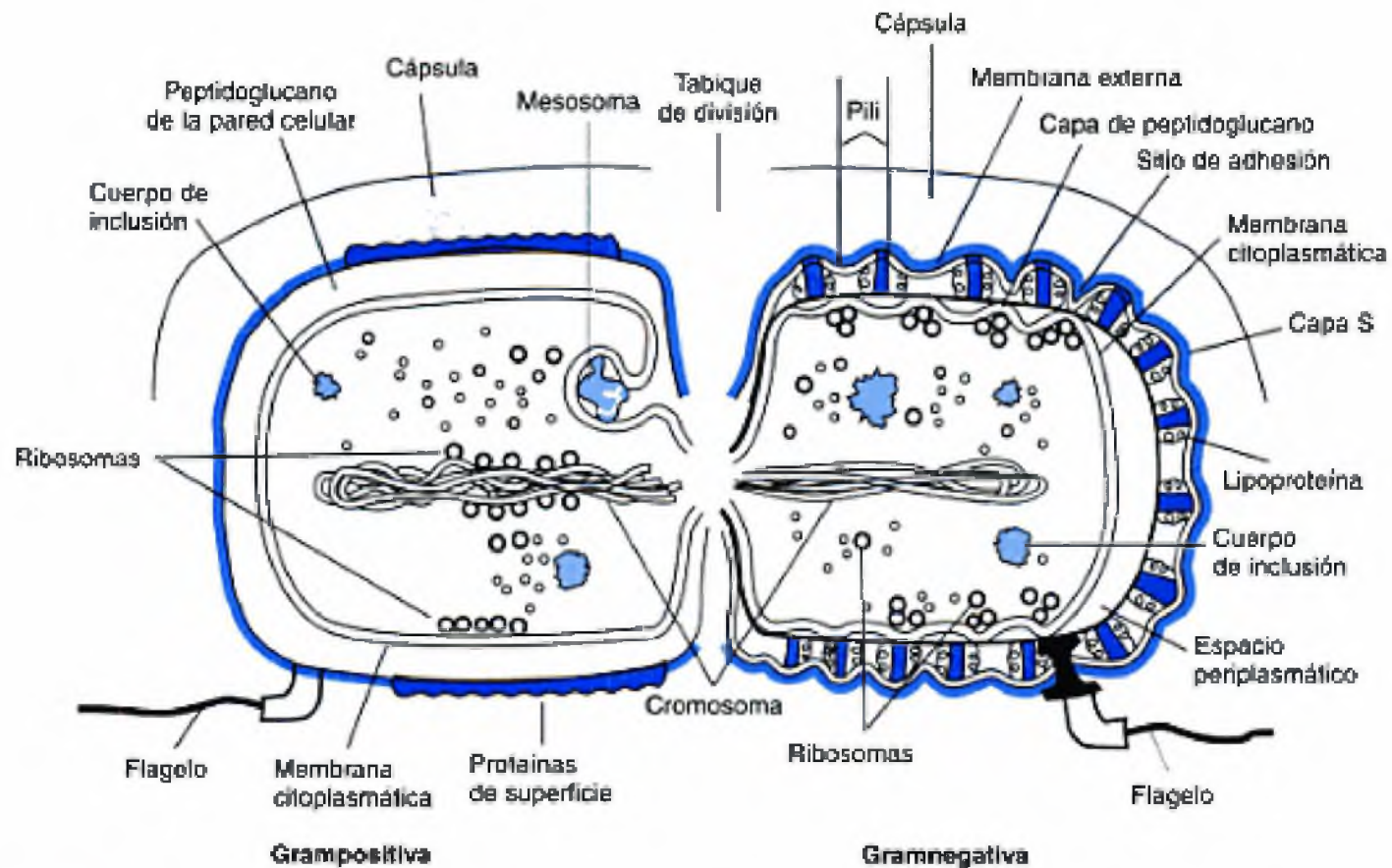


Figura 5-2 Esquema general que representa el corte transversal de una célula bacteriana. La mitad izquierda de esta figura describe la estructura de una bacteria grampositiva; la mitad derecha muestra la estructura de una bacteria gramnegativa.

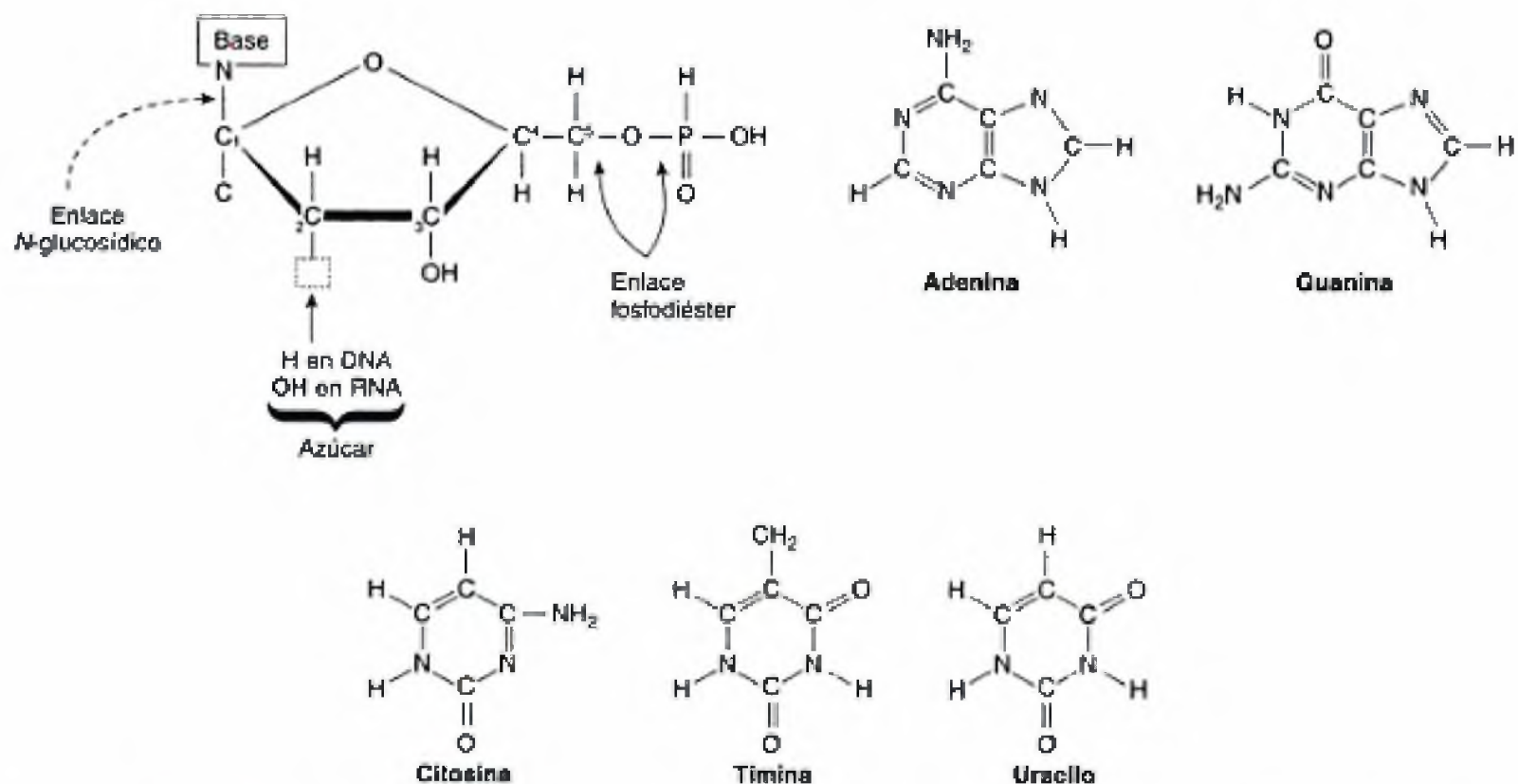


Figura 5-3 Estructura molecular de polinucleótidos y bases de ácidos nucleicos. Los polinucleótidos se componen de un azúcar de 5 carbonos (ribosa o desoxirribosa) cíclico, una base purina o pirimidina unida al átomo de carbono 1' del azúcar por un enlace N-glucosídico, y un grupo fosfato unido al carbono 5' del azúcar por un enlace fosfodiéster. También se muestran las estructuras de las dos bases purinas (adenina y guanina) y las tres pirimidinas (citocina, timina y uracilo).

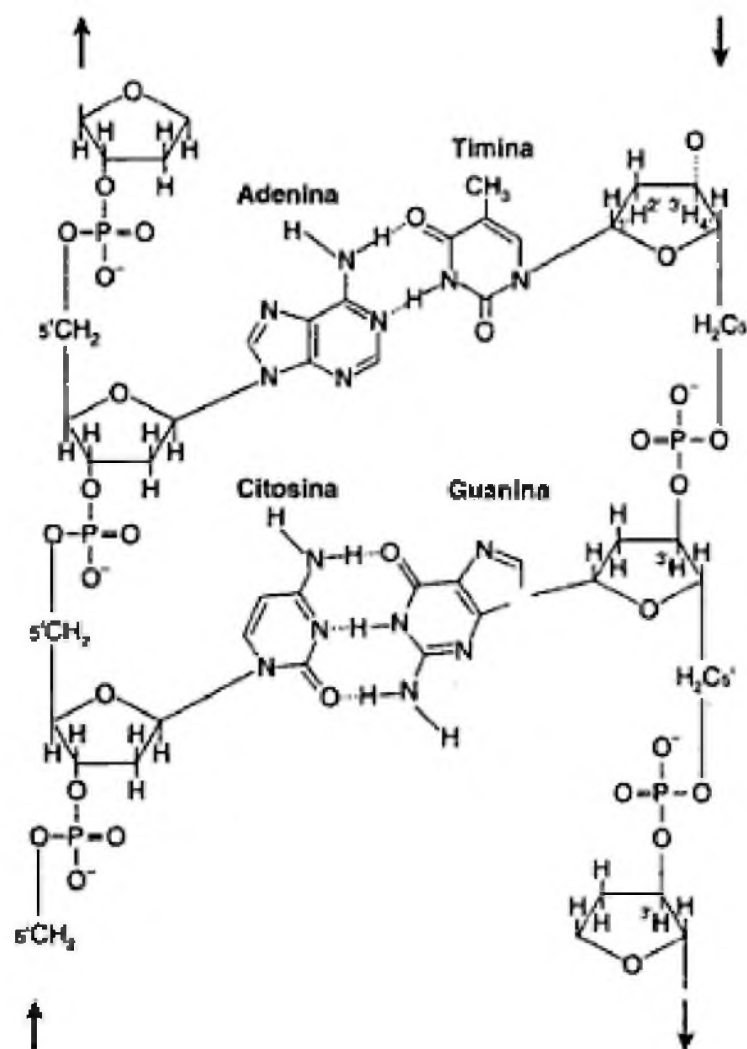


Figura 5-4 En la molécula de DNA, las dos hebras de polinucleótidos del DNA bicatenario son "antiparalelas", es decir, el extremo 3'-OH de una hebra es adyacente al extremo 5'-P de la hebra complementaria. Las bases, que están dirigidas hacia el eje central de la hélice, sostienen las dos hebras de polinucleótidos juntos mediante puentes de hidrógeno relativamente débiles. La adenina se aparea con la timina mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la citosina se aparea con la guanina mediante tres puentes de hidrógeno. Estas fuerzas interactivas entre las hebras de polinucleótidos pueden vencerse con energía térmica (calor) o un álcali fuerte en el proceso de desnaturización.

ganismos recuperados en medios de cultivo como método de identificación.^{140,12}

Citoplasma

El citoplasma es un gel amorfo que contiene enzimas, iones y una variedad de gránulos, muchos de los cuales representan reservas de alimento y energía. Las enzimas citoplasmáticas de las células procariontes funcionan en los dos procesos: anabólico y catabólico, y muchas de ellas están asociadas con la cara interna de la membrana celular (véase más adelante). Las células procariontes carecen de orgánulos subcelulares unidos a la membrana separados, mientras que las células eucariontes contienen diversas estructuras subcelulares (mitocondrias, retículos endoplasmáticos, etc.), compuestos o unidos por membranas bicapa de fosfolípidos. Los gránulos o inclusiones citoplasmáticas intracelulares representan acumulaciones de reservas alimenticias (polisacáridos, lípidos o polifosfatos). Los números y tipos de gránulos de almacenamiento varían con el medio y el estado funcional de las células. El almidón es el principal producto de almacenamiento en las especies *Neisse-*

ria y *Clostridium*, mientras que el glucógeno es el material más importante de almacenamiento en las bacterias entéricas. Las especies *Bacillus* y *Pseudomonas* acumulan el 30% o más de su peso seco como un lípido de elevado peso molecular llamado **poli-β-hidroxibutirato**. Los polímeros de alto peso molecular de polifosfato conocidos como **gránulos metacromáticos** o **volutina** se encuentran en especies de *Corynebacterium*, *Yersinia pestis* y *Mycobacterium*. Estos gránulos aparecen de color rojizo cuando se tiñen con azul de metileno. Las inclusiones intracitoplasmáticas que se encuentran principalmente entre las bacterias medioambientales incluyen los magnetosomas y las vesículas de gas. Los **magnetosomas** están compuestos por varias formas de hierro y le dan al microorganismo un eje magnético que le permite orientarse con relación al campo magnético terrestre. Las **vesículas de gas** permiten a los microorganismos mantener la flotación a cierto nivel en un medioambiente acuoso. Ambas inclusiones los habilitan para ajustar las ubicaciones en respuesta a las condiciones de desarrollo y concentraciones de nutrientes.

El DNA extracromosómico suele estar presente en el citoplasma de los procariontes en la forma de **plásmidos**. Los plásmidos existen como círculos de dsDNA cerrados de manera covalente cuyo tamaño oscila desde alrededor de 1 kilobases (kb) hasta más de 400 kb, que es equivalente a casi el 10% del tamaño del cromosoma de *E. coli*. Por lo general, no se encuentran en los eucariontes; sin embargo, algunos orgánulos subcelulares eucariontes (p. ej., mitocondrias) contienen moléculas de DNA que se asemejan a plásmidos bacterianos. Los plásmidos son capaces de replicarse en forma autónoma, se heredan mediante la progenie de células bacterianas, y pueden contener la información genética de diversas estructuras o funciones relacionadas con la virulencia bacteriana, como los genes para la resistencia antimicrobiana, la virulencia relacionada con las adhesinas, la producción de toxinas y la resistencia a los iones de metales pesados. Algunos plásmidos, llamados **plásmidos conjugativos**, codifican enzimas que facilitan la transmisión de plásmidos a otras células bacterianas. Algunas bacterias también pueden tener **transposones** y **secuencias de inserción**, secuencias de DNA que se insertan en sitios diferentes no relacionados tanto en el cromosoma como en un plásmido. La inserción de estos elementos en el DNA no requiere que la secuencia base del transposón sea homóloga con su sitio de inserción (véase más adelante).

Membrana citoplasmática

El citoplasma de todas las células bacterianas está rodeado por una membrana. La membrana citoplasmática bacteriana se ubica dentro de la capa de peptidoglucano de la pared celular en las bacterias grampositivas y adyacente al espacio periplásmico en las bacterias gramnegativas (citado más adelante). La estructura básica de la membrana citoplasmática es una bicapa fosfolipídica en la cual están enclavadas varias proteínas constituyentes. La membrana está compuesta por 30-60% de fosfolípidos y 50-70% de proteínas por peso. La mayoría de las membranas celulares bacterianas contienen fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y difosfatidilglicerol; no contienen esteroides (p. ej., colesterol o ergosterol). Las únicas excepciones procariontes son los micoplasmas y los ureaplasmas, que incorporan esteroides del medio de crecimiento hacia el interior de sus membranas celulares. Los ácidos grasos que componen la porción lipídica de la bicapa fosfolipídica por lo general contienen esqueletos de 15 a 18 átomos de carbono y son saturados y monoinsaturados.

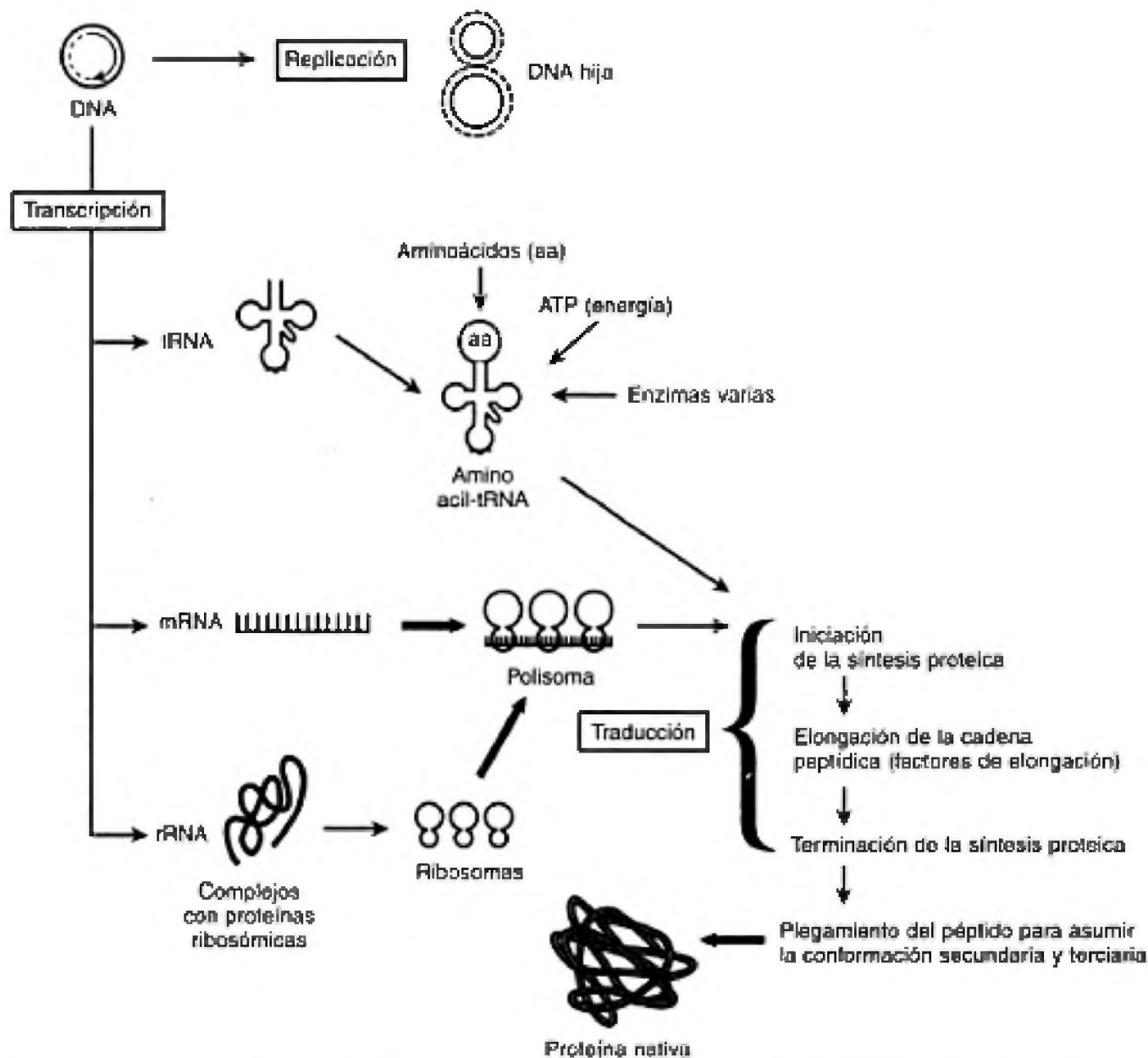


Figura 5-5 Replicación, transcripción y traducción del código genético en los procariotes. El DNA se replica por una DNA polimerasa DNA-dependiente para producir dos moléculas de DNA de doble hebra (dsDNA). El código genético en el dsDNA se copia para producir un RNA de hebra simple llamado RNA mensajero (mRNA) durante el proceso de transcripción. El RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA) también se transcriben. El rRNA forma complejos con proteínas específicas para constituir en parte la estructura del ribosoma. El mRNA forma complejos con los ribosomas para constituir los polisomas, que son el sitio de la síntesis proteica. En el polisoma, los codones específicos para los aminoácidos individuales se reconocen por los anticodones en las moléculas de tRNA por apareamiento de bases específico. Los codones específicos corresponden a diferentes aminoácidos unidos a las moléculas de aminoacil-tRNA. Durante las etapas de traducción, se inicia la síntesis proteica, las cadenas polipeptídicas se alargan y la síntesis termina con la liberación de una molécula de proteína.

La membrana celular de los procariotes cumple varias funciones que están relegadas a los orgánulos intracitoplasmáticos especializados en los organismos eucariotes. La membrana celular bacteriana contiene enzimas que son activas en la fosforilación oxidativa y en la respiración celular, en la biosíntesis de lípidos complejos y peptidoglucanos, en la replicación del DNA y en la biosíntesis de la membrana externa en las bacterias gramnegativas. En las bacterias fototrópicas, los eventos asociados con la captación de luz también ocurren en la membrana celular. Esta contiene la maquinaria para la síntesis y la secreción de enzimas y toxinas bacterianas y provee una barrera aislante a través de la cual se puede crear energía en forma de un gradiente de iones o potencial de membrana; tal energía puede usarse para el movimiento flagelar, la movilización cromosómica, etc. La estructura de la membrana permite la retención de metabolitos y la exclusión de muchos compuestos externos. Algunas proteínas de membrana están involucradas en el transporte activo de materiales (p. ej., ciertos monosacá-

ridos y disacáridos) hacia el interior del citoplasma. Tales proteínas específicas transportadoras asociadas con la membrana se denominan **permeasas**. Los **mesosomas**, que son invaginaciones de la membrana citoplasmática que se extienden hacia el interior del citoplasma, pueden funcionar para aumentar la accesibilidad de la superficie de la membrana para las enzimas celulares anabólicas y catabólicas. También pueden actuar en la replicación del DNA y en la separación del DNA de doble hebra en las células en crecimiento activo. Sin embargo, cierta evidencia sugiere que los mesosomas pueden ser artificios provocados por las técnicas de fijación que se utilizan en la observación con el microscopio electrónico.

Estructura de la pared celular bacteriana

La pared celular bacteriana provee la rigidez estructural, le confiere la forma a la célula y constituye una barrera física contra el ambiente exterior. El componente rígido de la pared celu-

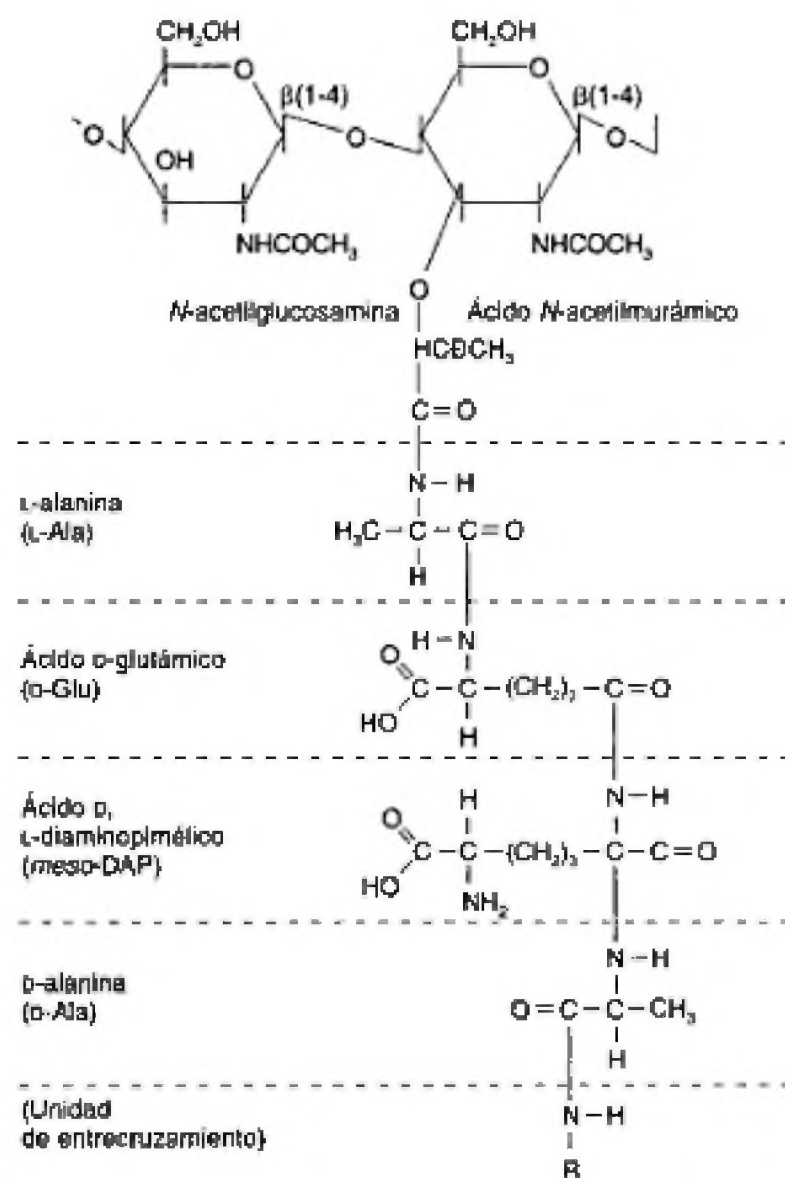


Figura 5-6 Estructura de la unidad de peptidoglucano repetitiva de *Escherichia coli*.

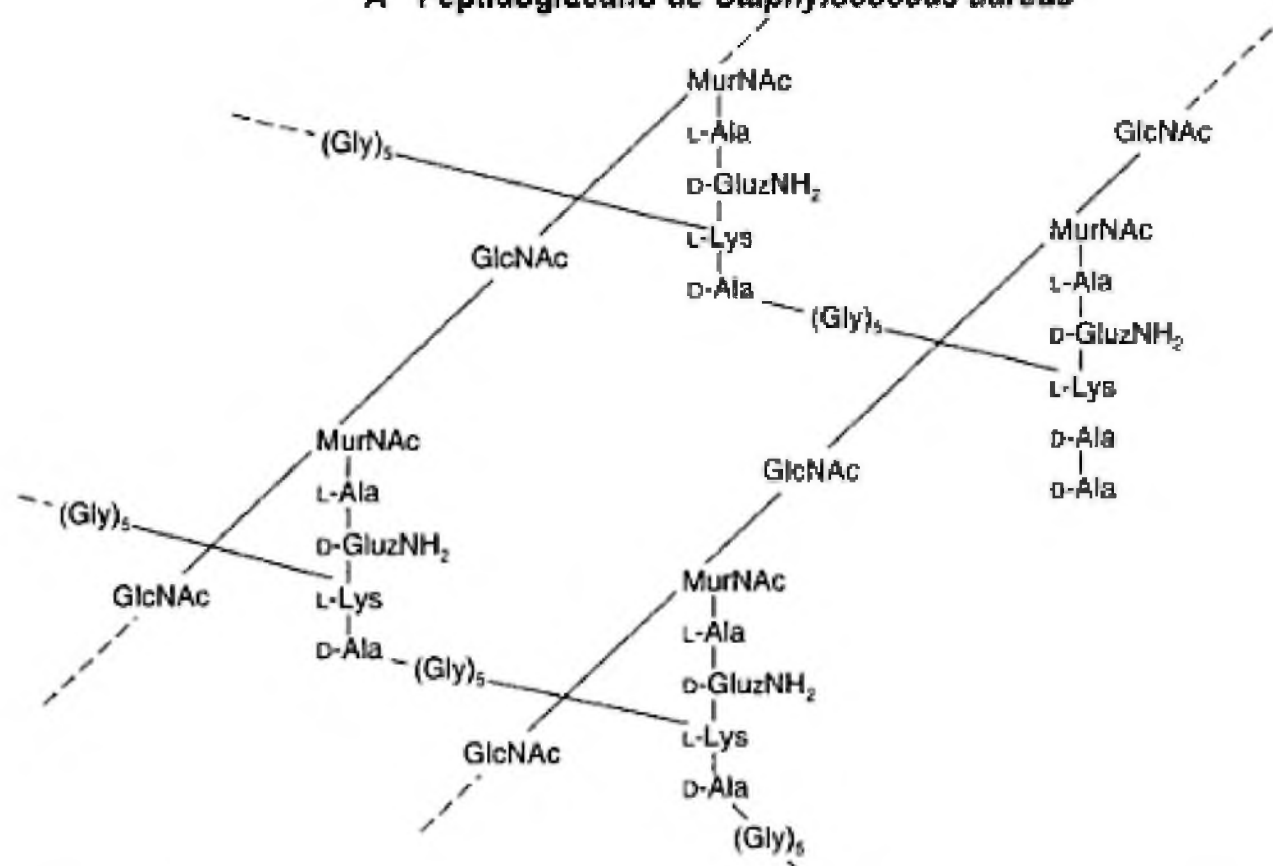
lar de las bacterias se compone de **peptidoglucano**, el cual se encuentra en todas las especies bacterianas excepto los micoplasmas y los ureoplasmas deficientes de pared celular. Esta estructura consta de un esqueleto de hidratos de carbono alternados de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico que forman un enlace β -1,4 (fig. 5-6).¹³ A los residuos de ácido *N*-acetilmurámico se unen, mediante un enlace peptídico con el grupo lactilo en el C3, tetrapéptidos cortos, por lo general, compuestos por cadenas cortas idénticas de D- y L-aminoácidos. Estas cadenas cortas contienen aminoácidos poco usuales que no se encuentran en las proteínas, incluidos los isómeros D de alanina y el D-ácido glutámico (bacterias grampositivas), el ácido meso-diaminopimélico (*meso*-DAP) o lisina (bacterias gramnegativas). Algunos de estos tetrapéptidos están, a su vez, unidos entre sí por péptidos cortos que forman entrecruzamientos entre las hebras de peptidoglucano adyacentes (véase fig. 5-7). Los tipos de aminoácidos encontrados y los grados de entrecruzamiento son componentes variables de la estructura del peptidoglucano. Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, la mayoría de los residuos están entrecruzados con las hebras adyacentes por cinco residuos glicina, lo que le proporciona una estructura a la pared celular rígida, bastante apretada (fig. 5-7A).¹⁴ En las bacterias gramnegativas, como *E. coli*, el entrecruzamiento está directamente entre el *meso*-DAP de una

“cadena” de peptidoglucano y el residuo D-alanilo terminal en la hebra adyacente (fig. 5-7B). El grado de entrecruzamiento determina si una estructura de pared celular se denomina “compresada” (muy entrecruzada) o “laxa”. Entre las bacterias grampositivas, existen más de 100 quimiotipos de peptidoglucano que difieren por tener varios aminoácidos sustituyentes unidos al grupo lactilo del ácido *N*-acetilmurámico o que tienen diferentes unidades de enlace que comprenden los puentes interpeptídicos.¹¹⁶ Pequeños cambios en el quimiotipo de la pared celular pueden suceder por la exposición a elevadas concentraciones salinas o a agentes antimicrobianos activos para la pared como la meticilina.^{35,139}

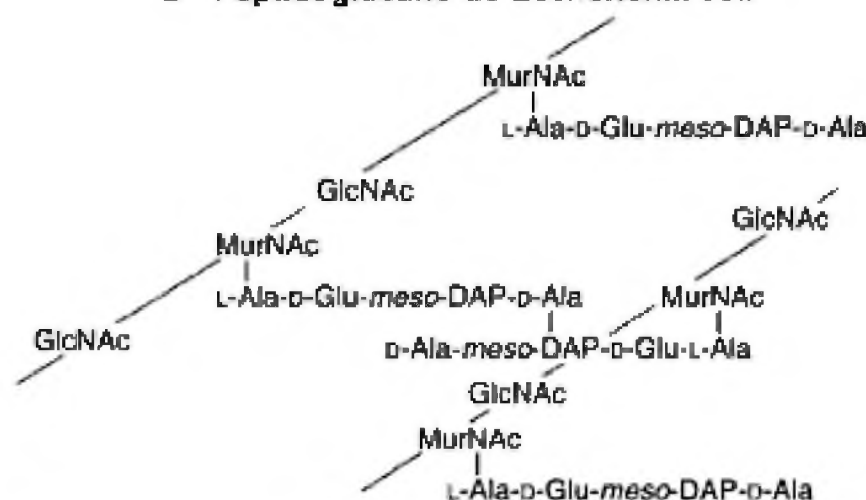
La biosíntesis de la pared celular es un proceso continuo. Los polímeros de peptidoglucano nuevos se exportan desde la célula y se unen a los polímeros de la pared preexistentes en la cara interna mediante **proteínas de unión a la penicilina**.^{100,105} Al mismo tiempo, el peptidoglucano más viejo superpuesto a las estructuras recién sintetizadas se elimina continuamente mediante autolisinas de la pared celular. Los antimicrobianos como las penicilinas y las cefalosporinas inhiben el crecimiento de la célula bacteriana mediante la unión a las proteínas de unión a la penicilina, con lo cual inhiben la renovación del polímero en la cara interna de la pared. La hidrólisis autolítica continua de los materiales peptidoglucanos más viejos causan el adelgazamiento de la pared que finalmente deriva en la lisis celular.^{73,139}

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

La pared celular de las bacterias grampositivas (fig. 5-8A) tiene un espesor de casi 80 nm y está compuesta en su mayor parte por varias capas de peptidoglucano; en efecto, desde el 40% hasta más del 80% del peso seco de algunas paredes celulares grampositivas puede ser peptidoglucano. Atrapadas dentro de esta matriz de peptidoglucano hay diversas proteínas, polisacáridos y moléculas singulares llamadas ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos son polímeros de unidades de ribitol (de 5 carbonos) o glicerol (de 3 carbonos) unidas mediante enlaces fosfodiéster (fig. 5-9). Los ácidos teicoicos de ribitol están asociados con la pared celular, mientras que los ácidos teicoicos de glicerol están asociados con la cara interna de la membrana celular bacteriana. Los ácidos teicoicos de ribitol están unidos en forma covalente al peptidoglucano mediante el grupo carboxilo del C6 del ácido *N*-acetilmurámico, mientras que los ácidos teicoicos del glicerol están unidos a los glucolípidos de la membrana citoplasmática. Estas últimas moléculas se denominan ácidos lipoteicoicos. Están unidos a la capa lipídica externa de la membrana celular y se extienden hacia el interior de la pared celular.¹³⁰ Los ácidos teicoicos de diferentes bacterias son más tarde modificados por adición de grupos “R” que incluyen residuos D-lisina o D-alanina mediante enlaces éster o glucosa, galactosa o *N*-acetilglucosamina mediante enlaces O-glucósido. Los ácidos teicoicos estabilizan la pared celular, mantienen la asociación de la pared con la membrana celular, forman quelatos con iones pequeños necesarios para la función celular y la integridad de la pared y participan en la interacción celular y la adherencia a la mucosa o a otras superficies. También pueden funcionar en la síntesis del peptidoglucano y en la formación de tabiques durante el crecimiento y la reproducción y cumplir un papel en la capacidad de algunas bacterias grampositivas de sufrir transformaciones. En algunos organismos, los ácidos teicoicos son antigénicos y forman las bases para el agrupamiento antigénico (p. ej., el antígeno del grupo D en estreptococos del grupo D y miembros del género *Enterococcus*).

A Peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*

Abreviaturas: GlcNAc: *N*-acetilglucosamina; MurNAc: ácido *N*-acetilmurámico; Ala: alanina; Glu-NH₂: isoglutamina; Lys: lisina; Gly: glicina.

B Peptidoglucano de *Escherichia coli*

Abreviaturas: véase arriba; además, Glu: glutamato; DA: diaminopimelato.

Figura 5-7 Estructura del peptidoglucano en *Staphylococcus aureus* (A) y *Escherichia coli* (B).

En los distintos grupos de bacterias grampositivas patógenas, también pueden estar presentes otras estructuras de la pared celular que son determinantes importantes de virulencia. Por ejemplo, la proteína M, un factor de virulencia bien reconocido de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A, está asociada con los ácidos teicoicos en la pared celular estreptocócica y se extiende hacia el exterior de la pared como una proteína de la fimbria (véase cap. 12).⁶⁸ El grupo de antígenos de los estreptococos β -hemolíticos de los grupos A, B, C, F y G también son polisacáridos ácidos no teicoicos que se encuen-

tran en la pared celular. El polisacárido C hallado en las paredes celulares de *Streptococcus pneumoniae* es un ácido lipoteicoico complejo compuesto por ribitol y fosfato sustituido en varios puntos con *N*-acetil-D-galactosamina, D-glucosa, *N*-acetil-2,4-diamino-2,4,6-tridesoxihexosa en un enlace O-glucosídico y colina en un enlace diéster.⁷³

Las paredes celulares de las bacterias grampositivas (y de algunas gramnegativas) tienen también un componente llamado capa-S. Esta capa se compone de moléculas de proteína o glucoproteína de 50-120 kDa de peso molecular que se reúnen

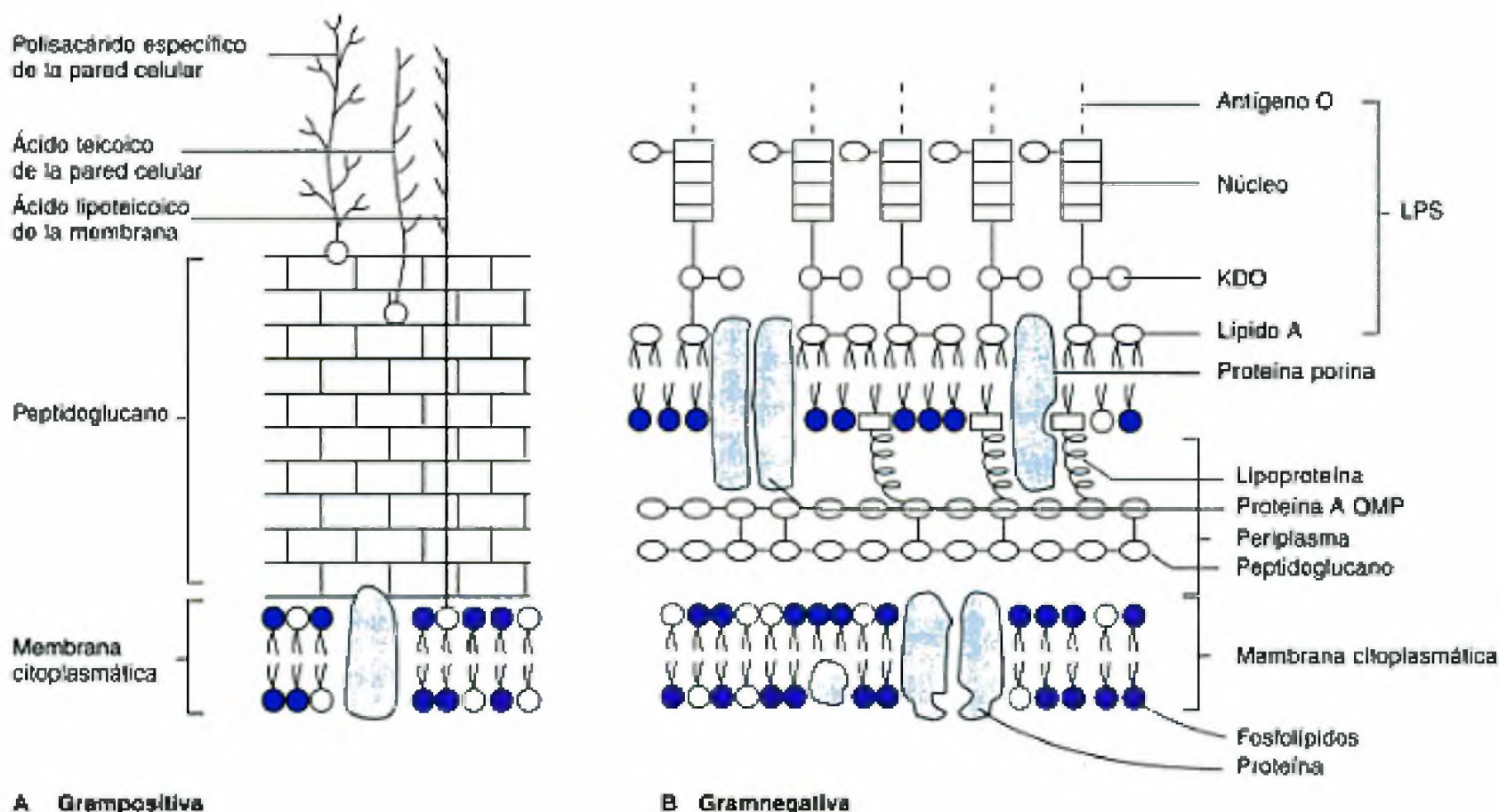


Figura 5-8 Estructura de la pared celular de bacterias grampositivas (A) y gramnegativas (B). KDO: ceto-desoxioctulonato; LPS: lipopolisacárido.

en la superficie externa del organismo y forman estructuras mediante entrecruzamientos hexagonales, cuadrados u oblicuos.^{12,126} El material de la capa-S puede constituir más del 20% de la proteína celular total. Observada con el microscopio electrónico, parece una "capa" extra en la parte superior de la pared celular. Las técnicas de microscopía electrónica con congelación y fractura han mostrado capas-S en especies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter* y *Aeromonas*. Estas capas pueden funcionar para proteger al organismo de medioambientes hostiles y rigurosos. En los microorganismos patógenos, la capa-S puede inhibir la fagocitosis o impedir la unión de la inmunoglobulina y el comple-

mento. Ahora se sabe que en *Bacillus anthracis* la capa-S es el principal antígeno de la pared celular de ese microorganismo y que junto con la cápsula y las dos toxinas puede contribuir a la virulencia.⁴⁴

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

La pared celular de las bacterias gramnegativas (véase fig. 5-8B) es más delgada que la de las bacterias grampositivas, pero es más compleja desde el punto de vista estructural. Inmediatamente afuera de la membrana citoplasmática está el **espacio periplásmico**. Este espacio contiene enzimas degradativas (fosfatasa alcalina, proteasas, nucleosidasas, β -lactamasas y aminoglucósido fosforilasas) y proteínas transportadoras y de unión específicas para vitaminas, aminoácidos y iones. Una **capa única de peptidoglucano gruesa** forma el borde externo del espacio periplásmico. Como la capa de peptidoglucano es sólo una capa gruesa, el entrecruzamiento sucede con las hebras de peptidoglucano adyacentes más que con las capas de peptidoglucano más profundas o más externas a la superficie celular individual. Los entrecruzamientos se forman desde el grupo carboxilo del residuo β -alanina terminal en una cadena al grupo amino libre de un residuo *meso*-DAP en una cadena adyacente (fig. 5-7B). La capa de peptidoglucano de las bacterias gramnegativas es bastante "laxa", es decir, tan sólo la mitad de las cadenas peptídicas unidas a los residuos del ácido *N*-acetilmurámico están en realidad involucradas en el entrecruzamiento. Además, el entrecruzamiento dentro del peptidoglucano sucede directamente desde el tetrapéptido muramilo en una cadena de peptidoglucano hasta el tetrapéptido muramilo de una cadena peptidoglucano adyacente (no puentes interpeptídicos como en la figura 5-7A).

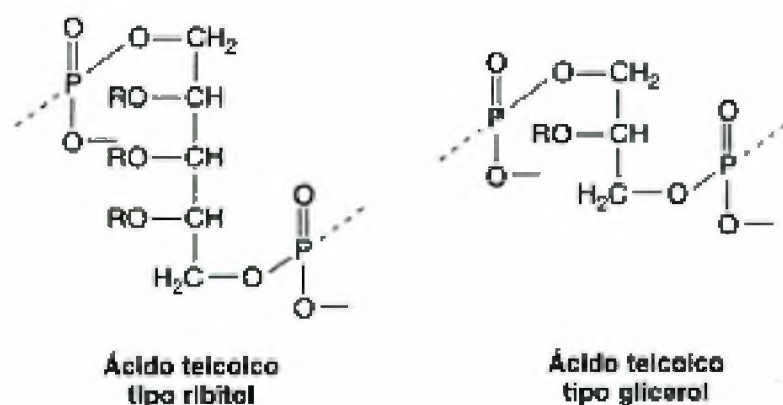


Figura 5-9 Estructura de los ácidos teicoicos de bacterias grampositivas. A la izquierda se muestra el ácido teicoico ribitol; a la derecha el ácido teicoico glicerol. Las sustituciones de grupos "R" pueden incluir uniones ésteres con D-alanina o D-lisina o enlaces O-glucosídicos con glucosa, galactosa o N-acetilglucosamina.

polisacárido central está bastante conservada dentro de un género dado, pero puede variar de una especie a otra. Las cadenas laterales O-específicas se unen al polisacárido central y son responsables de la especificidad antigénica de las cepas individuales. Estas cadenas contienen un número variable (más de 40) de unidades oligosacáridas repetidas compuestas por tres a cinco monosacáridos cada una. Son cadenas antigénicamente específicas que contienen residuos de hidratos de carbono poco comunes, como el ácido aminohexurónico, 6-desoxihexosas y 2,6-didesoxihexosas. La mitad del lípido A parece ser el componente principal responsable de las manifestaciones de la actividad endotoxina en pacientes con sepsis bacteriana por gram-negativos (p. ej., fiebre, shock, colapso vascular y hemorragia). La endotoxina también puede activar el complemento y causar coagulación intravascular diseminada. En la figura 5-10A se muestra la estructura generalizada del LPS de las especies de *Salmonella*, mientras que la estructura del lípido A, los polisacáridos centrales y los antígenos somáticos se observan en la figura 5-10B, C y D, respectivamente.

La disociación del LPS de la membrana externa se puede lograr en forma parcial por el tratamiento de suspensiones de células con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que forma quelatos con los cationes divalentes de la membrana externa. Un tratamiento posterior con lisozima hidroliza la capa de peptidoglucano de las bacterias gramnegativas y las células se pueden lisar. La integridad de la membrana externa depende de los iones calcio y magnesio, una de las principales razones para la inclusión de esos iones en el medio que se usa para probar la sensibilidad antimicrobiana.

Algunas bacterias gramnegativas (p. ej., *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*) tienen **lipooligosacáridos (LOS)** en vez de LPS en sus paredes celulares.^{62,100} El LOS contiene lípido A y un centro de oligosacárido que contiene KDO, pero no tiene un antígeno O polisacárido de cadena larga como se encuentra en el LPS de las bacterias entéricas.¹⁶ Estas moléculas, similares a endotoxinas, tienen una extensión de actividad biológica, entre ellas la toxicidad general, la pirogenicidad y la capacidad particular de inducir la mitogenicidad y la activación policlonal de las células B.²⁰ La variación antigénica de *N. gonorrhoeae* se debe en parte a la alta frecuencia de la modulación estructural de los LOS, que afecta la adherencia gonocócica a las superficies de las mucosas y la sensibilidad a la acción bactericida del suero humano normal.^{119,120}

La membrana externa gramnegativa también contiene fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos son similares a los encontrados en la membrana citoplasmática e incluyen fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol. Las proteínas también constituyen una porción importante de la membrana externa. Las que están presentes en mayor concentración se llaman **proteínas principales de la membrana externa (OMP)**. Estas proteínas se dividen en tres grupos principales. Las **proteínas porinas** forman canales que atraviesan la membrana externa a través de los cuales los materiales de bajo peso molecular (p. ej., aminoácidos, azúcares, iones) pueden ingresar en el espacio periplásmico. Muchas de estas proteínas porinas tienen una estructura "trímero" (tres proteínas idénticas que constituyen un poro en forma de rosquilla). Las porinas también ayudan a limitar el pasaje de algunos agentes antimicrobianos hacia el interior de la célula. Las **proteínas transmembrana** son proteínas no porinas que atraviesan la membrana externa, se extienden a través del periplasma y están asociadas con la capa de peptidoglucano de la pared celular. Pueden funcionar en la producción y secreción de exoenzimas, el transporte de proteínas específicas, la adhesión a las superficies o la unión de los agentes anti-

microbianos con sus dianas en la superficie celular (p. ej., las proteínas de unión a la penicilina). Las **proteínas periféricas** son responsables del transporte transmembrana de moléculas que son demasiado grandes para entrar por la porina. La mayoría de estas proteínas son componentes de los sistemas de permeasas específicas de sustrato (p. ej., el sideróforo une y transporta hierro hacia el interior de la célula). Las lipoproteínas (véase antes) son las proteínas más pequeñas de la membrana externa y estabilizan la pared celular mediante un enlace covalente con el peptidoglucano.

La estructura de la pared celular bacteriana tiene una importancia práctica y directa para los microbiólogos porque su tipo es en gran parte responsable de la reacción de la **tinción de Gram**. Esta tinción diferencial divide la mayoría de las bacterias en dos grupos: **bacterias grampositivas** y **bacterias gramnegativas**. En el procedimiento de tinción de Gram, las células 1) se tiñen con **violeta de genciana** (cristal violeta), 2) se tratan con **yodo** para formar un complejo de violeta de genciana y yodo dentro de la célula, 3) se lavan con un **solvente orgánico** (alcohol-acetona) y 4) se tiñen de nuevo con el colorante de contraste rojo **safranina**. En las bacterias grampositivas, el complejo de violeta de genciana y yodo es retenido dentro de la célula después del lavado con alcohol-acetona porque la gruesa capa de peptidoglucano no permite que sea extraído de la célula. En las bacterias gramnegativas, el complejo de violeta de genciana y yodo desaparece de la célula (las células se decoloran) debido a la rotura de la membrana externa rica en lípidos causada por el solvente orgánico alcohol-acetona. Estas células decoloradas deben ser sometidas a una tinción de contraste para observarlas con la luz del microscopio; esta "contratinción" está provista por la safranina. Las bacterias grampositivas aparecen azul-violáceas observadas con el microscopio, mientras que las gramnegativas se tiñen de rojo por la tinción de contraste con safranina.

Algunas bacterias gramnegativas carecen de la estructura compleja de la pared celular descrita. Los microorganismos del grupo *Cytophaga-Flexibacter-Flavobacterium* tienen membranas externas que contienen ornitina-aminolípidos y sulfolípidos como componentes principales, junto con grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada con cadenas laterales de número impar de átomos de carbono. Los *Archaea* carecen de una estructura peptidoglucano y en su lugar tienen un "seudopeptidoglucano" compuesto por proteínas, ésteres de glicerol y ácido *N*-acetiltalosaminurónico (el *meso*-DAP y el ácido *N*-acetilmurámico están ausentes). Algunos *Archaea* incluso carecen de este peptidoglucano rudimentario y tienen en su lugar una pared celular delgada que consta de proteínas o polisacáridos sulfatados.

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES

Una modificación de la pared celular grampositiva se observa en los microorganismos pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium*, en los cuales los lípidos constituyen el 60% del peso seco de la pared. Estos microorganismos contienen moléculas llamadas **ácidos micólicos** en sus paredes celulares. Los ácidos micólicos son ácidos grasos β -hidroxilados, α -sustituidos grandes que se encuentran como ésteres unidos a los polisacáridos de la pared celular.¹⁰ Los ácidos micólicos varían en el número de átomos de carbono; aquellos con 30 carbonos (C30) se encuentran entre las corynebacterias (ácidos corinemicolénicos), los que tienen 50 carbonos (C50) se encuentran en especies de *Nocardia* (ácidos nocárdicos) y los de 90 carbonos (C90) o más constituyen los

ácidos micólicos encontrados en el género *Mycobacterium*. En *Mycobacterium tuberculosis*, el ácido micólico 6,6'-dimicollitrehalosa es conocido como **factor cordón** (fig. 5-11A). Esta molécula está asociada con la virulencia de *M. tuberculosis* y tiene un amplio espectro de actividades biológicas, como la citotoxicidad de la membrana celular, la inhibición de la migración de células polimorfonucleares, la inducción de la formación de granuloma, la adyuvancia, la actividad antitumoral y la capacidad para activar la ruta del complemento alternativa.

La membrana celular de las micobacterias es similar a otras membranas bacterianas excepto en que contiene **manósidos de fosfatidilinositol** y **lipoarabinomananos**. Por fuera de la membrana está la capa de peptidoglucano que se compone de *N*-acetilglucosamina en un enlace β -1,4 con ácido *N*-glucolilmurámico.¹⁵ La capa de mureína está entrecruzada por puentes tetrapeptídicos que contienen residuos L-alanina, D-glutamato y *meso*-DAP. Algunos de los residuos de ácido *N*-glucolilmurámico están unidos por enlaces fosfodiéster a una capa superpuesta de macromoléculas polisacáridos de cadena ramificada llamados **arabinogalactanos** (contienen por mitades arabinosa y galactosa). Los residuos de arabinosa alejados de esta capa se unen a los ácidos micólicos superpuestos. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con la de los otros lípidos y glucolípidos asociados con la pared celular, los cuales incluyen los grupos acilograsos cortos (C12 a C20) y medianos (C24 a C36) y los sulfolípidos trehalosa (fig. 5-11B). Los sulfolípidos de trehalosa, tipificados como el sulfolípid principal de *M. tuberculosis* **2,3,6,6'-tetraaciltrehalosa-2'-sulfato**, están asociados con la virulencia micobacteriana en que esas moléculas pueden actuar para impedir la fusión lisozima-fagosoma posterior a la fagocitosis de las células micobacterianas, con lo cual les permite a los microorganismos sobrevivir como parásitos intracelulares facultativos.^{57,58} Las capas de arabinogalactano y ácido micólico de la pared sobresalen de la membrana plasmática a través del peptidoglucano y son sustituidas por fofolípidos (manósidos de fosfatidilinositol) y lipopolisacáridos (lipoarabinomananos) que se unen a la cara externa de la membrana celular micobacteriana. Estas moléculas producen un enlace no covalente entre la membrana y la pared celulares. Las proteínas ancladas en la pared celular de las micobacterias están involucradas en la biosíntesis y construcción de los polímeros de la pared y algunas también funcionan como porinas.

Los microorganismos ácido-alcohol resistentes se tiñen de rojo con el colorante básico fucsina fenicada (carbol fucsina) y son resistentes a la decoloración con alcohol-ácido. Debido a la hidrofobicidad de la pared celular micobacteriana, la penetración del colorante hacia el interior de la célula se mejora con el tratamiento con calor (método de Ziehl-Neelsen) o con la incorporación de detergente en el colorante (método de Kinyoun). La resistencia a la decoloración por alcohol-ácido ("ácido-alcohol resistencia") está asociada con los residuos de ácido micólico-arabinogalactano que constituye la mayor parte de los constituyentes de la pared exteriores a la capa de peptidoglucano. Los lípidos solubles contribuyen con las propiedades de ácido-alcohol resistencia de las células micobacterianas pero no las determinan porque la extracción de esos lípidos disminuye la ácido-alcohol resistencia pero no la destruye. La rotura mecánica de la pared celular y la extracción de sus lípidos con álcalis etanólicos que eliminan tanto los lípidos libres como los esterificados destruyen las propiedades de ácido-alcohol resistencia de estos microorganismos, lo que indica que el contenido total de lípidos de la pared celular es responsable de estas propiedades de tinción.

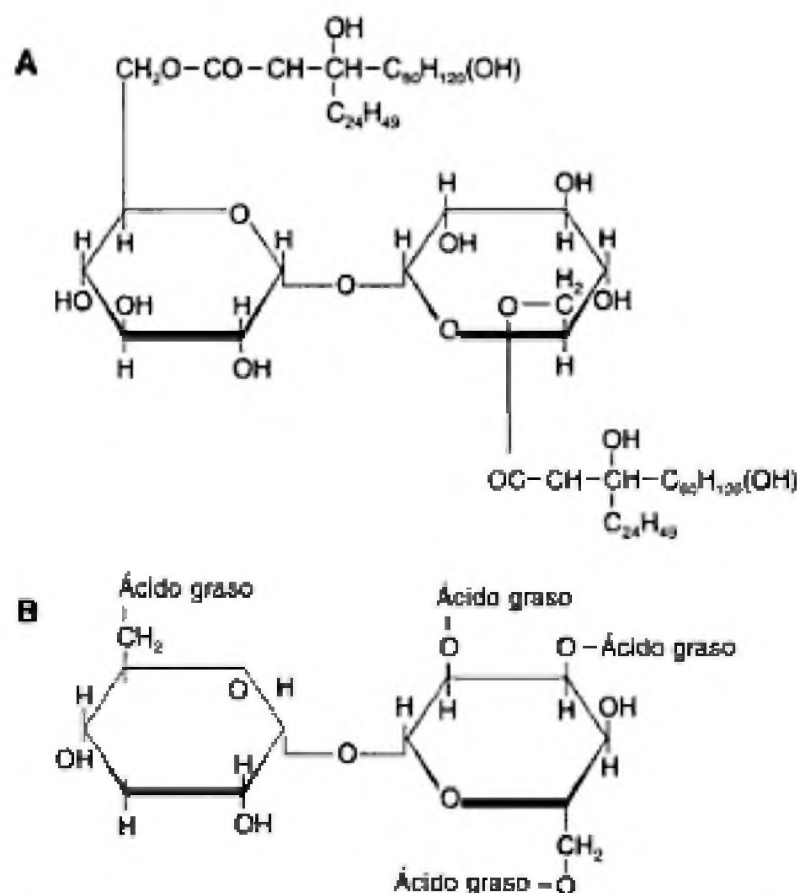


Figura 5-11 Estructura molecular de lípidos especializados encontrados en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. (A) Estructura molecular del factor cordón (6,6'-dimicollitrehalosa) producido por *Mycobacterium tuberculosis*. (B) Estructura molecular del sulfolípid principal (2,3,6,6'-tetraaciltrehalosa-2'-sulfato) de *M. tuberculosis*.

Endosporas bacterianas

Las endosporas son estructuras esféricas u ovales formadas dentro de ciertas especies bacterianas que representan un estado latente o "de reposo" en el ciclo de crecimiento del microorganismo. Entre las bacterias de importancia clínica, las endosporas son formadas por bacilos grampositivos aerobios pertenecientes al género *Bacillus* y otros géneros relacionados, y por los grampositivos anaerobios del género *Clostridium*. En estos géneros, las endosporas se forman en respuesta a la carencia nutricional dentro de la célula bacteriana vegetativa. Son muy resistentes a los efectos dañinos del calor, la desecación, la presión y muchos desinfectantes químicos. Son necesarias temperaturas de esterilización (120 °C durante 15-20 minutos) para matarlas. Se cree que la resistencia al calor se debe a las cantidades reducidas de agua en el núcleo de la espora. El tamaño, la forma y la ubicación de las endosporas incipientes en las células en fase estacionaria de *Clostridium*, *Bacillus* y especies relacionadas es útil para la caracterización e identificación de ciertas especies dentro de estos dos géneros (véanse caps. 12 y 13). Las endosporas pueden ser esféricas, subesféricas u ovales, pueden diferir en su ubicación dentro de la célula (central, terminal o subterminal) y pueden abultar la célula o no. Por lo general, no se tiñen con los métodos habituales de tinción, como la tinción de Gram, y aparecen como cuerpos no teñidos, refringentes en los frotis.

Con el estímulo de ciertas condiciones medioambientales, como el agotamiento de los nutrientes (glucosa, nitrógeno o fosfato) o la exposición a temperaturas o potenciales de oxidoreducción subóptimos, el material nuclear se divide en dos

nucleoides, y uno se separa del otro por una membrana o tabique.⁶⁷ Luego el tabique crece y el núcleo de la espora se engloba en una membrana doble. Entre las dos membranas, se deposita una capa externa o corteza que consta en principio de material peptidoglucano. La corteza se engrosa y acumula iones calcio debido a la actividad de quelación de una molécula particular llamada **ácido dipicolínico**. El centro está protegido por la concentración elevada de iones calcio que entrelazan estrechamente el material peptidoglucano y toda el agua disponible en la espora se expulsa. Se depositan varias capas de la cubierta (una sustancia similar a la queratina que es rica en puentes disulfuro) y la endospora se libera en el momento de la muerte y lisis de la célula vegetativa progenitora. Las endosporas pueden permanecer viables por largos períodos. Cuando se ubica en un medioambiente favorable en presencia de algún estímulo (aminoácidos, hidratos de carbono y agua), la espora crece. Por estos estímulos, las enzimas se activan, degradan la corteza de la espora y liberan el material peptidoglucano, los iones calcio y el ácido dipicolínico. Comienza la síntesis de RNA, seguida por la síntesis de proteínas y, por último, la síntesis de DNA. De allí resulta una nueva célula vegetativa.

Estructuras de la superficie bacteriana CÁPSULAS

Algunas bacterias tienen una cápsula externa a la capa exterior de la pared celular. La cápsula puede ser delgada o gruesa y asociarse con firmeza o laxitud a la cara externa de la pared celular. La asociación laxa también se denomina **capa mucilaginosa o glucocáliz**. Por lo general, el material capsular es de naturaleza polisacárida y pueden ser polímeros de monosacáridos simples (glucanos, dextranos, levanos) o heteropolisacáridos que contienen azúcares tanto pentosas como hexosas, más ribitol, glicerol u otros azúcares alcoholes. También están presentes a menudo los fosfatos. En la mayoría de los casos, la cápsula se sintetiza en la membrana celular; los componentes se sintetizan y exportan hacia el exterior de la célula mediante un sistema de "transporte" de lípidos isoprenoides, en el cual los componentes se unen al material capsular "cebador" ya antes presente sobre la superficie de la célula. En algunos casos, como la cápsula de glucano de *Streptococcus mutans*, la cápsula es sintetizada por una clase de enzimas extracelulares asociadas con la pared celular llamadas **glucosiltransferasas y fructosiltransferasa**.¹⁴⁵ La acción de estas enzimas en una dieta con sacarosa crea una matriz ramificada de **glucano insoluble** que interactúa de modo específico con la superficie de los dientes y con los receptores en la célula de *S. mutans*. La formación posterior de ácidos a partir de la sacarosa de la dieta y de los depósitos intracelulares de glucógeno por *S. mutans* y otros microorganismos conduce a la formación de las caries dentales.^{28,63}

La cápsula bacteriana cumple varias funciones: protege a la célula de la desecación y de los materiales tóxicos del medioambiente (p. ej., iones de metales pesados, radicales libres) y promueve la concentración de nutrientes en la superficie celular bacteriana debido a su naturaleza polianiónica. Además, desempeña un papel en la adherencia de las bacterias a las células y superficies de las mucosas. Esta adherencia es requerida por muchos microorganismos para producir infecciones en huéspedes apropiados (se verá más adelante). Algunas cápsulas bacterianas funcionan para proteger a las células de la fagocitosis (en ausencia de anticuerpos anticapsulares) de los leucocitos polimorfonucleares. El material capsular por lo general es antigénico y la detección serológica de la cápsula constituye la base de la **prueba de hinchazón capsular de Neufeld** (cap.

12), que puede usarse para identificar varios subtipos de bacterias patógenas humanas importantes, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tipo b, *Klebsiella pneumoniae* o serogrupos de *Neisseria meningitidis*. El material capsular de muchos microorganismos se sintetiza en abundancia y se desprende hacia el líquido circundante tanto in vivo como in vitro. Este material puede detectarse en varios líquidos corporales (p. ej., suero, líquido cefalorraquídeo y orina) durante la infección por bacterias encapsuladas e identificarse de modo específico mediante electroforesis o pruebas de aglutinación para obtener un diagnóstico rápido (véase cap. 3).¹²²

En los últimos años, la estructura capsular de *Staphylococcus aureus* ha sido un área de interés tanto para la ciencia experimental como para los microbiólogos clínicos. Más del 90% de las variedades de *S. aureus* aisladas en el laboratorio clínico son encapsuladas y estas cápsulas se han dividido serológicamente en 11 tipos. Los tipos caracterizados hasta ahora (tipos 1, 2, 5 y 8) son hidratos de carbono complejos N-acetilados y O-acetilados en enlaces β -1,4 y β -1,3.^{49,96} Los tipos capsulares 5 y 8 predominan entre las cepas aisladas clínicamente, y un número importante de cepas resistentes a la oxacilina expresan el polisacárido capsular de tipo 5.⁶² De interés para el microbiólogo es que las pruebas de aglutinación del látex usadas en los laboratorios clínicos para identificar el tipo capsular 5 de las cepas de *S. aureus* no son confiables.⁴⁶ Por esa razón, ahora se incluyen partículas de látex recubiertas con anticuerpos para los polisacáridos capsulares 5 y 8 en algunas formulaciones de la prueba de aglutinación del látex.⁴⁶

En algunas especies bacterianas, como *Bacillus* y especies relacionadas, la cápsula es de naturaleza polipeptídica. *Bacillus anthracis*, la causa del carbunco, está encapsulado tanto en tejidos infectados como cuando crece en medios que contienen bicarbonato o en un medioambiente con más del 5% de CO₂. Tanto la formación de la cápsula como la producción de la toxina se "activan" por estas condiciones de cultivo, que reflejan las mismas concentraciones de CO₂ y bicarbonato encontradas en los tejidos infectados con *B. anthracis*.¹⁴² La cápsula de *B. anthracis* se compone de cadenas de α -péptidos de D-glutámico unidos que se extienden desde 50 a 100 residuos por cadena.¹⁴² La presencia de cápsula confiere a *B. anthracis* resistencia a la fagocitosis.⁹⁰

FLAGELOS

Los flagelos bacterianos son apéndices filamentosos largos que surgen de la membrana citoplasmática y se extienden a través de la pared celular hacia el medio circundante. Son responsables de la movilidad celular. Los flagelos, por lo general, se encuentran en los bacilos gramnegativos, aunque también se encuentran en los bacilos grampositivos (p. ej., especies de *Listeria*) y los cocos (algunas especies de *Enterococcus*, especies de *Vagococcus*) móviles. Los flagelos difieren en número y disposición en las células. Las bacterias con un único flagelo polar se denominan **monotricas**; aquellas con dos o más flagelos que se originan en un polo o punto son **lofotricas**; las que tienen un único flagelo ubicado en dos puntos diferentes o polos se llaman **anfotricas**, y las que poseen dos o más flagelos en dos puntos o polos de la célula se llaman **anfilofotricas**. Los organismos que tienen flagelos que surgen por encima de la superficie celular íntegra se denominan **peritricos**.

En las bacterias gramnegativas, se ha demostrado que los flagelos tienen una estructura compleja que consta de tres partes: el **filamento**, el **codo o gancho** y el **corpúsculo basal** (fig. 5-12). El filamento flagelar tiene un diámetro de 13-17 nm y

una longitud variable. Está compuesto por subfibrillas paralelas de la subunidad de 30–40 kDa de la proteína **flagelina**, que interactúa para formar un cilindro hueco. El filamento es semi-rígido y forma una hélice levógiara mientras sale de la célula. La flagelina tiene la capacidad de autoensamblarse. Los monómeros de la proteína se sintetizan y pasan a través de la luz del cilindro. En el extremo creciente de la hélice del flagelo, el monómero sufre un cambio conformacional y se agrega al extremo distal del flagelo. El codo está compuesto por otra proteína distinta y actúa como una “manga” de la cual emerge el filamento flagelar. El codo permite la transmisión de un movimiento rotatorio desde el corpúsculo basal hasta el filamento. El **corpúsculo basal** está compuesto por anillos complejos conectados por una estructura en forma de vástago. Los anillos **M**, **S**, **P** y **L** están anclados en la membrana, el espacio periplasmático, el peptidoglucano y el polisacárido de la membrana exterior, respectivamente. Al menos 10 proteínas componen la estructura del anillo exterior en las bacterias gramnegativas. La estructura anular unida a la membrana celular rota por una reacción dependiente de energía y hace girar la hélice flagelar rígida como un motor de propulsión. La energía para esta reacción proviene del paso de protones desde el exterior hacia el citoplasma a través del corpúsculo basal. Los anillos externos (anillos L y P) funcionan como partes fijas y reducen la fricción y la pérdida de materiales de la célula en los puntos de inserción flagelar. En las bacterias grampositivas, la estructura flagelar es menos compleja y está compuesta por dos anillos. Una estructura anular conecta el flagelo con la membrana plasmática, mientras que la segunda estructura anular se inserta en la gruesa capa de peptidoglucano.

Varias especies de flagelados también pueden alterar el tipo antigénico expresado que producen los flagelos; este proceso se conoce como **fase de variación**.¹²¹ Esto se refiere a la capacidad de los microorganismos de expresar dos tipos de flagelos en forma alternada. La fase de variación sucede por la expresión diferencial de genes cromosómicos que codifican dos proteínas flagelina estructuradas de modo diferente. Este fenómeno fue reconocido por primera vez en bacterias gramnegativas entéricas, como especies de *Salmonella*, pero también ocurre en otras especies, como *N. gonorrhoeae* (véase más adelante). Los antígenos flagelares de los bacilos gramnegativos se denominan antígenos H, por el término alemán *hauch* que significa “respiración”. Algunos microorganismos tienen estructuras flagelares muy modificadas. Las especies vibrio tienen la morfología flagelar típica, pero el flagelo está encajado en una vaina originada en la membrana externa de la pared celular. En las espiroquetas, el flagelo no protruye hacia el medio exterior sino que se ubica dentro de una vaina hacia afuera del cilindro protoplasmático del cuerpo celular del microorganismo. Este endoflagelo o **filamento axial** se origina en un polo de la célula y se enrolla alrededor del cuerpo celular por dentro de la vaina.

Otros orgánulos locomotores. Algunas bacterias gramnegativas muestran lo que se conoce como “movilidad deslizante”. Este tipo de movilidad es la más evidente cuando los organismos están en contacto con una superficie. En microbiología clínica, la movilidad deslizante se observa en las especies de *Capnocytophaga*, que son parte de la flora normal de la orofaringe humana y que en ocasiones se aíslan en procesos infecciosos (cap. 9). Los estudios con *Flavobacterium johnsonii* y otros microorganismos del grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* sugieren que las proteínas o glucoproteínas ubicadas dentro de la membrana externa se adhieren al sustrato y que otras proteínas dentro de la membrana celular recogen las fuer-

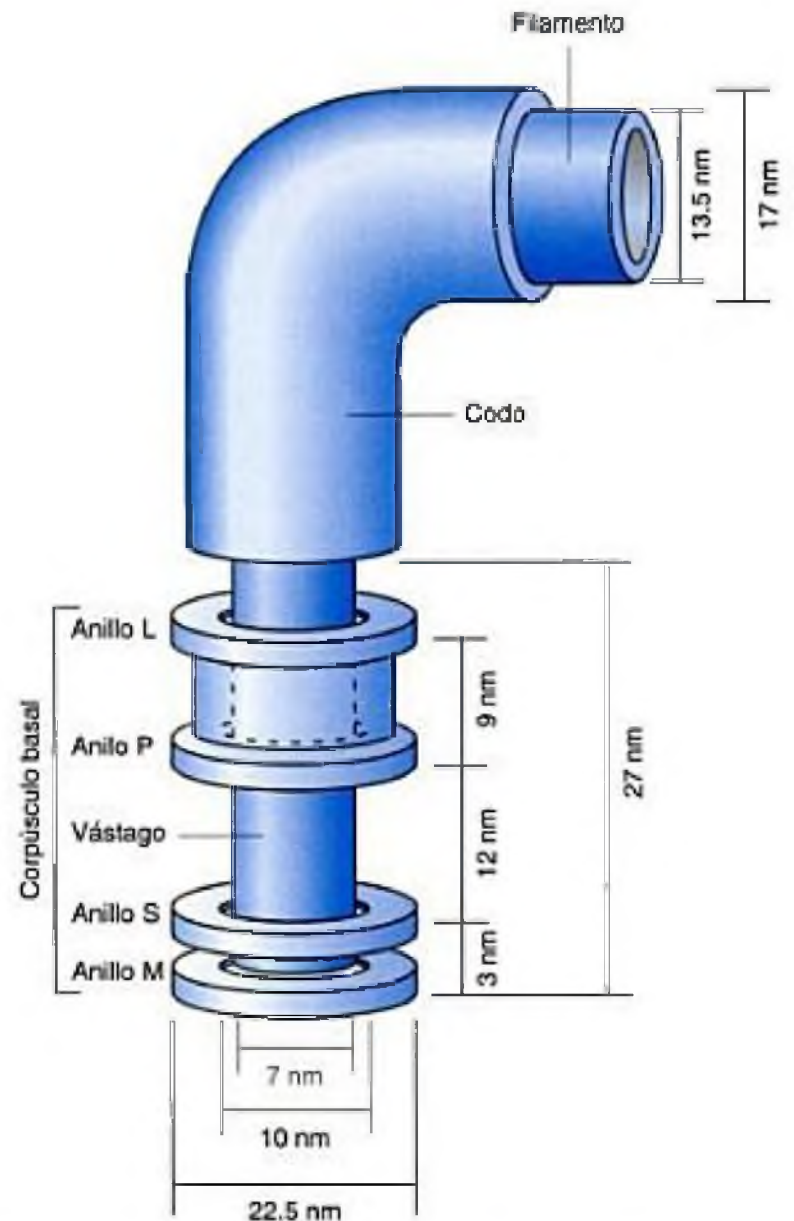


Figura 5-12 Estructura por microscopía electrónica de un flagelo de una bacteria gramnegativa.

zas motrices protónicas que causan que las proteínas de la superficie se muevan a lo largo de “carriles” dentro de la capa de peptidoglucano.^{92,93} Otros estudios también han demostrado la presencia de sulfonolípidos particulares en la membrana externa de las bacterias deslizantes que están ausentes en mutantes no móviles de la misma especie.¹ Usando mutantes no móviles espontáneos, inducidos químicamente y por transposones, se han identificado varios genes y operones no relacionados involucrados en la movilidad deslizante.⁷¹

FIMBRIAS (PILI)

Las fimbrias o pili son apéndices pequeños encontrados en la superficie de muchas bacterias gramnegativas y algunas grampositivas. Aunque los términos “pili” y “fimbrias” se han usado de modo intercambiable, el último se utiliza ahora para describir algunos apéndices similares a pelos no flagelares, mientras que el primero se utiliza para denotar las fimbrias de bacterias gramnegativas que funcionan en la transferencia de DNA desde una célula a otra durante el proceso de conjugación (pili sexual). Las fimbrias están compuestas por una proteína llamada **fimbrilina** (o **pilina**), que tiene un diámetro

de 3 a 25 nm y 10 a 20 µm de longitud. La fimbriolina producida en las bacterias gramnegativas es una proteína subunitaria de 17 a 20 kDa de peso molecular. Las proteínas forman tubos huecos que se originan en la membrana celular, pero que carecen de los corpúsculos basales y los codos de los flagelos. Las subunidades de la proteína de las fimbrias se agregan a la base de la estructura y no en el extremo, como se observa en la síntesis flagelar. Los pili sexuales están involucrados en la constitución de apareamientos específicos para el intercambio de material genético durante la conjugación y son también sitios de adhesión de los bacteriófagos.

Las fimbrias funcionan, además, como orgánulos celulares para la fijación a las células o a las superficies de las mucosas, que son útiles para esta función de fijación y se conocen como **adhesinas**. La mayoría de las adhesinas exhiben una unión similar a la de la lectina con los residuos carbohidratos terminales (p. ej., manosa).¹⁰ Por ejemplo, la adherencia de las bacterias entéricas a la superficie de las mucosas que está mediada por pili de tipo 1 (específico de tipo) o comunes se puede inhibir por preincubación de las bacterias con manosa. Ésta se fija a la porción terminal de la adhesina y bloquea la adherencia; por lo tanto, los pili de tipo 1 se denominan sensibles a la manosa. Las adhesinas que no se afectan por la manosa se llaman manosa resistentes; los pili resistentes a la manosa se denominan de tipo 2. Las diferencias de especificidades similares a las de la lectina son en parte responsables de los tropismos de los tejidos observados en diversas especies bacterianas.

El papel de las fimbrias como factores de virulencia en bacterias gramnegativas ha sido estudiado extensamente en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.^{64,107} Estas especies patógenas de *Neisseria* producen fimbrias similares desde el punto de vista estructural y antigénico que están compuestas por subunidades proteicas de 16,5 a 21,5 kDa. Las variedades virulentas de *N. gonorrhoeae* expresan estas fimbrias de superficie y son capaces de adherirse firmemente a las células de la mucosa en el tracto genital.¹⁰ Los microorganismos con fimbrias también son responsables de las colonias abovedadas de tipos 1 y 2 producidas en el aislamiento reciente de gonococos en un medio con agar. La pérdida de las fimbrias en subcultivos repetidos in vitro incapacita a esos organismos para iniciar la infección urogenital porque carecen de adherencia a las mucosas. Las colonias compuestas por gonococos sin pili son más grandes y más chatas. El gonococo tiene un gran número de genes que codifican proteínas de fimbrias distintas desde el punto de vista antigénico y estructural, las cuales sufren tanto la **fase de variación** como la **variación antigénica** (véase cap. 9). En la fase de variación, entre el estado con pili y sin pili, los genes *pil* (genes estructurales de las fimbrias) no se expresan o las proteínas de las fimbrias no se pueden formar en fimbrias funcionales. En la variación antigénica, los tipos de fimbrias nuevos pueden surgir debido a los episodios de recombinación entre los 20 genes de fimbrias presentes en el genoma bacteriano. Debido a la capacidad de una variedad gonocócica única para producir antígenos de fimbrias múltiples antigénicamente distintos, el uso de las fimbrias como antígenos candidatos para vacunas antigonocócicas ha sido en gran parte infructuoso.¹⁴⁶

Sólo un número limitado de especies de bacterias grampositivas, incluidos algunos estreptococos, corinebacterias y especies de *Actinomyces* muestran fimbrias en la superficie celular. *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces naeslundii*, bacilos grampositivos facultativos encontrados en la cavidad bucal, muestran dos tipos de fimbrias. Las fimbrias de tipo 1 median la adherencia bacteriana a la superficie de los dientes mediante la interacción con las proteínas ácidas ricas en prolina de la saliva,

mientras que las fimbrias de tipo 2 median la adherencia bacteriana a los estreptococos bucales y a varios tipos de células mamíferas, como los leucocitos polimorfonucleares y los eritrocitos.^{24,33,36,115} Estas fimbrias de tipo 2 se unen a residuos galactosa o *N*-acetilgalactosamina en la superficie de los estreptococos bucales congregados o con los oligosacáridos de las glucoproteínas de la membrana celular de los mamíferos.^{24,33,115} A diferencia de las fimbrias de las bacterias gramnegativas, las de las especies *Actinomyces* se unen de modo covalente a la capa de peptidoglucano de la pared celular.¹⁵⁹ La capacidad de las especies de *Actinomyces* bucales para adherirse a las células de la mucosa y congregarse con los estreptococos cariogénicos facilita la formación de la biopelícula y la iniciación de la placa dental. Se ha demostrado que los coagregados de fimbrias de *Actinomyces* y estreptococos bucales resisten la fagocitosis y la muerte mediada por células polimorfonucleares, y la unión de *Actinomyces* a los PMN libera los mediadores de la inflamación. Las fimbrias cumplen un papel clave en la capacidad de estos patógenos periodontales para colonizar e iniciar la infección.

Intercambio genético y recombinación en las bacterias

La replicación bacteriana se produce por fisión binaria, un proceso asexual que no involucra la recombinación y deriva en la generación de dos células hijas que son idénticas a las células de origen. Sin embargo, varios grupos de bacterias tienen la capacidad de sufrir intercambio genético y recombinación con otros microorganismos. El intercambio genético entre bacterias sucede por uno de los tres mecanismos generales: transformación, transducción y conjugación (fig. 5-13).

La **transformación** implica la captación de DNA libre del medioambiente circundante (fig. 5-13A). Las células fisiológicamente capaces de tomar e incorporar DNA libre hacia el interior de sus genomas se denominan **competentes**. La competencia es un estado transitorio que sucede hacia la fase de crecimiento exponencial tardía, aunque algunos organismos pueden ser competentes todo el tiempo. En las células grampositivas competentes (p. ej., *Bacillus subtilis*, *S. pneumoniae*), pequeños trozos de DNA de doble hebra se unen a la célula mediante un receptor de la superficie celular que se expresa durante el período de competencia. Conforme el DNA entra en la célula, una hebra se hidroliza por una nucleasa unida a la superficie. Los eventos de recombinación entre el DNA de hebra simple y las regiones homólogas del cromosoma bacteriano dan por resultado la integración del DNA transformado en el genoma de la bacteria. Si las regiones homólogas para el DNA transformado se pierden, la hebra del DNA no se integra, los genes en la hebra de DNA particular no se expresan y el DNA de hebra simple se degrada por endonucleasas de restricción endógenas. *H. influenzae*, una bacteria gramnegativa competente para la transformación, también tiene receptores para DNA sobre la superficie celular; la unión con el DNA ocurre mediante el reconocimiento de una secuencia nucleótido expresada en la superficie de 10-14 pares de bases que permite sólo al DNA de especies relacionadas unirse y entrar en la célula competente.¹²³ Luego, el DNA de doble hebra entra en la célula, pero sólo una hebra participa en los episodios de recombinación que incorporan el DNA transformador en el genoma del receptor. Las células que no expresan competencia para la transformación genética pueden hacerse permeables al DNA extracelular ("competentes artificialmente") por tratamiento con CaCl₂ u otras soluciones salinas a 0 °C o por **electroporación**, en la cual se exponen suspensiones de células a una

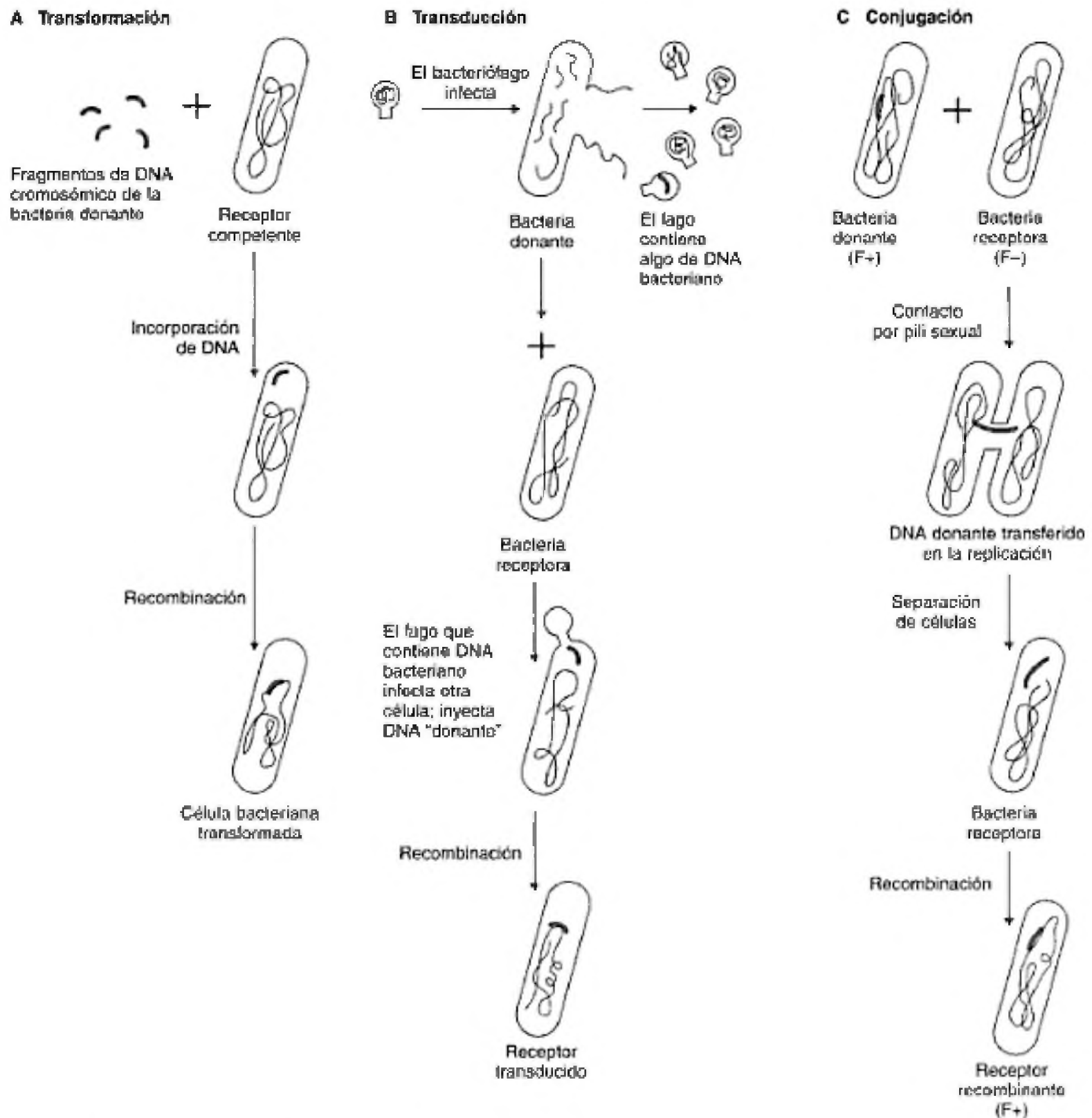


Figura 5-13 Mecanismos de transferencia génica en las bacterias. Los microorganismos pueden intercambiar material genético por alguno de los tres procesos: transformación (A), transducción mediante bacteriófago (B) y conjugación (C).

corriente eléctrica que induce la entrada de DNA en las células bacterianas.

La **transducción** se refiere al intercambio de información genética mediante bacteriófagos (fig. 5-13B). Los bacteriófagos (o simplemente "fagos") son virus que infectan a las bacterias. Algunos bacteriófagos son **líticos**; es decir, después de infectar la célula bacteriana, los genes reguladores del bacteriófago "toman posesión" de la maquinaria biosintética celular, lo que lleva a la expresión de los genes estructurales del fago y la producción de nuevas partículas de fago que se liberan, con lisis y muerte de la bacteria huésped. Con bacteriófagos mode-

rados, el material genético del bacteriófago se incorpora al DNA de la célula huésped como un "profago" y se replica junto con el cromosoma bacteriano. Tales bacteriófagos también se llaman **bacteriófagos lisogénicos**, y la célula bacteriana infectada con este fago se dice que está **lisogenizada**. Mediante inducción por exposición a ciertos productos químicos (p. ej., mitomicina C) o a irradiación ultravioleta, un bacteriófago lisogénico puede ser inducido a iniciar la producción de fagos nuevos (el fago se convierte en "lítico"). La escisión del DNA del bacteriófago del genoma celular bacteriano da por resultado algunos bacteriófagos que contienen no sólo genes específicos

de fago, sino también genes de la célula huésped adyacentes al sitio de integración del DNA del fago en el cromosoma bacteriano.

La transferencia de información genética durante la transducción puede ser generalizada o especializada. La **transducción generalizada** se refiere al empaquetamiento accidental o aleatorio del DNA de la célula huésped en la cápside o "cabeza" de la partícula de fago. La liberación de la partícula de fago madura en la lisis celular y la posterior infección de otra célula bacteriana deriva en la introducción del "DNA donante" de la bacteria huésped original en el "receptor". La recombinación del DNA transducido con una región homóloga en el cromosoma de la célula receptora provoca la integración y expresión posterior de los genes transducidos. La transducción generalizada sucede con una frecuencia de un fago transductor por cada 10^5 a 10^6 partículas de fago producidas en la inducción del estado lisogenizado, y alrededor del 1-2% de la longitud total del genoma de la célula huésped puede transferirse por este mecanismo. La **transducción especializada** es el empaquetamiento de genes específicos de la célula huésped en el profago transductor. Este tipo de transducción sucede con fagos moderados que tienen sitios de integración cromosómicos específicos, como el bacteriófago *lambda*. Sólo los genes celulares del huésped que flanquean el genoma del fago integrado tienen la oportunidad de incorporarse al genoma del bacteriófago en inducción desde el estado lisogénico. Se produce un fago transductor especializado por cada 10^5 a 10^6 partículas de fago nuevas siguientes a la inducción.

La **conjugación** es el único mecanismo de intercambio genético entre bacterias que requiere el contacto entre células (fig. 5-13C). Las bacterias gramnegativas que participan en la conjugación tienen un plásmido llamado **plásmido F** ("plásmido de fertilidad"). Este plásmido contiene un operón de genes llamado *región tra* que codifica el pili sexual (o pili conjugativo) y otras moléculas involucradas en la conjugación.⁴¹ El pili especializado funciona como un vehículo para establecer contacto con otra célula bacteriana. Una vez establecido el contacto, el pili sexual aparentemente se retrae, con lo que se acercan ambas células. El pili también puede actuar como un conducto a través del cual pasa el DNA durante el proceso de conjugación. Las células que tienen plásmido F se denominan F+, mientras que las que carecen de él se denominan F-. Una vez que se ponen en contacto una célula F+ con una célula F- por el pili sexual, el plásmido circular F comienza a replicarse. Durante este proceso, una de las hebras simples del DNA del plásmido se transfiere hacia el interior de la célula receptora. La hebra simple se replica a medida que entra en la célula receptora; el resultado final son dos células que contienen los plásmidos conjugativos completos (las dos células son F+).

En algunos microorganismos, el plásmido F se integra en el genoma de la célula huésped en sitios de integración específicos en los cuales están presentes las secuencias de nucleótidos homólogas. El establecimiento de una conexión mediante el pili F y la conjugación ulterior deriva en la transferencia de algunos genes del plásmido F más el material genético de la célula huésped que está adyacente al sitio de integración del plásmido F. Las células que tienen un plásmido F integrado se denominan **células Hfr** (*high-frequency recombinations*; recombinaciones de alta frecuencia). El apareamiento entre las células Hfr y las células F- da lugar a la transferencia de parte del genoma F más algunos genes celulares del huésped desde el donante. Las células receptoras F- por lo general permanecen F- después de la conjugación porque sólo parte del plásmido F de la célula donante Hfr se transfiere a la célula recep-

tora durante el proceso de conjugación. Por lo tanto, estas células receptoras no tendrán el operón completo necesario para que ocurra la conjugación. La recombinación entre el material genético de la célula donante y las regiones homólogas en la receptora F- permite que el DNA donante se exprese en la célula receptora. La célula donante permanece Hfr, porque el cromosoma de la célula huésped (que contiene el plásmido F integrado) se replica durante la transferencia del DNA genómico de hebra simple desde la célula Hfr hacia la célula F-.

Entre las bacterias grampositivas, *Enterococcus faecalis* también es capaz de intercambiar plásmidos mediante la conjugación. Sin embargo, la transferencia de genes no se produce a través de los pili, sino por una **coagregación** de los microorganismos en respuesta a **feromonas** producidas por la bacteria donante.⁴² Cuando se exponen a células libres de plásmidos (o a filtrados de cultivos de células libres de plásmidos), las células que contienen plásmidos producen feromonas codificadas por el plásmido llamadas **sustancias de agregación**. Estas sustancias son pequeños péptidos (siete a ocho aminoácidos) y se unen a los sitios que están presentes en ambas células, donante y receptora, y causan la agregación bacteriana. La agregación conduce al establecimiento de conexiones intercelulares necesarias para la transmisión del plásmido. Un dato interesante es que los enterococos que contienen plásmidos y sustancias de agregación similares responden sólo a las feromonas de las células que tienen plásmidos diferentes y, por lo tanto, producen sustancias de agregación diferentes. Hasta hoy se describieron 18 feromonas sexuales de plásmidos diferentes.⁴⁶

Además de estos mecanismos de transferencia génica, pueden participar otros elementos genéticos en los sucesos de recombinación que afectan las características y la patogenicidad de los microorganismos. Los **elementos genéticos transposables** son porciones de DNA que pueden insertarse en sitios diferentes no relacionados de un cromosoma bacteriano o plásmido. Debido a que estas inserciones ocurren al azar, se pueden generar mutaciones por discontinuidad en la secuencia del gen. Se describieron en *E. coli* y en una amplia variedad de otras bacterias. Al contrario de los mecanismos ya descritos, no se requieren regiones de secuencias de ácido nucleico homólogas para que esos elementos se recombinen. Los elementos genéticos transposables se dividen en dos grupos: las **secuencias de inserción** y los **transposones**. Por lo general, las **secuencias de inserción** son pequeñas porciones de DNA que transportan genes que codifican sólo su propia transposición; la expresión de estos genes no está reconocida y la inserción a menudo es fenotípicamente "silente".⁴³ Los **transposones** son más grandes y codifican al menos una función que es reconocible como una alteración fenotípica, como la adquisición de resistencia antimicrobiana. Los transposones descritos en las bacterias gramnegativas entéricas contienen genes para la resistencia a los antimicrobianos (p. ej., aminoglicósidos, tetraciclina, cloranfenicol) y genes estructurales para la toxina termoestable producida por algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénica.⁴ Entre las bacterias grampositivas de importancia clínica, se describieron transposones que portan genes de resistencia para el cloranfenicol, la tetraciclina y la eritromicina en *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*.^{2,37,38}

Requerimientos para el metabolismo y el crecimiento bacterianos CARBONO

Las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos sobre la base de sus requerimientos de carbono. Las bacterias **litótrofas** o **autótrofas** y las bacterias **organótrofas** o **heterótrofas**. Las bacterias litotróficas pueden usar dióxido de carbono

como la única fuente de carbono y sintetizar a partir de él las cadenas carbonadas de todos sus metabolitos orgánicos. Para crecer sólo requieren agua, sales inorgánicas y CO_2 , y su energía proviene de la luz (bacterias fotolitótrofas) o de la oxidación de una o más sustancias inorgánicas (bacterias quimiolitótrofas). Las bacterias organótrofas son incapaces de usar CO_2 como única fuente de carbono, pero lo requieren en una forma orgánica, como la glucosa. Para estas bacterias heterotróficas, una porción del compuesto orgánico que sirve como fuente de energía también se usa para la síntesis de compuestos orgánicos requeridos por el organismo. Una amplia variedad de sustancias también pueden ser usadas como fuentes exclusivas o parciales de carbono por diferentes especies bacterianas. Entre las bacterias más versátiles están las especies de *Pseudomonas*, algunas de las cuales pueden usar más de 100 compuestos orgánicos diferentes como única fuente de carbono y energía. Las relaciones entre las fuentes de energía, las fuentes de carbono y los donadores de electrones para la generación de energía se resumen en el cuadro 5-2.

DIÓXIDO DE CARBONO

Algunas bacterias usan el dióxido de carbono atmosférico como la principal fuente de carbono para las reacciones biosintéticas. La energía para catalizar esta utilización puede provenir de la energía lumínica (bacterias fotolitótrofas) o de la oxidación de moléculas inorgánicas (bacterias quimiolitótrofas). Los microorganismos que requieren una fuente orgánica de carbono también requieren algo de CO_2 para ciertas vías sintéticas de macromoléculas, como la biosíntesis de los ácidos grasos. El dióxido de carbono para estas reacciones suele obtenerse de la degradación de sustratos orgánicos, que sucede al mismo tiempo que las reacciones biosintéticas.

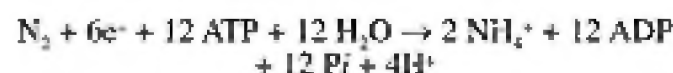
OXÍGENO

El requerimiento de oxígeno de una bacteria particular refleja el mecanismo usado para satisfacer sus necesidades energéticas. Sobre la base de sus requerimientos de oxígeno las bacterias pueden dividirse en cinco grupos. Los microorganismos **anaerobios estrictos** crecen sólo en condiciones de intensidad reductora elevada y para las cuales el oxígeno es tóxico. Los microorganismos **anaerobios aerotolerantes** son bacterias

anaerobias que no se mueren por exposición al oxígeno. Los **anaerobios facultativos** son capaces de crecer bajo ambas condiciones, aerobia y anaerobia. El crecimiento de los **aerobios estrictos** depende por completo del oxígeno. Los **organismos microaerófilos** crecen mejor con concentraciones bajas de oxígeno; las concentraciones altas de oxígeno pueden ser inhibitorias. En aerobios facultativos y estrictos, la asimilación de la glucosa da lugar a la generación final del radical libre superóxido (O_2^-). El superóxido se reduce, por la acción de la enzima superoxidodismutasa, a oxígeno gaseoso (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Posteriormente, el peróxido de hidrógeno tóxico generado en esta reacción se convierte en agua y oxígeno gaseoso por la enzima catalasa, que se encuentra en bacterias facultativas y aerobias, o por varias peroxidusas, que se encuentran en varios anaerobios aerotolerantes.

NITRÓGENO

Los átomos de nitrógeno de biomoléculas importantes (aminoácidos, purinas, pirimidinas) provienen de los iones amonio (NH_4^+). La generación de iones amonio comienza con la reducción del N_2 atmosférico a NH_4^+ (ion amonio o amoníaco, NH_3). Luego el NH_4^+ se asimila en macromoléculas más complejas por la ruta de los compuestos clave **glutamato y glutamina**. Ciertas especies de bacterias (especies *Rhizobium* y *Acetobacter*) y algas azul-verdosas son capaces de "fijar" el N_2 atmosférico en una forma orgánica más fácil de usar. Debido a la firmeza del triple enlace del N_2 , la fijación de nitrógeno requiere el aporte de energía celular en forma de ATP y un potente reductor. El proceso está catalizado mediante un sistema multienzimático complejo denominado complejo nitrogenasa. En la mayoría de los organismos fijadores de nitrógeno, la ferredoxina reducida es la fuente de electrones:



La capacidad de fijar nitrógeno se constata principalmente en las bacterias del suelo ya mencionadas. Sin embargo, algunas especies bacterianas que producen enfermedades humanas, como *K. pneumoniae* y ciertos clostridios del medioambiente (p. ej., *Clostridium pasteurianum*) también fijan nitrógeno atmosférico.

Cuadro 5-2 Fuentes de carbono y energía de las bacterias

TIPO/EJEMPLOS	FUENTE(S) DE ENERGÍA	FUENTE(S) DE CARBONO	DONADORES DE ELECTRONES
Fotolitótrofos Bacterias verdes del azufre Bacterias púrpuras del azufre	Luz	CO_2	Compuestos inorgánicos (H_2S , S)
Fotoorganótrofos Bacterias púrpuras no sulfurosas	Luz	Compuestos orgánicos (y CO_2)	Compuestos orgánicos
Quimiolitótrofos Bacterias del hidrógeno, bacterias del azufre y bacterias desnitrificadoras	Reacciones de oxidación-reducción	CO_2	Compuestos inorgánicos (H_2 , S, H_2S , Fe, NH_3)
Quimiorganótrofos	Reacciones de oxidación-reducción	Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos (glucosa y otros hidratos de carbono)

Los iones amonio también pueden generarse por reducción de nitratos. Esto se cumple por dos mecanismos fisiológicos distintos. La **reducción asimilatoria de nitrato** es un proceso en el cual el nitrato se reduce a nitrito e hidroxilamina, que luego se convierten en amoníaco por asimilación. La **reducción disimilatoria de nitrato** es cuando el nitrato sirve como un aceptor de electrones alternativo al oxígeno (respiración anaerobia); NO_2 o N_2 son los productos más comunes. La asimilación de nitrato está bastante difundida en los microorganismos y requiere las dos reductasas: nitrato y nitrito reductasas, mientras que la reducción disimilatoria de nitrato se observa sólo en las bacterias anaerobias y anaerobias facultativas que crecen con bajas tensiones de oxígeno (en un caldo, por ejemplo). El amoníaco generado por estos mecanismos se incorpora en moléculas orgánicas por la acción de las enzi-

mas **glutamato deshidrogenasa**, **glutamina sintetasa** y **ácido glutámico sintasa** (fig. 5-14). Los productos finales de estas reacciones son la glutamina y el ácido glutámico, que luego se convierten en elementos estructurales de otras reacciones biosintéticas para la síntesis de varios aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos nitrogenados necesarios (fig. 5-14).

FACTORES DE CRECIMIENTO

Estas sustancias promueven el crecimiento de los microorganismos y se hallan *in vivo* en diversos líquidos corporales y tejidos e *in vitro* en extractos de levadura y productos de la sangre. Estos factores incluyen las vitaminas del complejo B, los minerales, ciertos aminoácidos, las purinas y las pirimidinas.

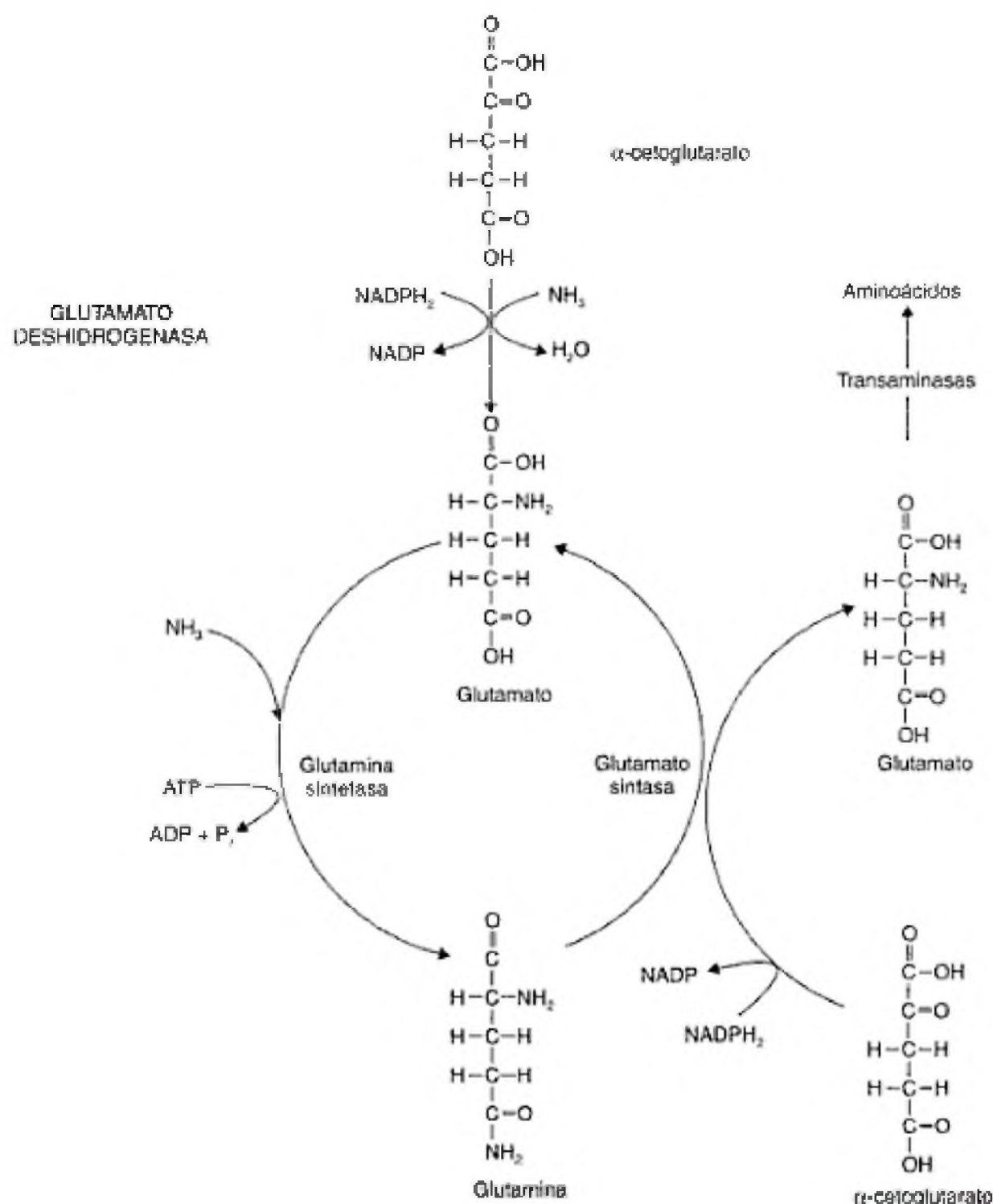


Figura 5-14 Metabolismo y asimilación de nitrógeno mediante las enzimas glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y glutamato sintasa. Este sistema enzimático conduce a la formación de aminoácidos y otros componentes.

Las vitaminas del complejo B cumplen un papel catalítico dentro de la célula, actuando ya sea como componentes de coenzimas o como grupos prostéticos de enzimas. Los organismos que no requieren una fuente exógena de un factor de crecimiento dado porque son capaces de sintetizar los propios se llaman **prototróficos**. Los organismos **autotróficos** requieren la adición del factor de crecimiento al medio de cultivo antes de que ocurra el crecimiento. Todas las bacterias requieren también pequeñas cantidades de un cierto número de iones inorgánicos. Además del nitrógeno, el azufre y el fósforo, que están presentes como constituyentes de compuestos biológicos importantes, el potasio, el magnesio y el calcio a menudo están asociados funcionalmente con ciertos polímeros aniónicos. Los cationes divalentes del magnesio estabilizan a los ribosomas, las membranas celulares, la pared celular y los ácidos nucleicos, y también son necesarios para la actividad de muchas enzimas. El potasio también es necesario para la actividad de un cierto número de enzimas, y en las bacterias grampositivas su concentración en la célula está influida por el contenido de ácido teicoico de la pared celular. La mayoría de los microorganismos también necesitan cinc, hierro, manganeso, cobre y cobalto. Ciertos requerimientos físicos para el crecimiento son la temperatura, el pH y el potencial de oxidación-reducción óptimos para el desarrollo.

Cinética del crecimiento celular bacteriano

Durante el desarrollo en un medio de cultivo líquido, las bacterias muestran una curva de crecimiento uniforme, como se expresa en el logaritmo del número de bacterias por unidad de tiempo. En la figura 5-15 se muestra una curva de crecimiento bacteriano típica. La fase de latencia es un período de ajuste fisiológico y "puesta a punto", cuando la célula sintetiza enzimas nuevas, cofactores e intermediarios metabólicos esenciales, y los depósitos intracelulares de nutrientes están estabilizados. Durante la fase de crecimiento progresivo, el crecimiento celular comienza mientras las velocidades de las reacciones enzimáticas se aproximan a las velocidades del estado estacio-

nario. Durante la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, el crecimiento y la división celulares ocurren a sus velocidades máximas. Esta velocidad está influida por la temperatura, el tipo de fuente de carbono que se ha usado, las concentraciones limitantes de varios nutrientes esenciales, los tipos de nutrientes disponibles y la tensión de oxígeno o el potencial de oxidorreducción. Durante la fase de crecimiento menguante, el crecimiento por último cesa a causa de la carencia de nutrientes esenciales del medio o de la acumulación de sustancias que son inhibitorias o tóxicas. Durante la fase estacionaria, el número de células viables ha alcanzado una meseta y el número de microorganismos nuevos producidos es igual al número de células que mueren por causa de falta de nutrientes. Durante la fase de muerte celular, las células comienzan a lisarse y a morir.

Es más común que los laboratorios clínicos se ocupen del desarrollo bacteriano en medios sólidos como el agar sangre o agar chocolate. En general, los microorganismos son capaces de crecer hasta números elevados en medios sólidos porque los ácidos y otros productos inhibitorios se difunden fuera de las colonias bacterianas durante el crecimiento y el agotamiento de los nutrientes en la vecindad de las colonias se contrarresta por la difusión de nutrientes frescos en las áreas de crecimiento en los medios de agar. Sin embargo, algunos son extremadamente sensibles a los pequeños cambios del pH o de los productos del metabolismo que causan la lisis celular por sí mismos o que activan autolisinas celulares. Casi siempre es suficiente un subcultivo frecuente o periódico a medios de agar frescos para la preservación de la viabilidad del microorganismo en medios de cultivo sólidos.

Metabolismo bacteriano general y generación de energía FERMENTACIÓN

El metabolismo bacteriano es un balance dinámico entre la biosíntesis (reacciones anabólicas) y la degradación (reacciones catabólicas). Las reacciones catabólicas, además de proveer elementos estructurales más pequeños para los procesos biosintéticos posteriores, provee la energía para "conducir" las

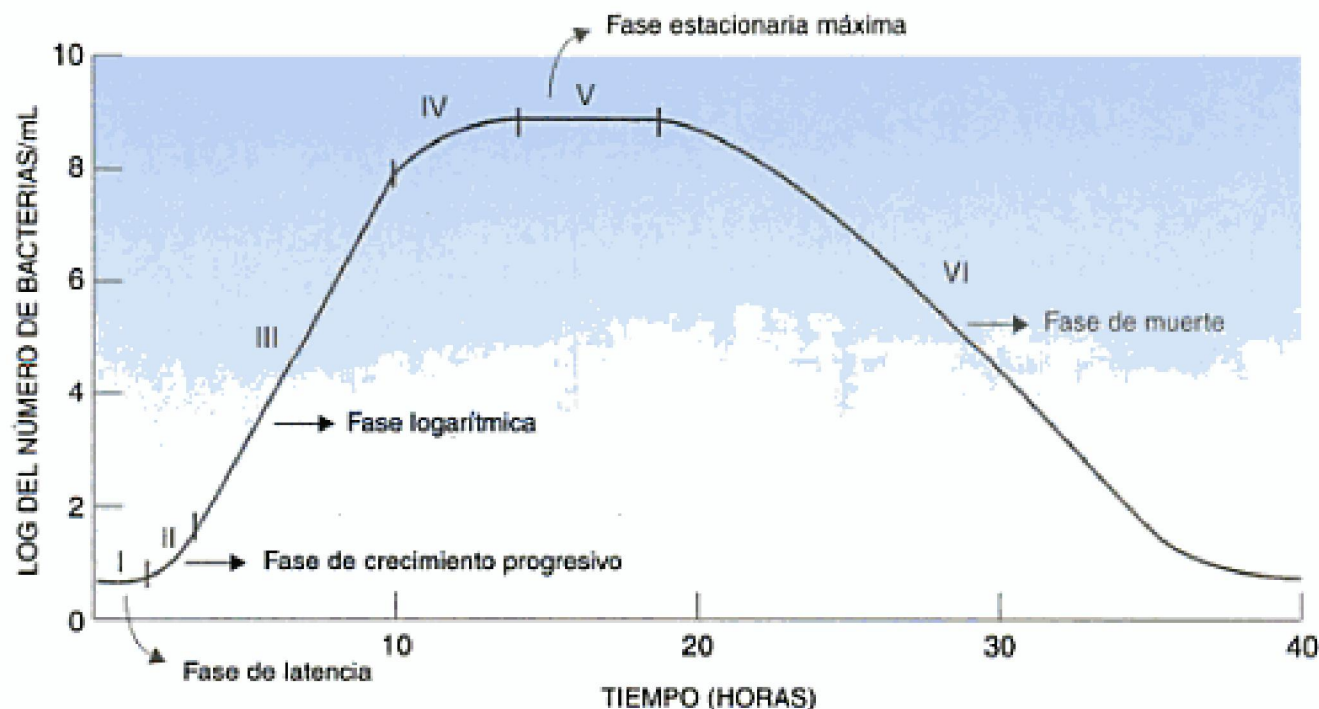


Figura 5-15 Cinética del crecimiento bacteriano.

reacciones biosintéticas. En estos procesos, la energía de la hidrólisis de los enlaces químicos es capturada en los enlaces fosfato de alta energía de **adenosintrifosfato (ATP)**. Estos enlaces abastecen la activación y la continuación de otros eventos bioquímicos. Usando esta energía se sintetizan la pared celular bacteriana, las proteínas, los ácidos nucleicos y otras macromoléculas reguladoras y estructurales. La utilización de los hidratos de carbono por las bacterias y las condiciones en las cuales ocurre son características clave para la caracterización general de las bacterias. Muchas pruebas realizadas en el laboratorio de microbiología clínica implican la detección de los productos finales del metabolismo en líquidos de cultivos agotados, tanto a través de indicadores de pH en el medio como por cromatografía de gas-líquido. La capacidad de un microorganismo dado para producir ácido a partir de diversos hidratos de carbono (p. ej., maltosa, sucrosa, manitol, manosa) refleja

las capacidades enzimáticas de estos organismos para convertir en principio tales hidratos de carbono en glucosa, que es el punto de partida para el catabolismo de los hidratos de carbono, tanto aerobio como anaerobio.

La utilización de la glucosa en condiciones anaerobias se denomina **fermentación**. La fermentación sucede mediante la glucólisis (también llamada **vía de Embden-Meyerhof-Parnas** o **vía de la hexosadifosfato**), cuyo producto final es el ácido pirúvico o el piruvato. La vía glucolítica de la glucosa al piruvato se observa en la figura 5-16. Esta vía requiere dos moléculas de ATP para la fosforilación inicial de la glucosa a glucosa-6-fosfato y la fosforilación posterior de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. Durante la glucólisis, se genera ATP en dos puntos de la vía. Como resultado de la conversión del ácido 1,3-difosfoglicérico a ácido 3-fosfoglicérico, la energía proveniente de la oxidación de un grupo aldehído se con-

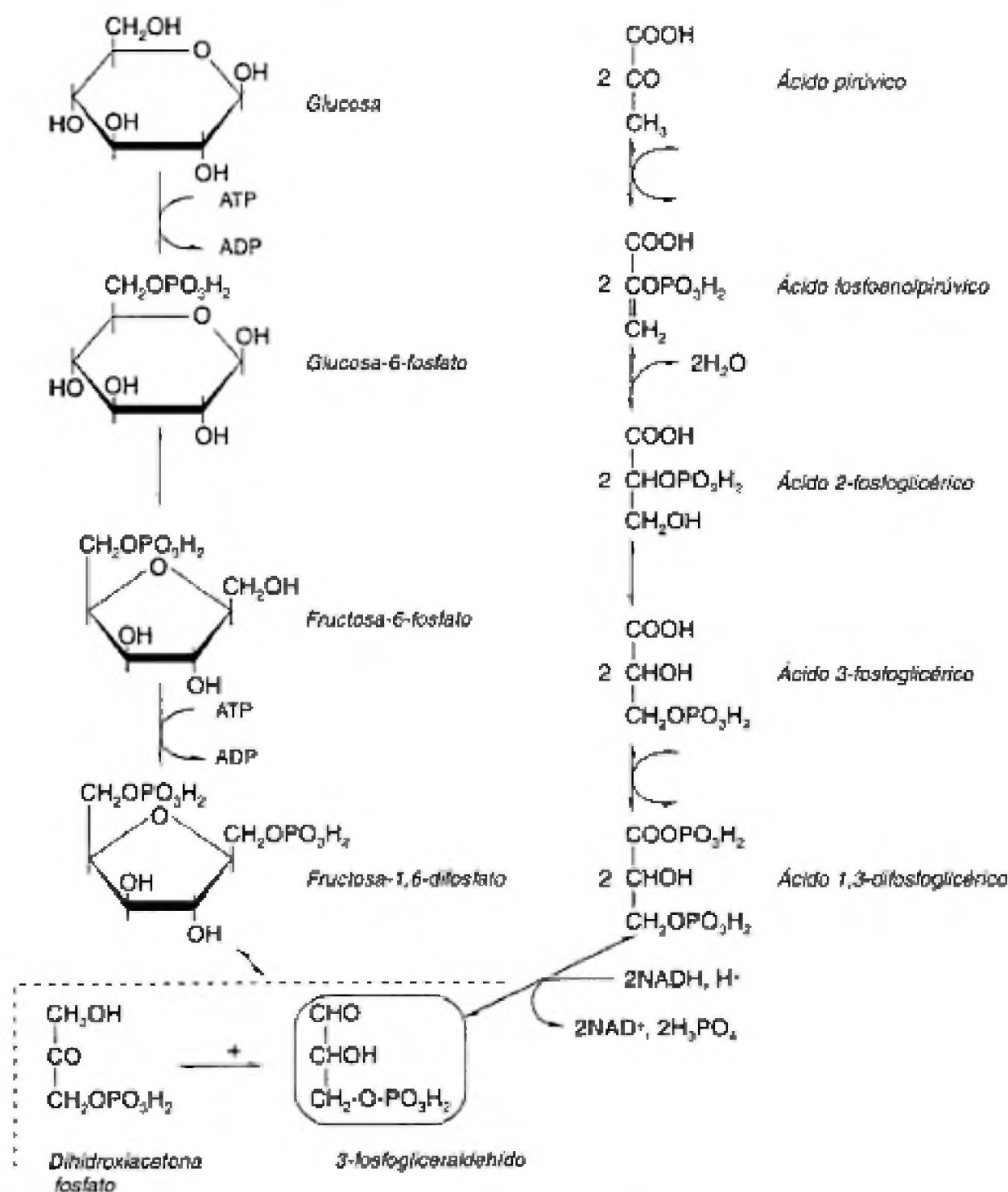


Figura 5-16 Vía glucolítica.

serva como un enlace fosfato de alta energía en el ATP. La conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato deriva en la generación de otra molécula de ATP. Por lo tanto, durante la glucólisis se producen cuatro moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, en un proceso llamado **fosforilación a nivel del sustrato**, que da una ganancia neta de dos moléculas de ATP. Además del ATP, también se produce energía de reducción por la generación de NADH_2 a partir del cofactor NAD (nicotinamida adeninadinucleótido).

La glucólisis no es la única vía para el metabolismo de los hidratos de carbono en la mayoría de los organismos. Muchas bacterias estrictamente aerobias usan la vía de Entner-Doudoroff, que comienza con la glucosa que se convierte en ácido 6-fosfogluconico. Esta molécula se deshidrata para formar 2-ceto-3-desoxi-6-gluconato y luego se hidroliza a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (fig. 5-17). Después, el piruvato entra en el **ciclo del ácido tricarboxílico de Krebs** (véase más adelante) y el gliceraldehído-3-fosfato se convierte en piruvato mediante el ciclo glucolítico. Muchas bacterias usan la vía de las pentosas fosfato, en la cual la glucosa-6-fosfato se oxida y se transforma en ácido 6-fosfogluconico, que también se oxida y se transforma en ribulosa-5-fosfato (5 carbonos), CO_2 y NADH (véase fig. 5-18). Los monosacáridos de cinco carbonos se usan en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Algunas bacterias metabolizan azúcares de cinco carbonos (pentosas), como xilosa y arabinosa. En el metabolismo de los azúcares de cinco átomos de carbono, las enzimas conocidas como transcetolasas y transaldolasas convierten estos hidratos de carbono simples en varios intermediarios de 3, 4 y 5 carbonos, que, a su vez, se usan como elementos estructurales para la biosíntesis de los precursores de los ácidos nucleicos.

UTILIZACIÓN DEL PIRUVATO

El piruvato puede entrar en diversas vías, cuyo resultado son productos finales diferentes. Estos productos a menudo son útiles en la categorización de los microorganismos aislados en el laboratorio de microbiología clínica. Las vías metabólicas mostradas en las figuras 5-19 y 5-20 son:

Vía 1-Fermentación homoláctica (homofermentativa). En esta vía, la más simple de las fermentaciones, el producto primario de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico. Algunos organismos que se consideran fermentadores homolácticos también producen pequeñas cantidades de acetato, etanol y formiato. Las cantidades relativas de los últimos productos dependen del pH inicial y de la capacidad buffer del medio. Por lo general, no se forma gas. La fermentación homoláctica de la glucosa es característica de estreptococos, enterococos, pediococos y lactobacilos.

Vía 2-Fermentación heteroláctica. El piruvato se descarboxila para producir acetaldehído y CO_2 , y el acetaldehído es reducido por NADH_2 y alcoholdehidrogenasa para formar etanol. Este tipo de vía se observa en especies *Leuconostoc*, en algunos lactobacilos y en las levaduras.

Vía 3-Fermentación ácida mixta. En esta vía metabólica, el piruvato se metaboliza a diversos productos (ácido acético, etanol, ácido succínico, ácido fórmico). Al principio, el piruvato se escinde en presencia de la coenzima A (CoA) para formar ácido fórmico y acetil-CoA. Algunas de las acetil-CoA se reducen a acetaldehído y luego a etanol. Los grupos acetilos de algunas acetil-CoA se transfieren a fosfatos y generan acetilfosfatos, que luego convierten sus enlaces de elevada energía en ADP y producen ATP y ácido acético.

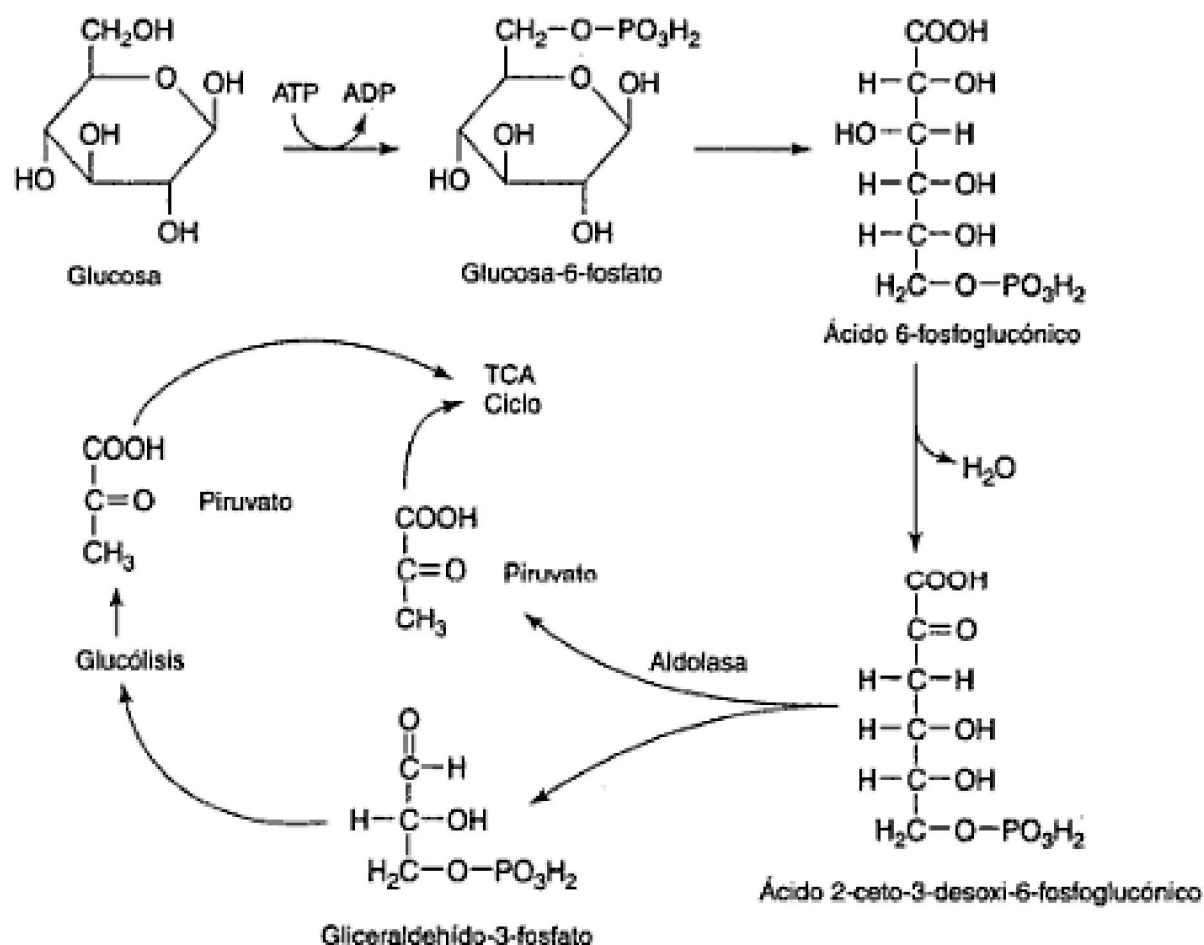


Figura 5-17 La vía de Entner-Doudoroff.

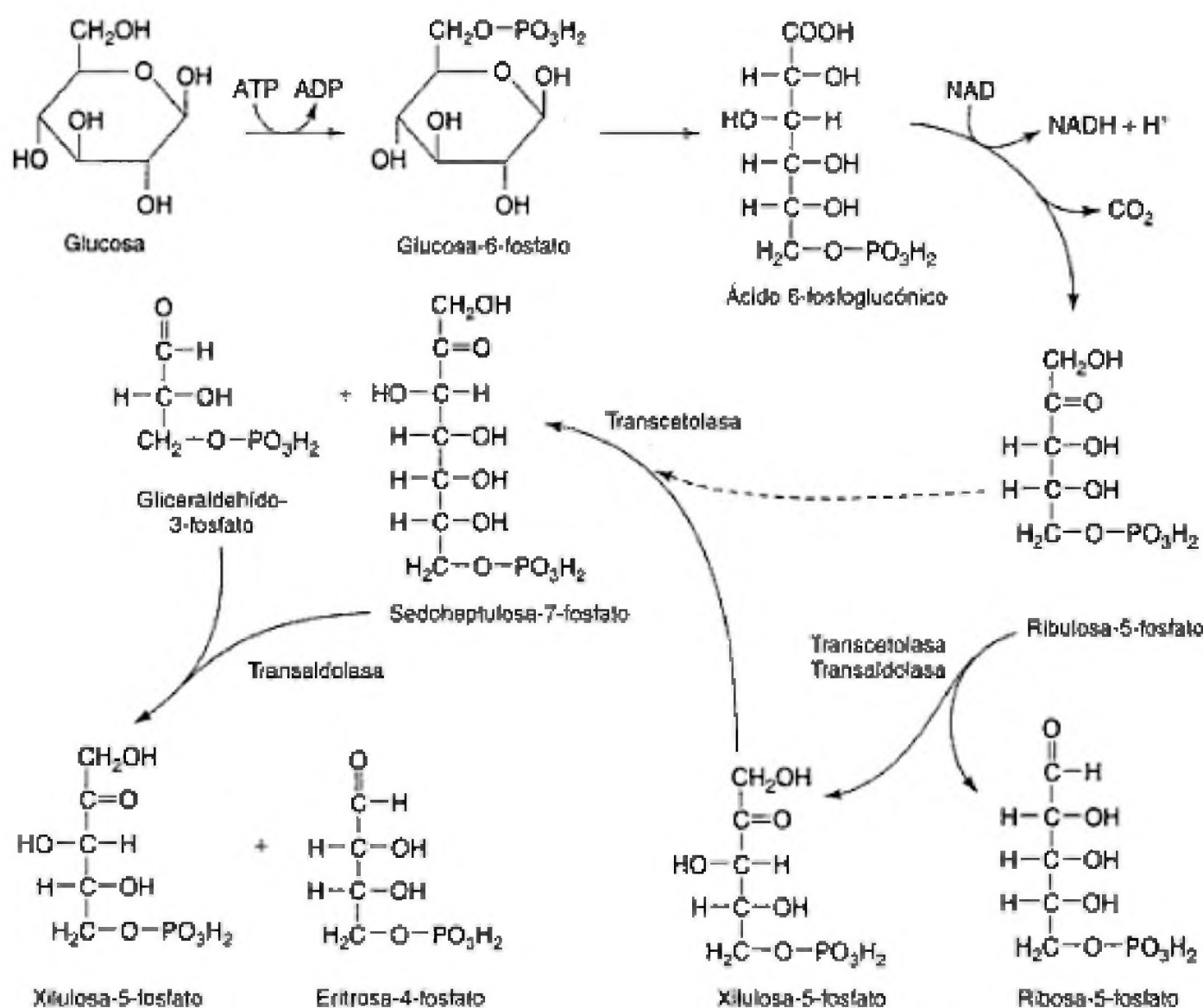


Figura 5-18 La vía de las pentosas fosfato.

Algunas bacterias pueden oxidar formiato directamente y producir gas hidrógeno y CO₂. La naturaleza y la cantidad de estos productos ácidos dependen del organismo.

Vía 4-Fermentación del butanediol. Las bacterias que usan esta vía tienen una enzima que condensa dos moléculas de piruvato (cada una con tres carbonos) en CO₂ y un intermediario de cinco carbonos llamado α-acetoacetato. Luego, el α-acetoacetato se descarboxila enzimáticamente y forma acetofina (acetilmetilcarbinol). En presencia de iones hidrógeno, la acetofina se reduce a 2,3-butanediol. Esta reacción de reducción es lentamente reversible en el aire en condiciones alcalinas; la acetofina que se sintetiza puede detectarse por la adición de α-naftol. Esto es la base de la **prueba de Voges-Proskauer (VP)**, que usa α-naftol en presencia de álcali para detectar acetofina. Esta vía se observa en el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia* de la familia Enterobacteriaceae. La conversión de algo del piruvato en 2,3-butanediol reduce la cantidad de ácido respecto de la vía ácido mixta descrita antes y es responsable de la reacción **del rojo de metilo (MR)** usado para separar *E. coli* y microorganismos relacionados (MR +/VP-) del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia* (MR -/VP+).

Vía 5-Fermentación del butanol. Esta vía de fermentación se observa entre los miembros del género *Clostridium*. Estos

microorganismos tienen un enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA formadas a partir de piruvato para formar acetoacetyl-CoA. Esta molécula se reduce en forma escalonada a butiril-CoA, que puede ser luego hidrolizada a ácido butírico y ATP. De modo alternativo, el acetoacetato libre se libera y descarboxila para producir CO₂ y acetona, que se puede reducir a alcohol isopropílico. En los laboratorios de microbiología clínica que realizan trabajos de referencia con clostridios, se detectan productos de fermentación volátiles y no volátiles mediante análisis por cromatografía de gas-líquido de preparados de cultivos en caldo. La detección de estos productos finales metabólicos es útil para la identificación de género y especie de estas bacterias anaerobias.

Vía 6-Fermentación del ácido propiónico. Este es un tipo de reacción cíclica en la cual el oxalacetato se forma de dióxido de carbono, piruvato y ATP usando una coenzima que contiene biotina. El oxalacetato se reduce a malato, se convierte en fumarato y luego se reduce a ácido succínico (succinato). La descarboxilación del succinato deriva en la formación de ácido propiónico (propionato). Esta vía se observa en bacilos gramnegativos anaerobios del género *Bacteroides* y en las especies *Propionibacterium*, que son bacilos no formadores de esporas, anaerobios y grampositivos.

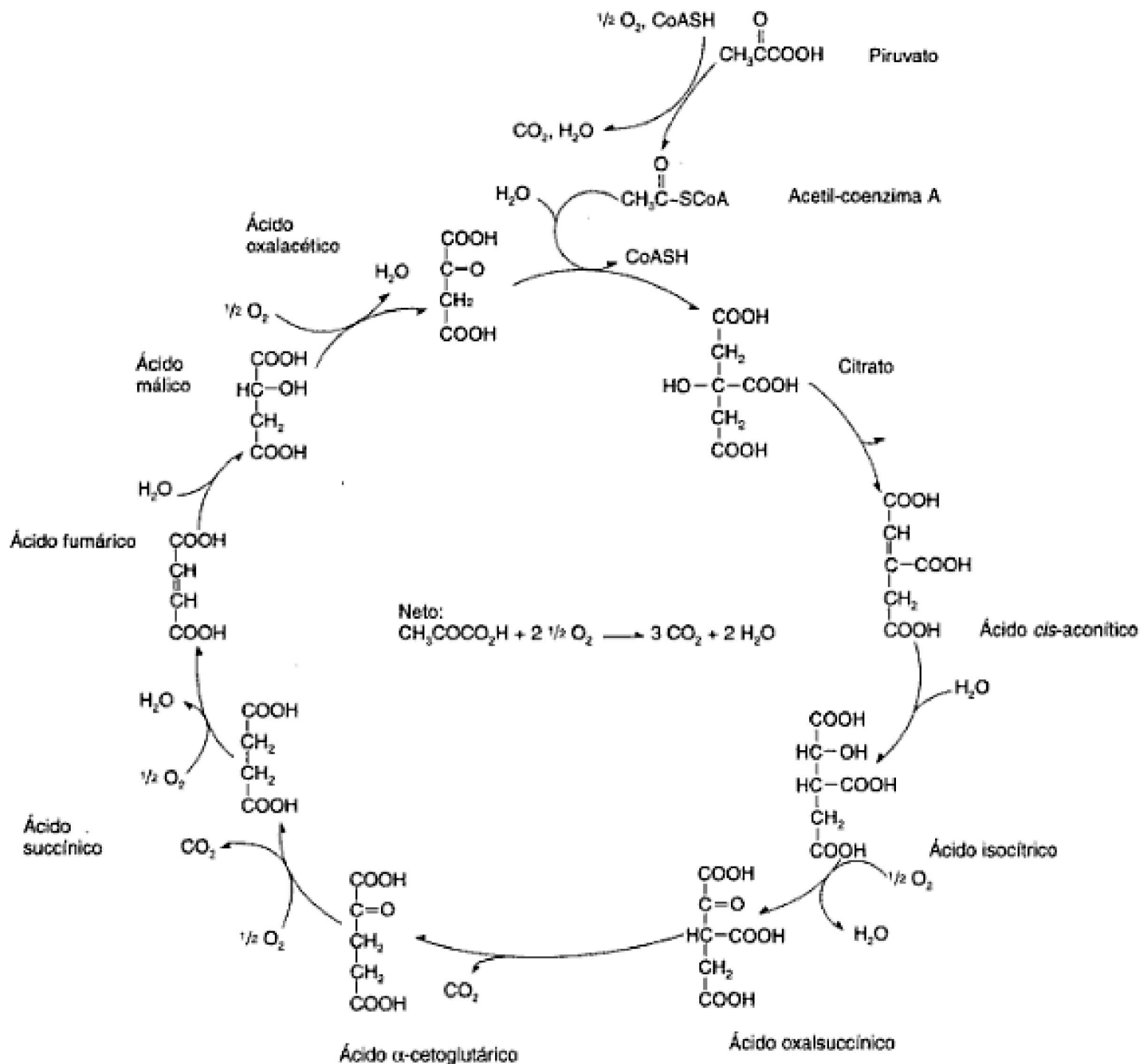


Figura 5-20 Ciclo del ácido tricarboxílico de Krebs.

brias, ácidos lipoteicoicos, cápsulas y proteínas de la membrana externa) son, desde el punto de vista operacional, los mismos que los usados por los microorganismos patógenos. Los microorganismos de la flora normal se establecieron en el huésped y sobre él en las primeras etapas de la vida y persisten durante toda la vida del huésped. Una infección con bacterias exógenas puede ser abortada por la presencia de microorganismos de la flora normal que ya desde antes ocupan el nicho ecológico del patógeno potencial. Si esto sucede, la infección sólo puede evidenciarse por la demostración de un anticuerpo que responde con la eliminación del microorganismo exógeno. En algunos casos, puede resultar un estado de portador asintomático o puede desarrollar enfermedad evidente.

La capacidad de un microorganismo para causar enfermedad involucra tanto factores del huésped como microbianos y existe un gran interés en la variedad de **respuestas adaptativas** de

las bacterias que expresan las características involucradas en la patogenia de la enfermedad. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo ubicuo del suelo y el agua que, debido a su versatilidad genética, se adapta muy bien a los ambientes humanos, como los hospitales, para crear su propio nicho particular. A causa de los años de coexistencia con los seres humanos, *P. aeruginosa* ha surgido como un patógeno oportunista hospitalario que expresa vastos factores de virulencia determinados genéticamente, incluidas varias toxinas, hemolisinas, lipasas, elastasas y proteasas, polisacáridos capsulares ricos en alginato mucoso y resistencia antimicrobiana mediada por transposones y plásmidos.^{21,85,103,136,148} Estas respuestas adaptativas determinadas genéticamente han provisto a *P. aeruginosa* de la versatilidad de sobrevivir y, en definitiva, de desarrollarse en ambientes potencialmente hostiles. El progreso médico ha hecho posible apreciar la respuesta adaptativa

de microorganismos que son parte de la flora humana normal. Cuando los mecanismos de defensa del huésped se anulan por causas subyacentes no infecciosas o diversas intervenciones (p. ej., cáncer, diabetes, tratamientos inmunosupresores), los microorganismos endógenos pueden causar patología y enfermedad debido a la expresión fenotípica de las características que reflejan una respuesta adaptativa nueva del organismo a su huésped.

En los últimos años, la investigación en microbiología médica se ha interesado en los **mecanismos sensoriales bacterianos**. Las bacterias han desarrollado métodos sofisticados para percibir el medio en el que se hallan y regular la expresión de los genes involucrados en la virulencia. La **transducción de la señal de dos componentes** se refiere a pares de proteínas reguladoras que funcionan de modo secuencial en detectar alteraciones en el ambiente exterior y en efectuar respuestas adaptativas en el organismo. A nivel molecular, esto sucede por transferencia de grupos fosfato desde las proteínas sensoras a las proteínas efectoras; el estado de fosforilación de las proteínas efectoras regula la fuerza y la duración de la respuesta por unión a los promotores en el ácido nucleico que permite la expresión (la transcripción y la traducción subsiguiente) de los genes bacterianos que codifican los factores de virulencia. Se describieron sistemas sensoriales de transducción de señal de dos componentes en las bacterias gramnegativas entéricas, *B. fragilis*, *B. pertussis*, *M. tuberculosis*, especies de *Vibrio* y *C. perfringens*, entre otras.^{39,135,149} Algunos microorganismos expresan ciertos genes de virulencia en respuesta a niveles umbrales de autoinductores. Estos autoinductores son lactonas de *N*-acil-homoserina o *N*-butirilhomoserina que se producen continuamente.^{51,139} Cuando la población bacteriana alcanza cierto umbral, está presente una cantidad suficiente de autoinductor para activar los factores de transcripción dentro de las células que coordinan la expresión de genes de virulencia. Este mecanismo de señalización complejo, llamado "**detección de quórum**" (*quorum sensing*) ha sido demostrado en bacterias del medioambiente (p. ej., *Vibrio fischeri*, *Agrobacterium tumefaciens*) y en patógenos humanos (*P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*).^{54,106,143} Los activadores de la transcripción que responden a la detección de quórum en estos grupos bacterianos diversos muestran homología significativa en la secuencia de aminoácidos, lo que sugiere que los mecanismos sensoriales evolucionaron y se diseminaron ampliamente entre los microorganismos que ocupan varios nichos ecológicos.

Requerimientos para la patogenicidad

El primer paso en el establecimiento de un proceso infeccioso reside en la capacidad de un microorganismo para entrar en el huésped e iniciar la infección. El contacto inicial depende de su capacidad para adherirse a las superficies de las mucosas del huésped y sobrevivir en ellas. La adhesión sucede mediante la interacción de varias adhesinas bacterianas con receptores de la superficie celular (véase más adelante). Algunos microorganismos se adherirán a las células epiteliales sin invadir los tejidos más profundos. En tales casos, las toxinas o enzimas elaboradas por los microorganismos por lo general son responsables de la patología, y los efectos de las toxinas pueden ser locales o sistémicos. Ciertos microorganismos se adhieren a las células epiteliales de la mucosa y luego penetran esa barrera. Su multiplicación posterior en los tejidos subepiteliales deriva en la destrucción del tejido por parte de factores bacterianos (p. ej., proteasas, collagenasas, hialuronidasas) y de la respuesta inmune (citólisis mediada por complemento, reacciones inmu-

nes mediadas por células). Microorganismos más invasivos pueden adherirse, penetrar las superficies celulares de las mucosas, multiplicarse y extenderse a tejidos más profundos; por último ganan el acceso al torrente sanguíneo y causan una infección diseminada. Microorganismos como micobacterias o brucelas, se adhieren, invaden, se multiplican y posteriormente se adaptan a continuar su existencia dentro del huésped, a menudo tomando ubicación dentro de las células de sistema reticuloendotelial.⁷⁶

Muchos microorganismos son altamente específicos de los tipos de tejidos que pueden infectar. Por ejemplo, *N. meningitidis* puede ser un habitante normal de la garganta y está bien caracterizado el estado de portador asintomático. En circunstancias apropiadas, invaden las meninges y el torrente sanguíneo. *S. pneumoniae* también puede habitar la garganta y la nasofaringe, incluso las variedades virulentas invaden de preferencia el tracto respiratorio más bajo y el torrente sanguíneo y causan neumonía o sepsis neumocócica. La especificidad por algún tejido puede indicar la presencia de receptores mucosos para los antígenos de superficie bacterianos o de nutrientes que sirven de quimiotoxinas para los microorganismos (p. ej., ciertos aminoácidos, iones o hidratos de carbono). Un ejemplo clásico de esta dependencia nutricional se observa en *Brucella abortus*, causante de una infección contagiosa que produce abortos en el ganado. Este microorganismo tiene un requerimiento específico para su crecimiento del azúcar alcohol eritritol, que está presente en concentraciones elevadas en el útero bovino y en el tejido de la placenta. De ahí que puede "alojarse" en el tracto genital bovino a causa de su predilección nutricional.

Factores de virulencia de los microorganismos

Los factores de virulencia bacterianos son componentes estructurales o productos producidos por bacterias que le permiten al microorganismo perjudicar al huésped de alguna manera. Algunos están asociados con la célula, mientras que otros pueden ser extracelulares. Además, algunos de los factores involucrados en la producción de enfermedad son parte de la composición anatómica o fisiológica de la célula y su función como factor de virulencia es inherente al ciclo de vida del organismo.

ADHESINAS

Para infectar a un huésped, los microorganismos primero deben adherirse a la superficie de la mucosa. La adherencia bacteriana es un proceso específico en el que intervienen las estructuras de la superficie celular bacteriana conocidas como adhesinas y los receptores complementarios de la superficie de las células sensibles. Las adhesinas bacterianas pueden incluir las fimbrias, los componentes de la cápsula bacteriana, los ácidos lipoteicoicos que se proyectan hacia afuera del peptidoglucano de la pared celular de las bacterias grampositivas, las proteínas de la membrana externa u otros antígenos de la superficie celular. Ejemplos específicos de adhesinas bien caracterizadas en microorganismos patógenos se han tratado con anterioridad e incluyen la adherencia de las fimbrias de *N. gonorrhoeae*, sensible a la manosa (tipo 1) y las fimbrias resistentes a la manosa (tipo 2) de *E. coli* uropatógena y enteropatógena, y los ácidos teicoicos de estreptococos β -hemolíticos del grupo A.^{64,70,107} La proteína de la superficie celular humana fibronectina es un receptor del huésped para algunos patógenos bacterianos.

AGRESINAS

Para sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped, muchos microorganismos producen diversas sustancias que les permiten evitar o evadir los mecanismos de defensa del huésped. Estas sustancias, llamadas agresinas, incluyen cápsulas y sustancias mucilaginosas extracelulares, hidratos de carbono y proteínas de superficie, enzimas, toxinas y otras moléculas pequeñas. Las estructuras capsulares de algunas bacterias les permiten a los microorganismos evitar la fagocitosis por impedir la interacción entre la superficie celular bacteriana y las células fagocíticas o por ocultar los componentes de superficie celular bacteriana que de otro modo podrían interactuar con células fagocíticas o complemento y conducir a su ingestión.^{34,97,134,135} Los anticuerpos específicos dirigidos contra el material capsular conducen a la opsonización de los microorganismos. Después de la opsonización, las bacterias encapsuladas son ingeridas rápida y fácilmente y destruidas por las células fagocíticas. Algunos microorganismos producen cápsulas que son similares en estructura a los tejidos del huésped y, por lo tanto, no son reconocidas como extrañas por la vigilancia inmunitaria. De esta forma, tales microorganismos pueden evadir las defensas del huésped. Por ejemplo, las cápsulas de *E. coli* K1 y de los meningococos del grupo B están compuestas por ácido *N*-acetilneuramínico, con uniones α -2,8 parcialmente *O*-acetilado, que es similar al ácido neuramínico encontrado en el tejido del sistema nervioso central.⁹¹ Los microorganismos que tienen cápsulas que se comportan como agresinas son *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* tipo b, *K. pneumoniae*, estreptococos β -hemolíticos de los grupos A y B, y *B. anthracis*.^{34,65,90,91,97,141,142,147,154,155}

Algunas bacterias tienen proteínas de superficie que cumplen funciones en la adherencia y en la virulencia. Por ejemplo, la proteína M de los estreptococos del grupo A desempeña muchas funciones en la patogenia de la infección con estos microorganismos, como adherencia, resistencia a la fagocitosis, invasión intracelular, deterioro de la función del complemento y efectos líticos en los leucocitos polimorfonucleares.^{9,36,42,43} La proteína A, una proteína de la pared celular de *S. aureus*, se une a las moléculas de inmunoglobulina (IgG) por su región Fc. Como la fagocitosis mediada (la opsonización) es dependiente del receptor Fc, la proteína A puede interferir en este proceso. La presencia de proteína A también puede inhibir la activación del complemento cerca de la pared celular estafilocócica por encubrir las mitades de peptidoglucano que se sabe que son activadoras del complemento. Algunas bacterias producen proteasas que pueden hidrolizar e inactivar inmunoglobulinas secretorias (IgA).¹⁰⁹ Esta inmunoglobulina actúa en forma local para impedir la adherencia bacteriana; por lo tanto, la hidrólisis de la IgA por la proteasa bacteriana fomenta la colonización de la mucosa (véase cap. 3).

Algunas agresinas actúan después de que ha ocurrido la fagocitosis por interferencia en la fusión fagosoma/lisosoma y en la actividad del sistema de la mieloperoxidasa. Las micobacterias y las brucelas se adaptan a una existencia intracelular dentro de las células huésped mediante la elaboración de sustancias que impiden la destrucción de los microorganismos. En las micobacterias, esto se debe a la presencia de micósidos y sulfolípidos asociados con la pared celular que se incorporan en la cara interior del fagosoma e impiden la fusión fagosoma/lisosoma.^{7,36,50,57,58} *Listeria monocytogenes* expresa una proteína de superficie llamada **internalina** que se une a los receptores glucoproteína en las células epiteliales y le permite al microorganismo internalizarse en una vacuola unida a la membrana.^{52,79,80}

Luego, el microorganismo produce una hemolisina llamada **listerialisina O**, que se intercala en la membrana de la vacuola y causa la formación de poros.^{81,108} Más tarde, *L. monocytogenes* entra en el citoplasma de la célula, donde continúa creciendo, de modo que escapa del ambiente tóxico con el fagosoma. *S. aureus* segrega **catálasis** y **superóxido dismutasa**, que inhiben la destrucción del organismo mediante el sistema de la mieloperoxidasa de las células fagocíticas. Alojada dentro de las células fagocíticas mediante estos mecanismos también contribuye a la virulencia protegiendo a los organismos de la destrucción por anticuerpos específicos y complemento. La existencia intracelular también tiene una influencia importante en la terapia. Las infecciones con microorganismos como especies de *Brucella* y *Francisella tularensis* deben ser tratadas con antibióticos que actúen de modo intracelular (p. ej., tetraciclina, aminoglucósidos) para afectar a estos microorganismos "protegidos".⁴⁴

Muchas bacterias producen enzimas o toxinas o tienen constituyentes celulares con efectos tóxicos o necrosantes en las células del huésped y en otros componentes del sistema inmunitario. La leucocidina y la γ -hemolisina producidas por *S. aureus* causan esfericidad y tumefacción de los polimorfonucleares y de los macrófagos expuestos, seguidas de desgranulación, rotura nuclear y lisis celular.¹¹⁰ El lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas puede retrasar la respuesta inflamatoria aguda, y les permite al microorganismo establecerse dentro del huésped con relativa facilidad. La porción A lipídica de endotoxina, en particular, puede activar el complemento y estimular la liberación de varias citocinas (interleucina[IL]-2, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral α [TNF- α]) que llevan a las manifestaciones clínicas del shock endotóxico, como hipotensión, coagulación intravascular diseminada y muerte. Las bacterias grampositivas tienen polímeros de peptidoglucano en la pared celular y ácidos teicoicos de membrana que pueden causar una liberación de citocinas similar y precipitar síntomas iguales a los del shock séptico. Algunos microorganismos tienen otras propiedades vinculadas con la superficie celular, como el LOS y ciertas proteínas de superficie que les otorgan resistencia a los efectos bactericidas del suero humano normal (p. ej., *N. gonorrhoeae*).^{104,113} Estas propiedades pueden facilitar la diseminación de las bacterias a través de la circulación sanguínea y linfática, y conducir a una infección sistémica o a la siembra de focos infecciosos en lugares distantes del sitio de infección inicial.

Las propiedades invasivas de algunas bacterias se atribuyen a la elaboración de enzimas que actúan de modo extracelular. *S. aureus*, *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo B y *Propionibacterium acnes* producen una enzima llamada **hialuronatasa** (o hialuronidasa) durante la fase de crecimiento exponencial. Esta enzima promueve la diseminación del microorganismo a través del tejido conectivo por despolimerización del ácido hialurónico, la sustancia fundamental responsable de la adhesión célula-célula.⁴⁰ Los estreptococos del grupo A y los estafilococos también elaboran enzimas que hidrolizan los coágulos de fibrina (**estreptocinasa** y **estafilocinasa**), que facilitan la diseminación de microorganismos en los tejidos.^{20,112} *C. perfringens* y otros clostridios (*C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novyi* y *C. fallax*) producen citotoxinas, citolisinas, colagenasas, fosfolipasas, hialuronidasas y desoxirribonucleasas que permiten a estos microorganismos colonizar tejidos sin vitalidad, degradar la matriz de colágeno del músculo y del tejido conectivo, y facilitar la propagación de los microorganismos en esos tejidos para causar fascitis y gangrena gaseosa.⁸⁶

El hierro es un nutriente esencial para muchos microorganismos y un requerimiento para la virulencia de algunos patógenos bacterianos. A este respecto, las bacterias patógenas productivas han desarrollado formas de obtenerlo del medioambiente o de los tejidos del huésped, en los cuales el hierro libre se mantiene en bajas concentraciones por estar unido a las proteínas transferrina y lactoferrina. Los microorganismos recogen este hierro mediante la producción de sideróforos, moléculas pequeñas que funcionan como quelantes de hierro de elevada afinidad. Por lo tanto, la producción de sideróforos se considera un factor de virulencia.⁵⁹ Otros organismos han desarrollado proteínas de transporte como transferrina o lactoferrina, de las cuales se extrae y transporta el hierro hacia el interior de las células.¹¹¹ Tanto *N. gonorrhoeae* como *N. meningitidis* tienen receptores de membrana externa para unir transferrina humana, lactoferrina, y hemoglobina y proteínas de unión periplasmáticas para extraer hierro de los transportadores a los que está unido y transportarlo al interior celular.^{4,113,132,134} Además, la producción de muchos productos microbianos extracelulares, incluidas las toxinas, se regula parcialmente a nivel transcripcional por las concentraciones de hierro en el medio circundante. Por ejemplo, la expresión del gen estructural β -fago para la toxina diftérica en *Corynebacterium diphtheriae* sólo sucede cuando el hierro se convierte en el sustrato limitante del crecimiento (véase más adelante).^{117,118}

Aunque los plásmidos por sí mismos no son factores de virulencia, los genes que codifican muchos de los productos celulares bacterianos responsables de la virulencia suelen residir en ellos. Los **factores R** (plásmidos que contienen genes que codifican la resistencia a los agentes antimicrobianos) pueden considerarse de virulencia porque la adquisición de resistencia a los agentes antimicrobianos fomenta el crecimiento continuado y la diseminación de las infecciones bacterianas a pesar de las intervenciones terapéuticas. Algunas bacterias también contienen plásmidos que codifican pili sexuales y transferencias cromosómicas. Estos dos factores le permiten a un microorganismo transferir material genético (la introducción de un plásmido, de un cromosoma o de ambos) a otros organismos. Los plásmidos también pueden portar genes que codifican un antígeno de colonización, resistencia al suero, quelación y transporte de hierro, producción de toxinas y hemolisinas, y mecanismos de supervivencia intracelular indefinida. Los plásmidos que contienen genes de resistencia han sido descritos en muchos gramnegativos (todo el género de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Bacteroides*) y grampositivos (p. ej., *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Corynebacterium*).

EXOTOXINAS Y ENDOTOXINAS

Las toxinas de origen bacteriano se dividen en dos grupos: exotoxinas y endotoxinas. Las **exotoxinas bacterianas** son las toxinas biológicas más potentes conocidas y se producen en su mayor parte por bacterias grampositivas, aunque algunas bacterias gramnegativas también las elaboran. Las exotoxinas son sustancias de naturaleza proteica y son termolábiles. Debido a que son proteínas, muchas pueden ser inactivadas o destruidas por enzimas proteolíticas. Por otro lado, algunas exotoxinas se activan sólo después de una hidrólisis parcial ("corte") por enzimas proteolíticas (véase más adelante). La actividad tóxica de muchas exotoxinas puede ser destruida por tratamiento con formaldehído (desarrollo de toxoides) y neutralizada por anticuerpos específicos. El aprovechamiento de estas propiedades

condujo al desarrollo de los toxoides del tétanos y la difteria que se usan para la inmunización activa contra estas enfermedades.

Las exotoxinas bacterianas se dividen en dos grupos. El primer grupo consiste en **toxinas citolíticas**, que actúan en las membranas celulares para causar la formación de poros y la lisis posterior de la célula. Ejemplos de estas toxinas son las siete enterotoxinas de *S. aureus* y las estreptolisinas S y O producidas por estreptococos del grupo A. El segundo grupo consiste en dos subunidades: A-B o **toxinas bipartitas**. Estas toxinas contienen una subunidad B (o de unión) que se adhiere a un receptor específico de la célula huésped, y una subunidad A (o activa), que pasa hacia el interior de la célula e interactúa con la diana. Estas toxinas son la toxina del cólera de *V. cholerae*, la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*, la toxina pertussis producida por *B. pertussis* y la toxina diftérica producida por *C. diphtheriae* lisogenizado. Ciertas enfermedades, como el tétanos, el botulismo, la difteria y el cólera, se deben casi por completo a los efectos de las toxinas en sus órganos y tejidos diana.

El **tétanos** es causado por los efectos sistémicos de la neurotoxina del tétanos, la toxina producida por *Clostridium tetani*. Suele ocurrir como resultado de la infección de una herida por *C. tetani* o más rara vez, por la inyección de materiales contaminados con células vegetativas o esporas de *C. tetani*.¹⁴ La neurotoxina del tétanos se libera en la lisis celular después del crecimiento bacteriano en condiciones anaerobias (p. ej., en heridas punzantes profundas). La toxina se traduce en principio como un péptido simple de alrededor de 150 kDa. En la liberación de la célula bacteriana, el péptido toxina es escindido por enzimas proteolíticas para formar una cadena liviana (L, 50 kDa) y una cadena pesada (H, 100 kDa) unidas por un puente disulfuro; en condiciones reductoras, los dos péptidos se separan en dos cadenas L y H. El sitio de unión al receptor de la molécula de toxina intacta se halla en la cadena H. La cadena L se interna y se mueve desde los nervios periféricos hacia el sistema nervioso central por transporte axónico retrógrado. Cuando la toxina tetánica alcanza las neuronas en la médula espinal, el cerebro y el cerebelo se fija rápidamente a su receptor, un gangliósido que contiene ácido esteárico, esfingosina, glucosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico). El efecto espasmogénico de la toxina obedece a su acción en los reflejos presinápticos que involucran interneuronas de la médula espinal. La toxina bloquea la inhibición postsináptica normal de las neuronas motoras espinales siguiendo impulsos aferentes por impedimento de liberación de los neurotransmisores inhibitorios (ácido γ -aminobutírico, glicina). Este bloqueo sináptico de las neuronas centrales da por resultado hipertonía muscular e hiperreflexia. La sensibilidad resultante a los impulsos excitatorios, no controlados por mecanismos inhibitorios, produce la parálisis espástica característica del tétanos.¹⁴

El **botulismo** es el resultado de la ingestión de toxinas formadas por *Clostridium botulinum* que se desarrolla en los alimentos; el principal vehículo son las frutas y verduras enlatadas de modo inadecuado (por lo general caseras), los condimentos y los productos de pescado. Es una intoxicación sistémica resultante del desarrollo de *C. botulinum* y la producción de toxina en las heridas, informado durante las décadas de 1980 y 1990 como una complicación de infecciones de heridas en usuarios de drogas parenterales.^{19,29} *C. botulinum* también puede colonizar el tubo digestivo de los recién nacidos y producir toxina en ese sitio (botulismo infantil).^{33,35} La toxina se acumula en las células de *C. botulinum* durante la germinación de la spora y el desarrollo de la célula vegetativa, pero sólo se libera en la lisis celular. Los microorganismos descritos como *C. botuli-*

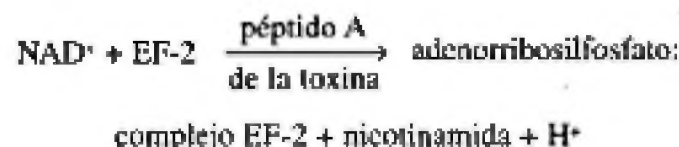
num se congregan en tres grupos que dependen de sus secuencias de genes para 16S rRNA: *C. botulinum* tipos B, E, y F. *C. botulinum* tipos C y D y *C. botulinum* tipos A, F y B. *C. botulinum* tipo G se agrupa de forma independiente de los otros y también se llama *C. argentinense*.^{31,32} Estos grupos corresponden a siete tipos serológicos de toxinas de *C. botulinum* (tipos A, B, C-1, D, E, F y G [asociado con *C. argentinense*]), y cada uno produce una toxina específica de tipo desde el punto de vista inmunológico.¹¹⁷ Las toxinas de los tipos A, B, E y F son las que afectan a los seres humanos.

Las toxinas botulínicas originales son proteínas lábiles y forman complejos con proteínas no toxinas para estabilizar las moléculas.¹¹⁴ La toxina botulínica se produce como una proteína progenitora con un peso molecular de casi 150 kDa. Estas toxinas se producen como moléculas inertes que se activan después de la proteólisis, pero la escisión proteolítica es interna a las moléculas peptídicas y las toxinas no cambian su peso molecular después de la activación. Por lo tanto, la toxina activa se compone de una cadena liviana (L) de 50 kDa y una cadena pesada (H) de 100 kDa conectadas por un puente disulfuro. Después de la absorción en el tubo digestivo, la toxina alcanza las neuronas sensibles (en las uniones neuromusculares y en las sinapsis autonómicas periféricas) por el torrente sanguíneo. Allí se une a las terminales presinápticas, donde bloquea la liberación de acetilcolina de las terminaciones del nervio motor colinérgico. El botulismo se caracteriza por compromiso de los pares craneales, debilitamiento descendente y bilateral, y parálisis de los músculos esqueléticos, y se acompaña de fatiga, disnea, náuseas, visión borrosa, alteración del habla, dilatación de las pupilas, retención urinaria, parálisis flácida general de los músculos esqueléticos y parálisis respiratoria.²²

La difteria es otro ejemplo de una enfermedad que se debe a la acción de una toxina. Pero sólo las cepas de *C. diphtheriae* que contienen un bacteriófago lisogénico (β -corinefago) producen la toxina diftérica. Los genes estructurales para la toxina (llamado gen *tox*) constituyen una parte del genoma del bacteriófago. La expresión del gen *tox* está regulada por un represor activado por hierro y la producción de la toxina sucede sólo cuando el hierro se convierte en el sustrato limitante para el crecimiento.^{112,118} En presencia de hierro (Fe^{2+}), el represor forma dímeros activos con Fe^{2+} , que se unen al promotor del gen *tox* e inhiben la expresión del gen *tox*. Cuando Fe^{2+} se convierte en limitante, el dímero Fe^{2+} /represor se disocia y permiten la transcripción y la traducción del gen *tox*.^{49,156}

La molécula de toxina se forma por *C. diphtheriae* en asociación con la membrana celular y se segrega de la célula como un péptido simple que se compone de 535 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 58 kDa. Por una proteólisis suave, el péptido simple se escinde en dos cadenas principales, designadas A y B, conectadas por puentes disulfuro. El péptido A es un péptido de 21 kDa que contiene la actividad enzimática de la molécula que inhibe la síntesis proteica, mientras que el péptido B es un fragmento de 37 kDa que contiene un dominio de unión al receptor C-terminal y un dominio translocador interno. El péptido B es responsable de la unión de la molécula de toxina a su receptor diana. En la unión a la célula diana mediante el péptido B, la toxina entra en la célula por endocitosis mediada por el receptor. El pH bajo dentro del endosoma desencadena la translocación del péptido A (mediante la interacción con el péptido que transloca dominio) hacia el citosol; en ese momento los puentes disulfuro se reducen, se libera el péptido B y el péptido A se vuelve enzimáticamente activo. El péptido A inhibe la síntesis proteica por la

adenorribosilación del factor 2 de elongación, (EF-2) una enzima que se requiere para la translocación del polipeptidil-tRNA desde el sitio del aceptor hasta el sitio del donador en el ribosoma eucariote.⁷⁸ El grupo adenorribosilo se transfiere desde el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) hasta el factor 2 de elongación por la subunidad péptido A de la toxina, con producción de EF-2 inactivo:



El tratamiento de la toxina intacta con formalina produce un toxoide que no se puede separar en las subunidades A y B. Por lo tanto, el toxoide carece de la capacidad de catalizar sus efectos intracelulares tóxicos; sin embargo, retiene su antigenicidad. La inmunidad a la difteria suele estar mediada por la presencia de anticuerpos contra la toxina.

Todos los signos y los síntomas del cólera causado por *V. cholerae* resultan de la pérdida rápida de líquidos desde el intestino. El aumento de secreción electrolítica está provocado por una enterotoxina proteica. La enterotoxina de 84 kDa consiste en una subunidad de unión (subunidad B) compuesta por cinco monómeros idénticos de 11,5 kDa y una subunidad biológicamente activa (subunidad A) de 27 kDa. El modo de acción de la toxina del cólera se describe en el capítulo 8.

Por otro lado, las endotoxinas se producen sólo por bacterias gramnegativas y están compuestas por lipopolisacárido (LPS). El LPS, como ya se describió, es un componente estructural de la membrana externa gramnegativa, que representa los determinantes antigénicos somáticos (O). Las endotoxinas son termoestables, no se destoxifican por tratamiento con formaldehído y se neutralizan sólo en forma parcial por anticuerpos específicos. Comparadas con muchas de las exotoxinas, las endotoxinas son de menor toxicidad. Aunque las endotoxinas pueden escapar hacia los líquidos circundantes (como "burbujas" sobre la superficie de las bacterias gramnegativas), la célula íntegra por lo general retiene la mayor porción de la actividad tóxica. Las actividades tóxicas y biológicas de la endotoxina son amplias. Cantidades del orden de nanogramos de endotoxina causan fiebre en los seres humanos y la liberación de pirógenos endógenos. Grandes dosis provocan hipotensión, recuentos bajos de leucocitos polimorfonucleares y plaquetas por aumento de la migración de estas células hacia las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, hemorragia y, a veces, coagulación intravascular diseminada debido a la activación de los mecanismos de la coagulación. La endotoxina también es mitogénica para los linfocitos B y estimula la liberación de varias citocinas desde los macrófagos.

Superantígenos bacterianos

Otros grupos de toxinas proteicas extracelulares, como las producidas por *S. aureus* o los estreptococos β -hemolíticos del grupo A, son capaces de unirse a péptidos estructurales en los receptores de los linfocitos T huésped y en los antígenos de histocompatibilidad clase II de los macrófagos. Esta unión induce la liberación de citocinas. Varias proteínas extracelulares de *S. aureus*, como la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas A y B, y las toxinas estreptocócicas del grupo A actúan como "superantígenos" e inducen niveles elevados de proliferación de células T, rápida liberación de IL-2 y TNF- α y causan shock.³⁸ Los

superantígenos producidos por varias bacterias se analizarán más adelante en los capítulos dedicados a los géneros bacterianos específicos.

REFERENCIAS

1. Aboonut DR, Leadbetter ER, Godchaux W III, Escher A. Sulphonolipids are molecular determinants of gliding motility. *Nature* 1986;324:367-369.
2. Abraham LJ, Rood JJ. Identification of Tn4451 and Tn4452, chloramphenicol resistance transposons from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 1987;169:1579-1584.
3. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Allicoccus oritis* gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:79-83.
4. Anderson JE, Sparling PP, Cornelissen CN. Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *J Bacteriol* 1994;176:3162-3170.
5. Angert ER, Clements KD, Pace NR. The largest bacterium. *Nature (London)* 1993;362:239-241.
6. Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, et al. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;85-91.
7. Armstrong JA, D'Arcy Hart P. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli: reversal of the usual fusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 1975;142:1-16.
8. Berg CM, Berg DE, Grosman EA. Transposable elements and the genetic engineering of bacteria. In: Berg DE, Howe MM, eds. *Mobile DNA*. Washington, DC: ASM Press, 1989:879-925.
9. Berkower C, Ravins M, Moes AE, Hanski E. Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 1999;31:1463-1475.
10. Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom B, ed. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Washington, DC: ASM Press, 1994:285-306.
11. Beveridge TJ. Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol* 1981;12:229-317.
12. Beveridge TJ. Bacterial S-layers. *Curr Opin Struct Biol* 1994;4:204-212.
13. Biswas GD, Sparling PF. Characterization of *ibpA*, the structural gene for the LF receptor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1995;63:2958-2967.
14. Block TP. Clinical aspects of tetanus. In: Simpson LL, ed. *Botulinum Toxin and Tetanus Toxin*. San Diego: Academic Press, 1989:379-398.
15. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Ann Rev Biochem* 1995;64:29-63.
16. Brodeur BR, Martin D. Antigenic analysis of the saccharide moiety of the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis*. *Springer Semin Immunopathol* 1993;15:205-215.
17. Buchanan RE. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. V. Subgroups and genera of the *Bacteriaceae*. *J Bacteriol* 1918;3:27.
18. Buchanan RE. *General Systematic Bacteriology: History, Nomenclature, Groups of Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1925.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Woundbotulism—California, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:890-892.
20. Chaby R, Caroff M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. In: Wardlaw AC, Parson R, eds. *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Chichester: Wiley, 1988:247-271.
21. Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995;43:300-309.
22. Cherington M. Clinical spectrum of botulism. *Muscle Nerve* 1998;21:701-710.
23. Chester FD. *A Manual of Determinative Bacteriology*. New York: Macmillan, 1901.
24. Cisar JO, Takahashi Y, Rhul RS. Specific inhibitors of a bacterial adhesion: observation from the study of gram-positive bacteria that initiate biofilm formation on the tooth surface. *Adv Dent Res* 1997;11:168-175.
25. Clarke LM, Sierra MF, Daidone BJ, et al. Comparison of the Syva Micro Trak enzyme immunoassay and Gen-Probe PACE 2 with cell culture for diagnosis of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in a high-prevalence female population. *J Clin Microbiol* 1993;26:1735-1737.
26. Clemens DL, Horowitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995;181:257-270.
27. Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993;73:9-12.
28. Colby SM, Russell RRB. Sugar metabolism by mutants streptococci. *J Appl Microbiol Symp Suppl* 1997;83:805-885.
29. Cole ST, Saint Girons I. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol Rev* 1994;14:139-160.
30. Colten D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective agent. *Nat Med* 1998;4:279-284.
31. Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol* 1998;84:5-17.
32. Collins MD, Lawson PA, Willemis A, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:812-826.
33. Costello AH, Cisar JO, Kolenbrander PE, Gabriel O. Neuraminidase-dependent hemagglutination of human erythrocytes by human strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun* 1979;26:563-572.
34. Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wesel MR. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* 1996;64:1495-1501.
35. DeJonge BLM, Chang Y-S, Gage D, Tomasz A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1992;267:11248-11254.
36. Dombek PF, Sedgewick J, Lam H, et al. High frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* 1999;31:859-870.
37. Dodds KL. Worldwide incidence and ecology of infant botulism. In: Haachild AHW, Dodds -KL, eds. *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. New York: Marcel Dekker, 1993:105-117.
38. Dwyer JM. The Specific Immune Response. In: Root RK, Waldvogel F, Corey L, Stamm WE, eds. *Clinical Infectious Diseases: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1999:91-108.
39. Dziejman M, Mekalanos JJ. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. In: *Two Component Signal Transduction*. Washington, DC: ASM Press, 1995:305-317.
40. Farrell AM, Taylor D, Holland KT. Cloning, nucleotide sequence determination, and expression of the *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase gene. *FEMS Microbiol Lett* 1995;130:81-85.
41. Firth N, Ippen-Ihler K, Skurray RA. Structure and function of the F factor and mechanisms of conjugation, *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: Neidhardt FC, ed. *Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM Press, 1996:2377-2401.
42. Fischetti VA. Streptococcal M proteins: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:285-314.
43. Flückiger U, Jones KP, Fischetti VA. Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. *Infect Immun* 1998;66:974-979.
44. Fortier AH, Leiby DA, Narayanan RB, et al. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect Immun* 1995;63:1478-1483.
45. Fourel G, Phalipon A, Kaczorek. Evidence for direct regulation of diphtheria toxin gene transcription by an Fe²⁺-dependent DNA-binding repressor (DtxR) in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* 1989;57:3221-3225.
46. Fournier JM, Boutonnier A, Bouvet A. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination procedures are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* 1989;27:1372-1374.
47. Fournier JM, Bouvet A, Boutonnier A, et al. Predominance of capsular type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1932-1933.
48. Fournier JM, Bouvet A, Mathieu D, et al. New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1342-1344.
49. Fournier JM, Vann WF, Karakawa WW. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1984;47:87-93.
50. Frehel C, Rastogi N. Phagosome-lysosome fusions in macrophages infected with *Mycobacterium avium*: role of mycosides-C and other cell-surface component. *Acta Leprol* 1989;7(Suppl 1):173-174.
51. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP, et al. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994;176:269-275.
52. Gaillard JL, Berche LP, Frehel C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991;65:1127-1141.
53. Galas DJ, Chandler M. Bacterial insertion sequences. In: Berg DE, Howe MM, eds. *Mobile DNA*. Washington, DC: ASM Press, 1989:109-162.
54. Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exoenzyme A expression. *Infect Immun* 1993;61:1180-1184.
55. Garrity GM, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: An Overview of the Road Map to the Manual*. New York: Bergey's Manual Trust/Springer, 2000.
56. Gibbons RJ, Hay DI. Human salivary acidic proline-rich protein and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun* 1988;56:439-445.
57. Goren MB, Brokl O, Schaeffer WB. Lipids of putative relevance to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. *Infect Immun* 1974;9:142-149.
58. Goren MB, D'Arcy Hart PD, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2510-2514.
59. Gorringer AR, Woods G, Robinson A. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett* 1990;66:101-106.
60. Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al. Evaluation of acridinium ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991;29:2473-2476.
61. Granato PA, Franz MR. Use of the Gen Probe PACE system for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:217-221.
62. Griffiss JM, Schneider H, Mandrell RE, et al. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev Infect Dis* 1988;10(Suppl 1):S87-S95.

63. Harris GS, Michalek AM, Curtiss R III. Cloning a locus involved in *Streptococcus aureus* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun* 1992;60:3175-3185.
64. Heckels JE. Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria*. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):566-573.
65. Henriksen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2759-2762.
66. Hirt II, Wirth R, Mischoll A. Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol Gen Genet* 1996;252:640-647.
67. Hitchens AD, Slepecky RA. Bacterial spore formation as a modified cell division. *Nature (London)* 1969;223:804-807.
68. Hollinghead SK, Fischetti VA, Scott JR. Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A streptococcus: repetitive structure and membrane anchor. *J Biol Chem* 1986;261:1677-1686.
69. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
70. Holgren SJ, Abraham S, Caparon M, et al. Pilus and non-pilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 1993;73:897-901.
71. Hunicutt DW, McBride MJ. Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsonii* (*Cytophaga johnsonii*) gliding motility genes, *glbB* and *glbC*. *J Bacteriol* 2000;182:911-918.
72. Janda WM, Wilenski LM, Mandel KL, et al. Comparison of monoclonal antibody-based methods and a ribosomal ribonucleic acid probe test for *Neisseria gonorrhoeae* culture confirmation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:177-184.
73. Jennings HJ, Lugowski C, Young NM. Structure of the complex polysaccharide C-substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Biochemistry* 1980;19:3712-4719.
74. Klijianian J, Goessens W, Van Rijnsoort J, et al. Improved performance of PACE 2 with modified collection system in combination with probe competition assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in urethral specimens from males. *J Clin Microbiol* 1994;32:568-570.
75. Koch AL, Doyle RJ. Inside-to-outside -growth and turnover of the cell wall of gram-positive rods. *J Theor Biol* 1985;117:137-157.
76. Krutzler DL, Robinson DC. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasites: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1979;23:819-828.
77. Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
78. Krueger KHI, Barbieri JT. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:38-47.
79. Lebrun M, Menigaud H, Ohayon H, et al. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Infect Immun* 1996;64:55-61.
80. Lévêque M, Ohayon H, Brun L, et al. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an internal leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 1997;65:5309-5319.
81. Lee BC. Isolation of haematin-binding proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol* 1992;36:121-127.
82. Lee BC. Isolation and characterization of the haematin-binding proteins from *Neisseria meningitidis*. *J Gen Microbiol* 1994;140:1473-1480.
83. Lee KD, Oh YK, Portnoy DA, Swanson JA. Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem* 1996;271:7249-7252.
84. Lewi LA, Dyer DW. Identification of an iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in the utilization of hemoglobin complexed to haptoglobin. *J Bacteriol* 1995;177:1299-1306.
85. Linker A, Jones RS. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *J Biol Chem* 1966;241:3845-3851.
86. Lorber B. Gas gangrene and other *Clostridium*-associated diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2549-2561.
87. Lyras D, Rood JJ. Transposable genetic elements and antibiotic resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. In: Reed JL, McClane BA, Songer JO, Tihalt RW, eds. *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. London: Academic Press, 1997:73-92.
88. Lyras D, Storie C, Haggins AS, et al. Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1563-1567.
89. MacDonald KL, Rutherford GW, Friedman SM, et al. Botulism and botulinum-like illness in chronic drug abusers. *Ann Intern Med* 1983;102:616-619.
90. Makino S-I, Uchida I, Terakado N, Yoshikawa M. Molecular characterization and protein analysis of the *csp* region, which is essential for coagulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1989;171:722-730.
91. Mason L, Heibels BF, Ashon FE. Virulence linked to polysaccharide production in serogroup B *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* 1982;13:187-192.
92. McBride MJ. Bacterial gliding motility: mechanisms and mysteries. *ASM News* 2000;66:203-210.
93. McBride MJ, Kempf MJ. Development of techniques for the genetic manipulation of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonii*. *J Bacteriol* 1996;178:583-590.
94. Message S, Tosi-Couture E, Meek M, et al. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Mol Microbiol* 1997;23:1147-1155.
95. Midam TP, Amon SS. Infant botulism: identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in faeces. *Lancet* 1976;2:934-936.
96. Moreau MF, Richards JC, Fournier JM, et al. Structure of the type-5 capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* 1990;201:285-297.
97. Moses AE, Wessels MR, Zalzman K, et al. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence of group A streptococcus. *Infect Immun* 1997;65:64-71.
98. Murray RGE, Schaefer KH. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:174-176.
99. Murray RGE, Stackebrandt E. Taxonomic note: implementation of the provisional status, *Candidatus*, for incompletely described prokaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:156.
100. Murray T, Popham DL, Sellow P. Identification and characterization of pbpA encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 2A. *J Bacteriol* 1997;179:1021-1029.
101. Orla-Jensen S. *The Lactic Acid Bacteria*. Copenhagen: Hest and Sons, 1919.
102. Panke ES, Yang LJ, Leiss PA, et al. Comparison of Gen-Probe DNA probe test and culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical specimen. *J Clin Microbiol* 1991;29:883-888.
103. Parson MJ. *Pseudomonas metalloproteases and the host-microbe relationship*. In: Flick RH, ed. *Pseudomonas aeruginosa: The Opportunist—Pathogenesis and Disease*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993:79-94.
104. Parsons NJ, Curry A, Fox AJ, et al. The serum resistance of gonococci in the majority of urethral exudates is due to sialylated lipooligosaccharide seen as a surface coat. *FEMS Microbiol Lett* 1992;90:295-300.
105. Paul TR, Venter A, Blawieck LC, et al. Localization of penicillin-binding protein to the splitting system of *Staphylococcus aureus* septa using a mercury-penicillin V derivative. *J Bacteriol* 1995;177:3631-3640.
106. Pearson JP, Fassador L, Igilewski BH, Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1490-1494.
107. Pinhet R, Onyango E, Perkins BA, et al. Evidence for functionally distinct pili expressed by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1991;59:3169-3175.
108. Portnoy DA, Chaturvedi T, Goebel W, Cassat P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 1992;60:1263-1267.
109. Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, et al. A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 1998;66:181-190.
110. Prevost G, Grubler B, Couprie P, et al. Panton-Valentine leukocidin and γ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995;63:4121-4129.
111. Reifried K, Hill T, Chan H. Interaction of lactoferrin and transferrin with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 1987;133:841-848.
112. Reed GL, Kussle P, Parham-Sreen B. A functional analysis of the antigenicity of streptokinase using monoclonal antibody mapping and recombinant streptokinase fragments. *J Immunol* 1993;150:4407-4415.
113. Rice PA. Molecular basis for serum resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):S112-S117.
114. Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Ther* 1983;19:165-194.
115. Sandberg AL, Ruhl S, Jonsson RA, et al. Putative glycoprotein and glycolipid polymorphonuclear leukocyte receptors for the *Arctomyces nishinui* WU fibritin toxin. *Infect Immun* 1985;63:267-269.
116. Schaefer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 1972;36:404-477.
117. Schmitt MP. Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae* *hmrD* gene is regulated by iron and heme. *Infect Immun* 1997;65:4634-4641.
118. Schmitt MP, Holmes RK. Characterization of a defective diphtheria toxin repressor (*dtR*) allele and analysis of *dtR* transcription in wild-type and mutant strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* 1991;59:3901-3908.
119. Schneider H, Griffin JM, Mandrell RE, et al. Elaboration of a 3.6 kilodalton lipooligosaccharide, antibody against which is absent from human sera, is associated with serum resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1985;50:672-677.
120. Schneider H, Hamrick CA, Apicella MA, et al. Instability of expression of lipooligosaccharides and their epitopes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1988;56:942-946.
121. Silverman M, Simon M. Phase variation genetic analysis of winking mutants. *Cell* 1980;19:845-854.
122. Sippel JE, Hider PA, Controli G. Use of Directigen latex agglutination test for detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* antigens in cerebrospinal fluid from meningitis patients. *J Clin Microbiol* 1984;20:884-886.
123. Sisco KI, Smith HG. Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:972-976.
124. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, eds. Approved list of bacterial species. *Int J Syst Bacteriol* 1980;30:225-420.
125. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, eds. Approved list of bacterial names, amended edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1982.
126. Sleytr OB, Beveridge TJ. Bacterial S-layer. *Trends Microbiol* 1999;7:253-260.
127. Sneath PHA, ed. International Code of Nomenclature of Bacteria, 1990 revision. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990.
128. Sneath PHA, ed. International Code of Nomenclature of Bacteria, 1992 revision. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.
129. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, ed. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol 2. Baltimore: William & Wilkins, 1986.

130. Sorenson UB, Blom SJ, Birch-Andersen A, Henriksen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall protein, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun* 1988;56:1890-1896.
131. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:846-849.
132. Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acid and classification. In: O'Donnell M, ed. *Handbook of New Bacterial Systematics*. London: Academic Press, 1993:152-194.
133. Staley JT, Bryant MP, Plennig N, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
134. Staley JT, Krieg MR. Classification of prokaryotic organisms: an overview. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:1-4.
135. Stock JB, Surette MG. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In: *Two Component Signal Transduction*. Washington, DC: ASM Press, 1995:25-51.
136. Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1986;168:1070-1074.
137. Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Clostridium argentinense* sp. nov., a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some non-toxicogenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium histiforme*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:375-381.
138. Sugai M, Yamada S, Nakashima S, et al. Localized perforation of the cell wall by a major autolysin: all gene products and the onset of penicillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997;179:2958-2962.
139. Swift S, Bainton NJ, Winston MK. Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: a universal language? *Trends Microbiol* 1994;2:193-198.
140. Tamaoka J. Determination of DNA base composition. In: Goodfellow M, O'Donnell eds. *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: Wiley, 1994:463-469.
141. Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* 1998;66:5183-59.
142. Thome CB. *Bacillus anthracis*. In: Senenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds. *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993:113-124.
143. Throup JP, Camara M, Briggs GS, et al. Characterization of the *yen/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 1995;17:345-356.
144. Tomasz A. The staphylococcal cell wall. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, et al., eds. *Gram Positive Pathogens*. Washington, DC: ASM Press, 2000:351-360.
145. Tsunori H, Kuramitsu H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:274-280.
146. Tramont EC. Gonococcal vaccines. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):S75-S77.
147. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:118-136.
148. Vasil M, Prince RW, Shortridge VD. Exoproducts: *Pseudomonas* exotoxin A and phospholipase C. In: Fick RB, ed. *Pseudomonas aeruginosa: The Opportunist—Pathogenesis and Disease*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993:59-77.
149. Via LE, Curcio R, et al. Elements of signal transduction in *Mycobacterium tuberculosis*: in vitro phosphorylation and in vivo expression of the response regulator MirA. *J Bacteriol* 178:3314-3321, 1996.
150. Vijaranakul U, Nadakavukaren MJ, DeJonge B, et al. Increased cell size and shortened interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J Bacteriol* 1995;177:5116-5121.
151. Virji M, Heckels JE. The role of common and type-specific pilus antigenic domains in adhesion and virulence of gonococci for human epithelial cells. *J Gen Microbiol* 1984;130:1089-1095.
152. Von Graevenitz A. Revised nomenclature of *Allotococcus anitis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:472.
153. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:463-464.
154. Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, DiCesare TJ. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8317-8321.
155. Wessels MR, Rubens CE, Benedi VJ, Kasper DL. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8983-8987.
156. White A, Ding X, Murphy JR, Ringe D. Structure of metal ion-activated diphtheria toxin repressor/operator complex. *Nature* 1998;394:502-506.
157. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
158. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4576-4579.
159. Yeung MK, Ragsdale PA. Synthesis and function of *Actinomyces naeslundii* T14V type I fimbriae require the expression of additional fimbria-associated genes. *Infect Immun* 1997;65:2629-2639.
160. Zamze SE, Moon ER. Composition of the lipopolysaccharide from different capsular serotype strains of *Haemophilus influenzae*. *J Gen Microbiol* 1987;133:1443-1451.

Enterobacteriaceae

Características de las pruebas de identificación presuntiva

Características de las pruebas de cribado
Utilización de hidratos de carbono
Actividad de citocromooxidasa
Reducción del nitrato

Medios de cultivo utilizados para detectar la fermentación de hidratos de carbono

Uso de agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro
Principios bioquímicos

Selección de medios de aislamiento primario

Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios selectivos
Medios de aislamiento selectivos
Medios de aislamiento de alta selectividad utilizados principalmente para muestras gastrointestinales
Medios de enriquecimiento
Pautas para elegir medios de aislamiento selectivos

Características de las pruebas de identificación diferencial

Producción de indol
Prueba del rojo de metilo
Prueba de Voges-Proskauer
Utilización de citrato
Producción de ureasa

Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina
Producción de fenilalanina desaminasa
Producción de sulfuro de hidrógeno
Motilidad

Taxonomía de *Enterobacteriaceae*

Clasificación de *Enterobacteriaceae* por tribus
Características claves para la identificación de las especies más comunes
Tribu *Escherichieae*
Tribu *Edwardsiellae*
Tribu *Salmonellae*
Tribu *Citrobacterae*
Tribu *Klebsiellae*
Tribu *Proteeae*
Tribu *Yersiniiae*
Tribu *Erwiniae*
Otros géneros nuevos de *Enterobacteriaceae*
Características de identificación de *Enterobacteriaceae* más nuevas
Importancia clínica de *Enterobacteriaceae* más nuevas

Métodos de cribado para la identificación rápida

Equipos comerciales para pruebas de cribado
Medios de agar cromogénicos

Sistemas de identificación clásicos

Matriz en tablero de damas
Diagramas de flujo
Esquemas computarizados

Sistemas de codificación numérica

- Lectura de los códigos de octales en registradores de códigos numéricos
- Frecuencia de aparición estimada
- Cálculo de probabilidad
- Resolución de las discrepancias

Sistemas de identificación en equipos comerciales de determinaciones múltiples

- Aspectos generales de los sistemas comerciales disponibles
- Sistemas de identificación específicos
 - API 20E
 - Sistema de ID BBL Crystal Enteric/Nonfermenter

- Sistema RapID onE
- Enterotube II
- Micro-ID
- Microplaca Biolog GN2
- Sistema MicroScan
- Sistema Sensititre

Sistemas de identificación semiautomáticos y automáticos

- MicroScan Walkaway
- Sistema Vitek
- Sistema de autoidentificación para gramnegativos Sensititre
- Sistema Phoenix
- Sistema OmniLog ID

Los bacilos gramnegativos pertenecientes a *Enterobacteriaceae* son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en las muestras clínicas. Ampliamente dispersos en la naturaleza, estos microorganismos se encuentran en la tierra y el agua, sobre las plantas y, como lo indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de seres humanos y de animales. Antes del advenimiento de los antibióticos, la quimioterapia y las medidas inmunosupresoras, las enfermedades infecciosas producidas por *Enterobacteriaceae* estaban bastante bien definidas. Se sabía que los síndromes diarreicos y disentericos, acompañados por fiebre y septicemia en los casos claros de fiebre tifoidea, eran provocados por especies de *Salmonella* y *Shigella*. También, que los casos clásicos de neumonía, caracterizados por la producción de esputo rojo ladrillo o en "jalea de grosellas", eran causados por el bacilo de Friedlander (*Klebsiella pneumoniae*). *Escherichia coli*, diversas especies de *Proteus* y distintos miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter* se aislaban de las heridas traumáticas contaminadas con tierra o material vegetal o de las incisiones de heridas abdominales luego de intervenciones quirúrgicas gastrointestinales.

Por lo tanto, los miembros de *Enterobacteriaceae* pueden estar implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperarse de cualquier muestra recibida en el laboratorio. Los pacientes inmunodeprimidos o debilitados son muy sensibles a las infecciones adquiridas en el hospital, ya sea después de la colonización con cepas ambientales o luego de procedimientos invasores, como cateterismos, broncoscopia, colposcopia o biopsias quirúrgicas, en los cuales se traumatizan o seccionan las mucosas.

El shock endotóxico es una manifestación potencialmente letal de la infección por bacterias gramnegativas, entre ellas, *Enterobacteriaceae*. La endotoxina es un polisacárido complejo y farmacológicamente activo contenido en el interior de la pared celular de las especies gramnegativas. Este lipopolisacárido está estructurado en tres capas: 1) una porción externa variable de hidratos de carbono que determina la especificidad antigénica O (p. ej., distintos serotipos de *Salmonella*), 2) un corazón intermedio de polisacárido que es estructuralmente

similar entre las especies y 3) una porción lipídica central muy conservada denominada lípido A. Se han demostrado experimentalmente los efectos biológicos de la endotoxina: pequeñas cantidades inyectadas por vía intravenosa en los animales producen fiebre, leucopenia, hemorragia capilar, hipotensión y colapso circulatorio; síntomas que, en gran medida, son los mismos que los observados en los seres humanos con sepsis por gramnegativos.

En el diagnóstico del shock endotóxico se utilizó con éxito variable el ensayo de lisado de limulo, que emplea un reactivo preparado de los amebocitos del cangrejo en herradura (*Limulus polyphemus*).¹⁵⁴ El lisado sufre gelación al entrar en contacto con cantidades incluso pequeñas de endotoxina. Más promisorio en el diagnóstico de la sepsis por gramnegativos es el desarrollo de anticuerpos monoclonales, que se pueden utilizar en el inmunoensayo enzimático u otras técnicas para la detección del lípido A. Los efectos farmacológicos de la endotoxina pueden atribuirse principalmente al lípido A, el cual es muy antigénico y tiene determinantes comunes a todas las cepas de bacilos gramnegativos. Por lo tanto, la detección del lípido A circulante en los pacientes con sepsis por gramnegativos, utilizando un anticuerpo monoclonal, podría establecer un diagnóstico con el fin de implementar un tratamiento presuntivo antes de aislar e identificar el microorganismo causal.

Los microbiólogos deben estar atentos a la aparición de cualquier enterobacteria resistente a múltiples antibióticos. Los mecanismos por los cuales se puede desarrollar resistencia se detallan en el capítulo 17. La resistencia a los antibióticos puede evolucionar en cepas clínicas que antes eran sensibles mediante la transferencia de plásmidos conocidos como factores R o plásmidos R. Las bacterias entéricas gramnegativas tienen casi siempre un plásmido R grande y único que codifica la resistencia a varios antibióticos. Un porcentaje creciente de cepas de los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Providencia*, además de algunas cepas indol positivas de *Proteus* y cepas resistentes a la cefalotina de *Escherichia coli*, tienen β -lactamasas que imparten resistencia cruzada a muchos antibióticos β -lactámicos.^{435,436} Las enzimas inactivadoras a menudo

están mediadas por vía cromosómica y pueden ser responsables de la resistencia "intercurrente" en pacientes tratados por septicemia. Las pruebas de sensibilidad por difusión en disco no siempre detectan cepas resistentes, sobre todo cuando se evalúan las cefalosporinas; por lo tanto, puede estar indicado un procedimiento de dilución en caldo. No sólo es importante detectar estas cepas para tratar al paciente afectado, sino que es fundamental, además, para la vigilancia de las infecciones hospitalarias. En las próximas secciones de este capítulo se explican los síndromes clínicos específicos de géneros y especies individuales.

Características de las pruebas de identificación presuntiva

¿Cuáles son los indicios iniciales de que una cepa desconocida aislada de una muestra clínica puede pertenecer a *Enterobacteriaceae*? En muestras distintas de las heces, un preparado teñido con Gram puede poner en evidencia células de bacilos o cocobacilos gramnegativos cortos y plétóricos, que varían en ancho de 0,5 a 2 µm y de 2 a 4 µm de largo (véase lámina en color 6-1A). Sin embargo, no es posible diferenciar las especies sólo sobre la base de la morfología en la tinción de Gram.

La morfología característica de las colonias de un microorganismo que crece en un medio sólido puede proporcionar un segundo dato. En los casos típicos, algunos miembros de *Enterobacteriaceae* producen colonias relativamente grandes, gris mate, secas o mucoides en agar sangre ovina, y estas últimas sugieren cepas encapsuladas de *Klebsiella pneumoniae* (véase lámina en color 6-1B y C). La hemólisis en agar sangre es variable y no es característica. Las colonias que aparecen como una película delgada o como ondas (fenómeno conocido como *trepada*) sugieren que el microorganismo es móvil y probablemente una especie de *Proteus* (véase lámina en color 6-1D). Las colonias que aparecen rojas en agar de MacConkey o que tienen un brillo verde en agar eosina-azul de metileno (véase lámina en color 6-2) indican que el microorganismo puede formar ácido a partir de lactosa en el medio.

Sin embargo, la diferenciación de las enterobacterias se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas dirigen el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de varias vías que pueden detectarse mediante medios especiales utilizados en técnicas de cultivo *in vitro*. Se incorporan al medio de cultivo sustratos sobre los cuales pueden reaccionar estas enzimas, junto con un indicador que puede detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Mediante la selección de una serie de medios que miden diferentes características metabólicas de los microorganismos por evaluar es posible determinar un perfil bioquímico para la identificación de una especie.

Características de las pruebas de cribado

La identificación definitiva de las enterobacterias puede requerir una serie de pruebas bioquímicas. Se puede evitar un tiempo considerable y una posible identificación errónea si se efectúan algunas observaciones preliminares para asegurarse de que el microorganismo que se evaluará pertenece a este grupo. Si se trata de un microorganismo gramnegativo de otro grupo, puede ser necesario utilizar un conjunto diferente de características que se emplean comúnmente para la identificación de las enterobacterias. Con pocas excepciones, todos los

miembros de las enterobacterias demuestran las siguientes características:

- Fermentan la glucosa (véase lámina en color 6-1E y F).
- La citocromooxidasa es negativa (véase lámina en color 6-1G).
- El nitrato es reducido a nitrito (véase lámina en color 6-1H).

UTILIZACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

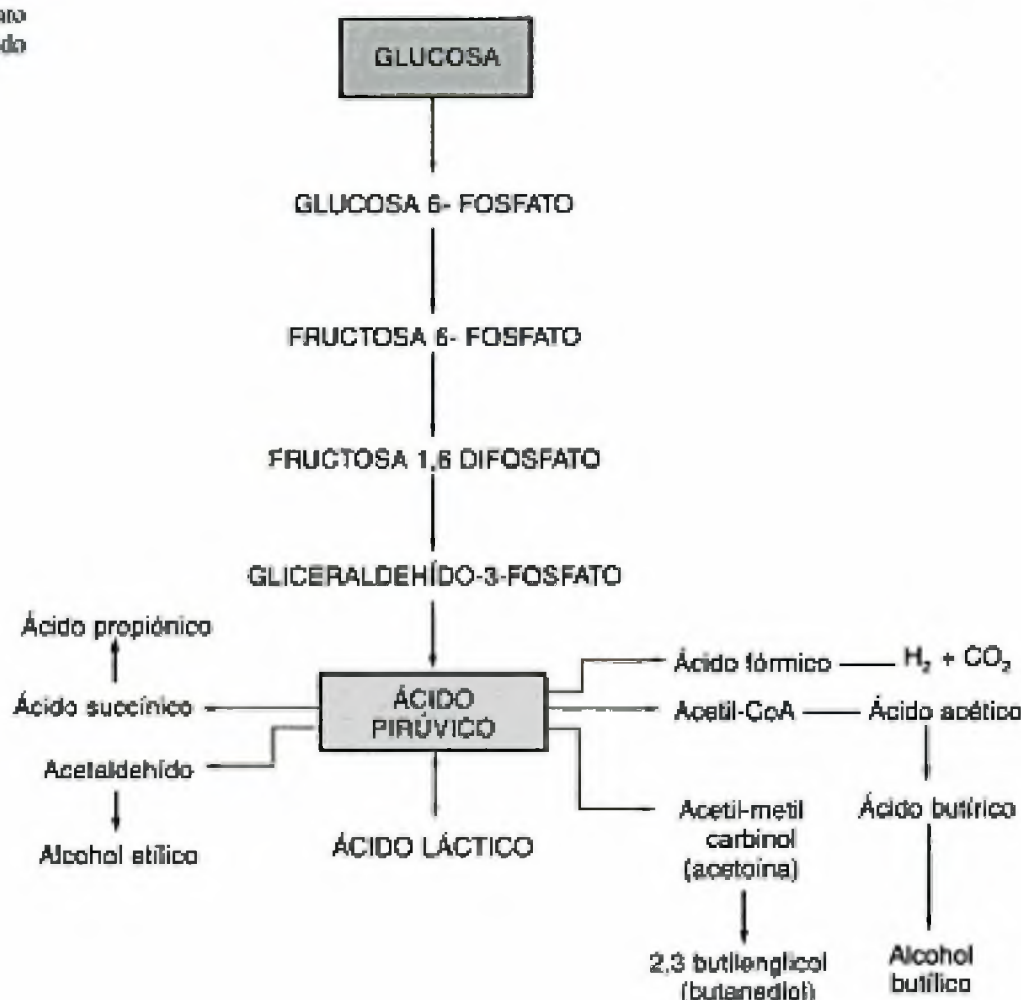
Es frecuente que los microbiólogos del laboratorio se refieran a todos los hidratos de carbono como **azúcares**. Es conveniente en un sentido operacional, aunque se comprende que los alcoholes poliédricos, como dulcitol y manitol, o las sales catiónicas de acetato o tartrato no son hidratos de carbono y, por lo tanto, no son verdaderos azúcares en un sentido químico.

El término **fermentación** también se emplea en forma laxa para hacer referencia a la utilización de hidratos de carbono por las bacterias, con términos como **fermentadoras de lactosa** y **no fermentadoras de lactosa**. Por definición, la fermentación es un proceso metabólico de oxidoreducción que tiene lugar en un medioambiente anaerobio y, en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como aceptor final de hidrógeno (electrones). En los sistemas de pruebas bacteriológicas, este proceso se detecta observando cambios de color en los indicadores de pH a medida que se forman los productos ácidos. La acidificación de un medio de prueba puede ocurrir a través de la degradación de los hidratos de carbono por vías distintas de la fermentación o puede haber ingredientes diferentes de los hidratos de carbono en algunos medios que conducen a productos finales ácidos. Si bien la mayoría de las bacterias que metabolizan hidratos de carbono son anaerobios facultativos, es posible que la utilización no siempre esté en condiciones estrictamente anaerobias, como se observa en la producción de productos ácidos por las colonias de bacterias que crecen sobre la superficie de los medios de agar. Aun cuando es posible que no todas las pruebas utilizadas para medir la capacidad de un microorganismo para degradar enzimáticamente un "azúcar" en productos ácidos sean "fermentativas", así se denominarán en el texto por conveniencia.

Principios básicos de la fermentación. Los estudios de Pasteur de mediados del siglo XIX sobre la acción de las levaduras en el vino proporcionaron la base de nuestro conocimiento actual de la fermentación de los hidratos de carbono. Pasteur observó que algunas especies de bacterias contaminantes producían una caída en el pH del vino (un sustrato hidrocarbonado) a partir de la producción de distintos ácidos. Poco después surgieron descripciones completas de las vías fermentativas por medio de las cuales se degrada un monosacárido como la glucosa. Mediante una serie de escisiones glucolíticas y transformaciones enzimáticas, la molécula de glucosa se divide en tres compuestos de carbono, el más importante de los cuales es el ácido pirúvico. La secuencia química mediante la cual la glucosa se convierte en ácido pirúvico se conoce como **vía de Embden-Meyerhoff** (fig. 6-1). Muchas bacterias, entre ellas todas las enterobacterias, fermentan la glucosa a través de esta vía para formar ácido pirúvico; sin embargo, la forma como se adiciona ácido pirúvico varía según la especie de bacteria. Los destinos alternativos del ácido pirúvico son el resultado de distintas vías de fermentación, que arrojan productos bastante diferentes (véase fig. 6-1).

Las bacterias se diferencian por los hidratos de carbono que metabolizan y por los tipos y las cantidades de ácidos producidos. Estas diferencias en la actividad enzimática son una de las

Figura 6-1 Fermentación de la glucosa para formar piruvato (vía de Embden-Meyerhof) y los destinos alternativos del ácido pirúvico.



principales características por las cuales se reconocen las diversas especies. Es importante que los estudiantes de microbiología comprendan que en la formación glucolítica de ácido pirúvico se genera adenosintrifosfato (ATP) a expensas de la reducción de adenina nicotinamida dinucleótido (NAD) a NADH_2 . Por cada molécula de glucosa que se fermenta para formar ácido pirúvico, se consumen cuatro iones hidrógeno a través de la reducción de dos NAD a dos NADH_2 . Dado que el NAD total en la célula es muy limitado, la fermentación cesaría muy rápidamente si el NADH_2 no fuera reoxidado en el metabolismo ulterior de ácido pirúvico. En la figura 6-2 se muestra la fermentación de tres moléculas de glucosa por medio de dos vías alternativas. Por ejemplo, la fermentación de glucosa por *Escherichia coli* ocurre por la vía de fermentación de ácidos mixtos y conduce a la producción de gran cantidad de ácidos acético, láctico y fórmico con una acentuada caída del pH en el medio de prueba. Esto se detecta mediante una prueba de rojo de metilo positiva (véase fig. 6-2). Por otra parte, las bacterias del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* metabolizan el ácido pirúvico principalmente a través de la vía del butilenglicol, con producción de acetil metilcarbinol (acetoina) y una prueba de Voges-Proskauer (VP) positiva (véase fig. 6-2). Obsérvese que los principales productos terminales en esta última vía son alcoholes y sólo se produce una pequeña cantidad de ácido, por lo tanto, la prueba de rojo de metilo suele ser negativa para este grupo de microorganismos.

El gas que resulta de las bacterias fermentadoras es fundamentalmente una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono que se forma a través de la escisión del ácido pirúvico. Es un principio general aceptado que cualquier bacteria que forma gas en el medio de prueba de hidratos de carbono debe formar primero ácido, lo cual es evidente a partir del esquema de la vía

de Embden-Meyenhoff que se muestra en la figura 6-1. Es mejor detectar el gas utilizando un medio de fermentación de hidratos de carbono en caldo en el que se colocan pequeños tubos Durham invertidos (véase lámina en color 6-1F). Se pueden detectar incluso pequeñas cantidades de gas, que se acumulan como burbujas en el fondo de los tubos Durham. Algunas especies de enterobacterias carecen de la enzima ácido fórmico deshidrogenasa y no pueden escindir el ácido fórmico; en consecuencia, no forman siquiera pequeñas cantidades de CO_2 (p. ej., la mayoría de las especies de *Shigella*). Por el contrario, los microorganismos que utilizan la vía del butilenglicol (que son Voges-Proskauer-positivos) producen grandes cantidades de CO_2 (véase fig. 6-2). Por lo tanto, cuando se observa abundante de gas, se deben considerar los miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* como probable identificación. La formación de alcohol etílico por parte de los microorganismos es de suma importancia comercial en la elaboración de bebidas alcohólicas y reactivos orgánicos; sin embargo, tiene una utilidad limitada en la identificación de bacterias por el laboratorio.

La fermentación bacteriana de lactosa es más compleja que la de glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, conectadas por un enlace de oxígeno conocido como **enlace galactosídico**. Con la hidrólisis, este enlace se corta y libera glucosa y galactosa. Para que una bacteria metabolice lactosa, deben presentarse dos enzimas: 1) la β -galactósido permeasa, que permite el transporte de un β -galactósido, como lactosa, a través de la pared de la célula bacteriana y 2) la β -galactosidasa, necesaria para hidrolizar el enlace β -galactósido una vez que el disacárido ha entrado en la célula. La degradación ácida final es el resultado de la degradación de glucosa como se muestra en la figura 6-3.

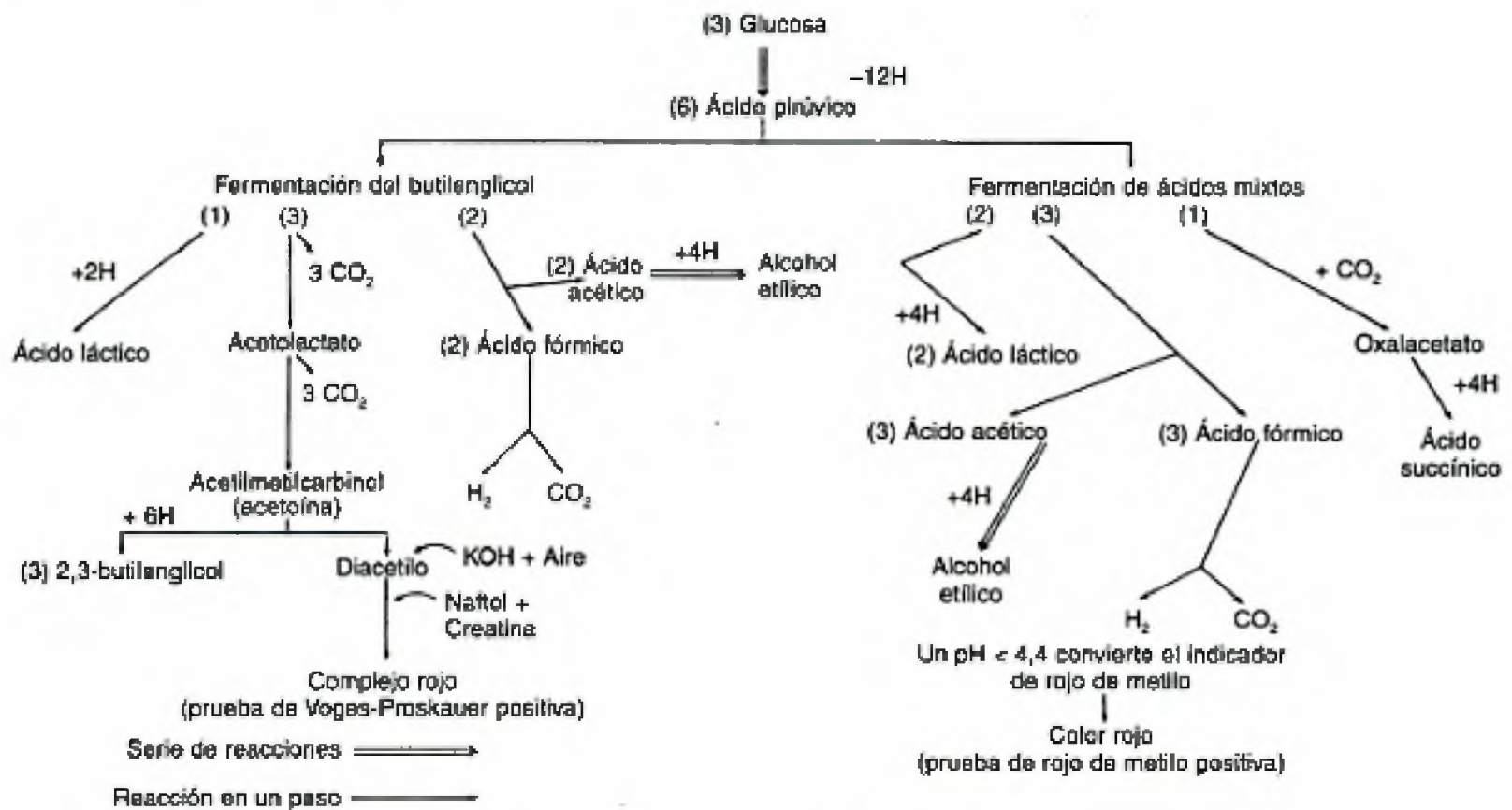


Figura 6-2 Vías de ácidos mixtos y butilenglicol de fermentación de la glucosa.

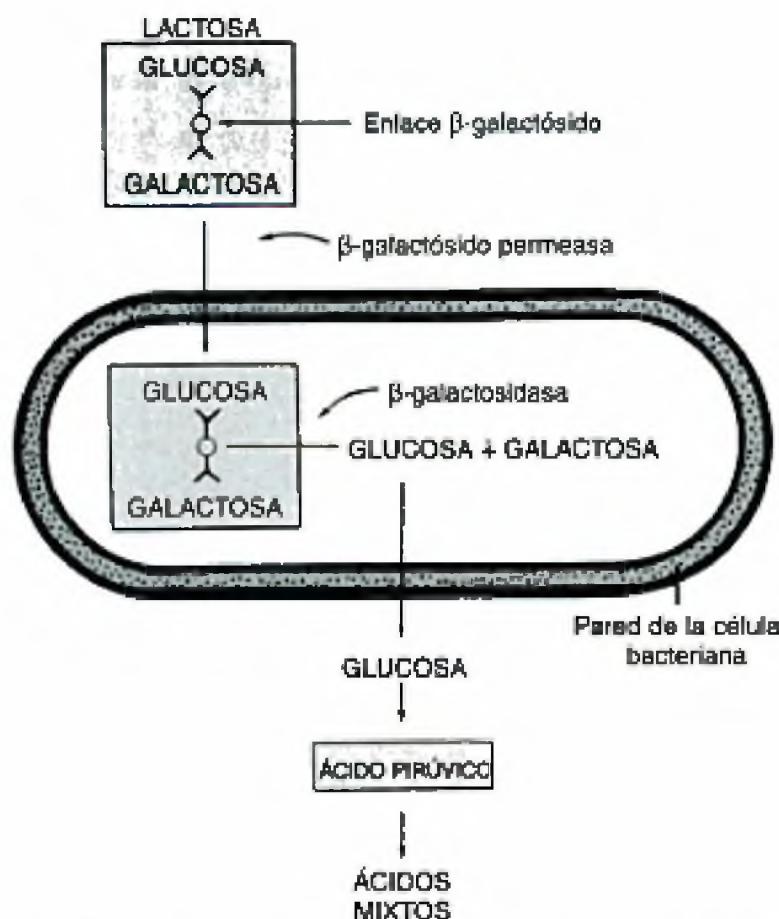


Figura 6-3 Fermentación bacteriana de la lactosa: la lactosa, disacárido compuesto por moléculas de glucosa y galactosa unidas por un enlace β-galactósido, se difunde a través de la pared de la célula bacteriana bajo la acción de la β-galactosidasa permeasa. Si la bacteria produce β-galactosidasa, la lactosa es hidrolizada para producir glucosa y galactosa. La glucosa es luego metabolizada como se muestra en la figura 6-1.

Como la fermentación de la lactosa finalmente prosigue por medio de la degradación de glucosa a través de la vía de Embden-Meyenhoff, cualquier microorganismo incapaz de metabolizar glucosa no puede formar ácido a partir de lactosa. Esto explica por qué se omite la glucosa de las fórmulas de los medios de aislamiento primario como el agar de MacConkey y el agar eosina-azul de metileno: si no se omitiera, se perdería la habilidad para detectar la capacidad fermentadora de lactosa de las bacterias de prueba. En el medio de prueba, el parámetro de fermentación de lactosa es la detección de producción de ácido. Un microorganismo no fermentador de lactosa es aquel que carece de una o de ambas enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa o que carece de la capacidad para atacar la glucosa. Se cree que los denominados fermentadores tardíos de lactosa son microorganismos que muestran actividad de β-galactosidasa, pero una actividad perezosa de β-galactósido permeasa.

β-galactosidasa y prueba de ONPG. El *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) es un compuesto estructuralmente similar a la lactosa excepto en que la glucosa ha sido reemplazada por un grupo *o*-nitrofenilo. Esta manipulación algo ingeniosa de la molécula forma la base para la prueba de ONPG, que se bosqueja en el protocolo 6-1. Esta prueba detecta la enzima β-galactosidasa mucho más rápidamente que la prueba para la fermentación de lactosa que describimos antes. Esto es útil para identificar los fermentadores tardíos de lactosa que tienen una deficiencia de β-galactósido permeasa. El ONPG penetra en la célula bacteriana más fácilmente que la lactosa y, bajo la acción de la β-galactosidasa, se hidroliza en galactosa y *o*-nitrofenol (véase protocolo 6-1). El *o*-nitrofenol es un cromóforo incoloro cuando está ligado a D-galactopiranosido pero es amarillo en su forma libre (no ligada) (véase lámina en color 6-4A).

Se comercializan tabletas para prueba de ONPG que se pueden reconstituir rápidamente agregando una pequeña cantidad de agua y cuyo uso es conveniente en el laboratorio. Los micro-

organismos con una actividad fuerte de β -galactosidasa pueden producir una prueba positiva pocos minutos después de la inoculación del medio. La prueba de ONPG es muy útil para la detección de actividad de β -galactosidasa en los fermentadores tardíos de lactosa, como algunas cepas de *E. coli*, en las cuales la diferenciación de las especies de *Shigella* (salvo ciertas cepas de *S. sonnei*) puede ser difícil. La prueba también es útil para distinguir algunas cepas de especies de *Citrobacter* y *Salmonella* ser. *Arizonae* (ONPG positivas) de la mayoría de las especies de *Salmonella* (ONPG negativas). La prueba ONPG no es un sustituto de la determinación de la fermentación de lactosa porque sólo se mide la enzima β -galactosidasa.

ACTIVIDAD DE CITOCROMOXIDASA

Cualquier microorganismo que muestra actividad de citocromooxidasa luego del procedimiento y las condiciones de prueba señalados en el protocolo 1-5 es excluido de las enterobacterias. La reacción de color en desarrollo debe interpretarse dentro de los 10 a 20 segundos porque muchos microorganismos, incluidos algunos miembros seleccionados de las enterobacterias, pueden producir reacciones falsas positivas tardías. Si es dificultoso interpretar la reacción de la citocromooxidasa se deben evaluar tanto los microorganismos oxidasa positivos como los oxidasa negativos. Se utilizan más a menudo por conveniencia goteros comerciales de citocromooxidasa. Las reacciones de color son claramente visibles en 10 segundos. Si se utilizan en el laboratorio ansas o alambres inoculadores metálicos para transferir bacterias al reactivo oxidasa, las fabricadas con acero inoxidable o Nichrome® pueden producir reacciones falsas positivas debido a pequeñas cantidades de óxido de hierro sobre la superficie encendida del metal. Este problema puede evitarse utilizando ansas inoculadoras de plástico o platino o mediante palitos aplicadores de madera o hisopos de algodón para realizar la prueba de oxidasa. Se utiliza principalmente tetrametil-*p*-femilenediamina, más que el derivado dimetilico, porque el derivado es más estable, más sensible y menos tóxico (véanse protocolo 1-5 y lámina en color 6-1G).

REDUCCIÓN DEL NITRATO

Todas las enterobacterias, con excepción de ciertos biotipos de *Pantoea agglomerans* y ciertas especies de *Serratia* y *Yersinia*, reducen el nitrato a nitrito. Como se necesita un período variable de incubación (3 a 24 horas, según el sistema aplicado) para realizar la prueba de reducción de nitrato, no suele utilizarse para el cribado preliminar de cepas bacterianas desconocidas. Más bien, la prueba se utiliza en la mayoría de los laboratorios para confirmar la clasificación correcta de un microorganismo desconocido o como auxiliar para determinar la identificación de especies bacterianas. En el protocolo 6-2 se detalla la prueba de reducción de nitrato.

Cualquier medio basal que facilite la proliferación de microorganismos y que contenga una concentración de 0,1% de nitrato de potasio (KNO_3) es apropiado para esta prueba. El caldo de nitrato y el agar nitrato en un tubo inclinado son los medios más utilizados en los laboratorios clínicos. Como la enzima nitrato reductasa tiene una actividad máxima en condiciones anaerobias, Zobel ha recomendado el uso de agar semisólido.³¹⁶ Los medios semisólidos también aumentan el crecimiento de muchas especies y proporcionan el medioambiente anaerobio necesario para la activación enzimática. El agregado de polvo de cinc a todas las reacciones negativas, como se muestra en el protocolo 6-2, debe ser un procedimiento de rutina. La mayoría

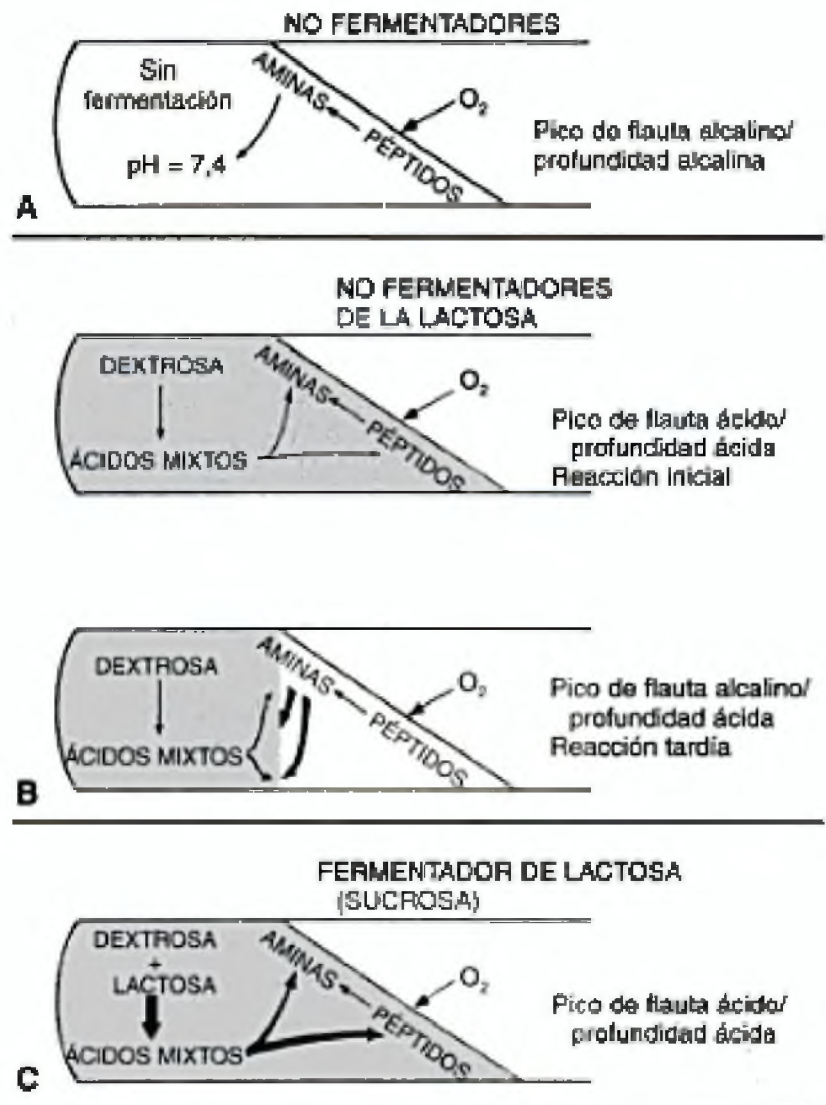


Figura 6-4 Tres tipos generales de reacciones producidas por las bacterias que crecen en agar hierro de Kligler: (A) Bacilos no fermentadores que no pueden producir ácidos a partir de la fermentación de la glucosa o la lactosa; no existe ningún cambio en el medio (representado por blanco). (B) Acidificación inicial de la profundidad y la parte inclinada o pico de flauta del medio (área sombreada) por las bacterias que fermentan la glucosa, pero la parte inclinada revierte nuevamente a pH alcalino a medida que se forman anillos alcalinos a partir de la descarboxilación oxidativa de los péptidos (derivados de proteínas en el medio) cerca de la superficie. (C) Acidificación permanente completa de la profundidad y el pico de flauta del tubo por las bacterias que fermentan la lactosa.

de los microorganismos que reducen los nitratos lo hacen dentro de las 24 horas; algunos pueden producir cantidades detectables dentro de las 2 horas. Schreckenberger y Blazevic describieron una prueba de nitrato rápida.⁴⁴⁴ Tanto la α -naftilamina como el ácido sulfanílico son relativamente inestables, de modo que su reactividad debe determinarse a intervalos frecuentes mediante la evaluación con microorganismos positivos y negativos en los controles. El compuesto diazonio que se forma a partir de la reacción del nitrato reducido y los reactivos también es relativamente inestable y el color tiende a borrarse; en consecuencia, se deben realizar lecturas poco después de agregar los reactivos (véase lámina en color 6-1H).

Medios de cultivo utilizados para detectar la fermentación de hidratos de carbono

Se pueden utilizar distintos medios líquidos o de agar para medir la capacidad de un microorganismo de prueba para utili-

zar hidratos de carbono en forma fermentativa. El hidrato de carbono que se va a evaluar, como la glucosa, es esterilizado mediante un filtro y se agrega en condiciones asépticas a un medio elemental hasta una concentración final de 0,5-1,0%. La fórmula típica de un medio elemental de fermentación contiene tripticasa (BBL), 10 g; cloruro de sodio, 5 g; rojo fenol, 0,018 g y agua destilada hasta igualar 1 L. La tripticasa es un hidrolizado de caseína que sirve como fuente de carbono y nitrógeno; el cloruro de sodio es un estabilizador osmótico y el rojo fenol es un indicador de pH que vira al amarillo cuando el pH del medio cae por debajo de 6,8. En la lámina en color 6-1F se ilustran las reacciones de fermentación ácida en medio de caldo púrpura. Todas las enterobacterias crecen bien en este tipo de medio y la fórmula base utilizada depende de la preferencia personal. Además de provocar un cambio de color del pH en los medios de cultivo de fermentación, la producción de ácidos mixtos, en especial ácido butírico, a menudo ocasiona un olor fétido y acre en el medio de cultivo. Cuando se detecta este olor, se debe sospechar de inmediato la presencia de enterobacterias (además, las bacterias anaerobias producen productos metabólicos característicos con olores definidos).

Uso de agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro

En la práctica, los microorganismos capaces de fermentar la glucosa se detectan observando las reacciones que producen cuando crecen en agar hierro de Kligler (KIA) o agar triple azúcar-hierro (TSI) (fig. 6-4; véase lámina en color 6-1E). Cuando un microorganismo no puede fermentar la glucosa, se observa una reacción alcalina-inclinado-alcalina-inferior (sin cambios) (véase fig. 6-4A), lo que indica la ausencia de producción de ácido y la incapacidad del microorganismo de prueba para fermentar cualquier azúcar presente. Esta sola razón es suficiente para excluir a un microorganismo de las enterobacterias. La fórmula del agar hierro de Kligler se enumera en el recuadro 6-1 (la fórmula para el agar azúcar-hierro es idéntica excepto en que se agregan 10 g de sacarosa).

Son importantes varias observaciones cuando se estudian las fórmulas de agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro. La incorporación de cuatro derivados proteicos: extracto de carne de vaca, extracto de levadura, peptona y peptona proteosa enriquece mucho desde el punto de vista nutricional al agar hierro de Kligler y el agar triple azúcar-hierro. La ausencia de inhibidores permite el crecimiento de todas las especies bacterianas excepto aquellas con requerimientos nutricionales muy especiales (excluidas las anaerobias estrictas). Por lo tanto, estos medios sólo pueden utilizarse cuando se evalúan especies bacterianas seleccionadas a partir de una colonia única recuperada en placas de agar primarias o selectivas. La glucosa y la lactosa (y la sacarosa en el medio de agar triple azúcar-hierro)

están distribuidas de manera uniforme tanto en la porción inclinada como en la porción inferior (profunda) del tubo. Sin embargo, la lactosa está presente en una concentración 10 veces la de la glucosa (asimismo, la relación de la sacarosa con la glucosa es de 10:1 en el medio de agar triple azúcar-hierro). Esta relación 10:1 es importante para comprender los principios bioquímicos que se explican más adelante. El sulfato ferroso como detector de sulfuro de hidrógeno es algo menos sensible que otras sales férricas o ferrosas; por consiguiente, puede haber discrepancias en las lecturas de sulfuro de hidrógeno entre agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro y otros medios de prueba (véase lámina en color 6-4B). El indicador rojo fenol es amarillo por debajo de un pH de 6,8. Como el pH del medio uninoculado está amortiguado a un pH 7,4, las cantidades relativamente pequeñas de producción de ácido conducen a un cambio visible de color.

Principios bioquímicos

Los principios bioquímicos subyacentes a las reacciones observadas en agar hierro de Kligler o agar triple azúcar-hierro se muestran en la figura 6-4. Obsérvese que el agar fundido se deja solidificar en un tubo inclinado. Esta configuración conduce esencialmente a dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La **porción inclinada del agar o pico de flauta**, expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción inferior, denominada **parte inferior o profunda**, está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Cuando se preparan los medios es importante mantener de igual longitud la porción inclinada y la profundidad, de unos 3 cm cada una, de modo que se preserve el efecto de dos cámaras.

Los tubos de agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro se inoculan con un alambre recto y largo. La colonia de prueba bien aislada recuperada de una placa de agar se toca con el extremo de la aguja de inoculación, el que luego se punza en la profundidad del tubo, extendiéndolo hasta dentro de 3 a 5 mm de su parte inferior. Cuando se retira el alambre de inoculación de la profundidad del tubo, se raya la superficie inclinada con un movimiento de atrás hacia adelante. Los tubos inoculados se colocan en una estufa a 35 °C durante 18 a 24 horas. Las fotografías que se muestran en las láminas en color 6-1E y 7-1A evidencian las reacciones que se describen en el recuadro 6-2. Así, como se muestra en la figura 6-4A y en la lámina en color 7-1A, sin fermentación de los hidratos de carbono no se forman ácidos y la producción de aminas en la porción inclinada, junto con los buffers alcalinos, tiñe de color rojo todo el medio. Las bacterias que causan este tipo de reacción se conocen como **no fermentadoras** (véase cap. 7).

Si se inocula el tubo de agar hierro de Kligler con un microorganismo fermentador de glucosa que no puede utilizar lactosa, se puede obtener sólo una cantidad relativamente pequeña de la concentración de 0,1% de glucosa en el medio. Al principio, durante las primeras 8 a 12 horas de incubación, incluso esta cantidad de ácido puede convertir el color de la profundidad y de la porción inclinada al amarillo. Sin embargo, en las horas siguientes, el aporte de glucosa se agota por completo y las bacterias comienzan la degradación oxidativa de los aminoácidos dentro de la porción en pico de flauta del tubo donde hay oxígeno. Esto libera las aminas que pronto contrarrestan las pequeñas cantidades de ácido presentes en la porción inclinada; para las 18 a 24 horas, la totalidad del pico de flauta vira a un pH alcalino y el color retorna al rojo. No obstante, en la profundidad (porción anaerobia) del tubo, la degradación de aminoácidos es insuficiente para contrarrestar el ácido forma-

Recuadro 6-1 Agar hierro de Kligler

Extracto de vacuno, 3 g	Cloruro de sodio, 5 g
Extracto de levadura, 3 g	Tiosulfato de sodio, 0,3 g
Peptona, 15 g	Agar, 12 g
Peptona de proteosa, 5 g	Rojo fenol, 0,024 g
Lactosa, 10 g	Agua destilada hasta igualar 1 L
Glucosa, 1 g	pH final, 7,4
Sulfato ferroso, 0,2 g	

Recuadro 6-2 Reacciones en KIA**Pico de flauta alcalino/Profundidad alcalina (K/K)**

No hay fermentación de hidratos de carbono. Esto es característico de las bacterias no fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa*.

Pico de flauta alcalino/Profundidad ácida (K/A)

Glucosa fermentada; lactosa (o sacarosa para el medio TSI) no fermentada. Esto es característico de las bacterias que no fermentan lactosa, como algunas especies de *Shigella*.

Pico de flauta alcalino/Profundidad ácida (negra) (K/AH₂S)

Glucosa fermentada; lactosa no fermentada, se produce sulfuro de hidrógeno. Esto es característico de las bacterias que no fermentan lactosa que producen sulfuro de hidrógeno, como algunas especies de *Salmonella*, de *Citrobacter* y de *Proteus*.

Pico de flauta ácido/Profundidad ácida (A/A)

Glucosa y lactosa (o sacarosa con TSI) fermentadas. Esto es característico de los coliformes que fermentan la lactosa, como *Escherichia coli* y las especies del complejo *Klebsiella-Enterobacter*.

do y el medio permanece amarillo. Por lo tanto, la reacción alcalina-pico de flauta-ácida-profundidad en agar hierro de Kligler (o agar triple azúcar-hierro) es un indicador inicial importante de que el microorganismo en prueba no es fermentador de la lactosa (véanse fig. 6-4B y lámina en color 6-1E).

Si se inocula el tubo de agar hierro de Kligler con un microorganismo fermentador de la lactosa, incluso cuando se agote por completo la glucosa después de las primeras 8 a 12 horas, la fermentación continúa mientras el microorganismo pueda utilizar lactosa (presente en 10 veces la concentración de glucosa). En consecuencia, cuando se examina el tubo al final de 18 a 24 horas, sigue ocurriendo la producción de ácido a partir de la fermentación de lactosa y tanto la porción inclinada como la profundidad se presentan amarillas, lo que conduce a una reacción ácida-porción inclinada-ácida-profundidad (véanse fig. 6-4C y lámina en color 6-1E).

Muchos microbiólogos prefieren el agar triple azúcar-hierro al agar hierro de Kligler porque el agregado de sacarosa a la fórmula ayuda a evaluar especies de *Salmonella* y *Shigella*, ya que ninguna de éstas (excepto raras cepas) metaboliza lactosa o sacarosa. Por lo tanto, cualquier reacción ácido-ácido de agar triple azúcar-hierro indica que se ha fermentado lactosa, sacarosa o ambas, lo que excluye *Salmonella* y *Shigella*. También se debe recordar que *Yersinia enterocolitica* fermenta sacarosa, pero no lactosa; por lo tanto, en agar triple azúcar-hierro la reacción será ácida-ácida (similar a los coliformes como *E. coli*), pero en agar hierro de Kligler, la reacción será alcalina-ácida (similar a un no fermentador de lactosa). En consecuencia, cuando se evalúan muestras de heces para *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, algunos autores podrían argumentar que el agar hierro de Kligler es preferible al agar triple azúcar-hierro.

Para la detección de sulfuro de hidrógeno, que es incoloro, el medio debe incluir un indicador. El tiosulfato de sodio es la fuente de átomos de azufre en la mayoría de los medios utilizados para la producción de sulfuro de hidrógeno. Las sales de

hierro (sulfato ferroso y citrato amónico férrico) incorporadas en los medios de cultivo reaccionan entonces para producir un precipitado negro insoluble (sulfuro ferroso). Se necesita un medioambiente ácido para que un microorganismo produzca sulfuro de hidrógeno y, por lo tanto, se debe proveer una fuente de hidrogeniones. Como la porción profunda de los tubos de agar hierro de Kligler y agar triple azúcar-hierro se vuelve ácida con la fermentación de la glucosa (aumentan los hidrogeniones), el ennegrecimiento suele observarse primero o está limitado allí, sobre todo con las bacterias no fermentadoras de lactosa (véase lámina en color 6-1E). Por consiguiente, una porción profunda negra debe leerse como ácida aun cuando el amarillo habitual sea oscurecido por el precipitado negro. El agar hierro de Kligler y el agar triple azúcar-hierro son menos sensibles en la detección de sulfuro de hidrógeno que otros medios que contienen hierro, como medio para motilidad del sulfuro indol (véase lámina en color 6-4B).

Si es posible excluir el microorganismo de las enterobacterias antes de establecer una serie extensa de pruebas bioquímicas, se ahorrará un tiempo y un trabajo considerables. Cuando se sospecha cepas de enterobacterias, se recomienda sembrar en forma simultánea en agar hierro de Kligler o en agar triple azúcar-hierro en pico de flauta al mismo tiempo que se implementan los medios de prueba diferenciales de los sistemas comerciales. Aun cuando se trate de un microorganismo fermentador y se sospeche que es una enterobacteria, se debe realizar una prueba de citocromo oxidasa para descartar otros géneros de bacterias fermentadoras, como especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella*, que son oxidasa positivos.

Selección de medios de aislamiento primario

Deben utilizarse medios de cultivo selectivos para aislar las especies importantes de bacterias de muestras que pueden albergar una mezcla de microorganismos. Para que la selección racional, los microbiólogos deben conocer la composición de cada fórmula y el objetivo y la concentración relativa de cada sustancia química o compuesto incluido. Por ejemplo, no es suficiente saber que se incluyen sales biliares en las fórmulas de algunos medios selectivos para inhibir el crecimiento de grampositivos y algunas de las especies de bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales. Por ejemplo, el agar para *Salmonella-Shigella* (SS) contiene cerca de cinco veces la concentración de sales biliares que el agar de MacConkey y es más inhibitorio de *E. coli* y más selectivo para la recuperación de especies de *Salmonella* de los coprocultivos.

Para recuperar enterobacterias de muestras clínicas que pueden albergar bacterias mixtas, hay tres tipos generales de medios: 1) medios no selectivos para el aislamiento primario (p. ej., agar sangre), 2) agares selectivos o diferenciales (p. ej., agares de MacConkey y entérico de Hektoen) y 3) caldos de enriquecimiento. En los cuadros 6-1 y 6-2 se comparan los medios más utilizados en la práctica clínica. Las fórmulas son complejas e incluyen ingredientes que no sólo inhiben el crecimiento de ciertas especies bacterianas (selectivos), sino que también detectan varias características bioquímicas de los microorganismos presentes en la muestra (diferencial).

Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios selectivos

En el recuadro 6-3 se enumeran los tipos generales de sustancias químicas y compuestos utilizados en medios selectivos, con breves comentarios sobre la función de cada uno de ellos.

Cuadro 6-1 Medios diferenciales selectivos para la recuperación de Enterobacteriaceae

MEDIO	FÓRMULA	OBJETIVO E INGREDIENTES DIFERENCIALES	REACCIONES E INTERPRETACIÓN
Agar de MacConkey (véase lámina en color 6-2A y B)	Peptona 17 g Polipeptona 3 g Lactosa 10 g Sales biliares 1.5 g Cloruro de sodio 5 g Agar 13.5 g Rojo neutro 0.03 g Violeta de genciana 0.001 g Agua destilada hasta pH final, 7.1	El agar de MacConkey es un medio de siembra diferencial para la selección y recuperación de Enterobacteriaceae y bacilos gramnegativos entéricos relacionados. Las sales biliares y el violeta de genciana inhiben el crecimiento de las bacterias grampositivas y algunas bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales. La lactosa es el único hidrato de carbono. Las bacterias que fermentan lactosa producen colonias de sombras variadas de rojo, debido a la conversión del colorante indicador rojo neutro (rojo por debajo de pH 6.8) a partir de la producción de ácidos mixtos. Las colonias de bacterias que no fermentan lactosa aparecen incolores o transparentes.	Los fermentadores fuertes típicos de la lactosa, como algunas especies de <i>Escherichia</i>, <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i>, producen colonias rojas rodeadas por una zona de bilis precipitada. Los fermentadores lentos o débiles de la lactosa, como <i>Citrobacter</i>, <i>Providencia</i>, <i>Serratia</i> y <i>Hafnia</i>, pueden permanecer incolores después de 24 h o ligeramente rosados en 24-48 h. Algunas especies de <i>Proteus</i>, <i>Edwardsiella</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>, con raras excepciones, producen colonias incolores o transparentes. En la lámina en color 6-2 se muestran colonias representativas que muestran estas reacciones diversas.
Agar eosina azul de metileno (EMB) (véase lámina en color 6-2C a F)	Peptona 10 g Lactosa 5 g Sacarosa* 5 g Dipotasio, PO ₄ 2 g Agar 13.5 g Eosina Y 0.4 g Azul de metileno 0.065 g Agua destilada hasta pH final, 7.2	El agar EMB es un medio de siembra diferencial que se puede utilizar en lugar del agar de MacConkey para el aislamiento o la detección de Enterobacteriaceae o bacilos coliformes relacionados a partir de muestras con bacterias mixtas. Los colorantes anilínicos (eosina y azul de metileno) inhiben a las bacterias grampositivas y gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales. Se combinan para formar un precipitado en pH ácido, lo que también sirve como indicadores de la producción de ácido. EMB de Levine, que sólo tiene lactosa, da reacciones más en paralelo con el agar de MacConkey; la fórmula modificada también detecta fermentadores de la sacarosa.	Las colonias fermentadoras fuertes típicas de la lactosa, en especial <i>Escherichia coli</i>, producen colonias negro verdosas con un brillo metálico. Los fermentadores débiles, que incluyen <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i> y <i>Hafnia</i>, producen colonias violáceas en 24-48 h. Los no fermentadores de lactosa, que incluyen <i>Proteus</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>, producen colonias transparentes. <i>Yersinia enterocolitica</i>, un fermentador de la sacarosa y no de la lactosa, produce colonias transparentes en EMB de Levine y colonias violáceas a negras en la fórmula modificada. Véase lámina en color 6-2.

* Fórmula de Holt-Harris-Teague modificada. La sacarosa no está contenida en el agar EMB de Levine.

Medios de aislamiento selectivos

En 1905 MacConkey²⁹⁷ describió por primera vez un medio diferencial selectivo (agar rojo neutro-sales biliares) que utilizó para aislar bacilos entéricos gramnegativos de muestras que contenían mezclas de especies bacterianas. Incorporó lactosa y el indicador rojo neutro en este medio con el fin de proporcionar un medio visual para detectar la utilización de lactosa por el microorganismo de prueba. En ese momento, todos los bacilos gramnegativos no esporulados se denominaban aún microorganismos entéricos; sin embargo, los microbiólogos habían reconocido que algunas especies eran más patógenas para el ser humano que otras. Los patrones de utilización de hidratos de carbono de varias especies de bacterias ya se conocían a principios del siglo XX y la fermentación de la lactosa, en particular, fue reconocida como un marcador importante para diferenciar ciertos patógenos entéricos. Holt-Harris y Teague²²⁷ describieron en 1916 un medio con eosina y azul de metileno como indicadores para diferenciar entre colonias fermentadoras de lactosa y no fermentadoras de lactosa. Se incluyó en el medio sacarosa para detectar a los miembros del

grupo coliforme que fermentan la sacarosa más fácilmente que la lactosa.

Los agares de MacConkey y eosina-azul de metileno son sólo moderadamente inhibidores y están ideados para evitar el crecimiento de las bacterias grampositivas en los cultivos mixtos. Se inhiben también muchas especies de microorganismos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales; sin embargo, todas las enterobacterias crecen bien. En el cuadro 6-1 se comparan las fórmulas, los ingredientes inhibidores y las características diferenciales clave para los agares de MacConkey y eosina-azul de metileno. Hace poco, los investigadores del Becton-Dickinson crearon una nueva fórmula de agar de MacConkey, MacConkey III, para mejorar la recuperación de enterobacterias sensibles al CO₂. Si bien se recomienda la incubación aerobia para el agar de MacConkey, en muchos laboratorios de microbiología clínica se incuban todas las placas primarias que incluyen agar de MacConkey en una estufa con 5% de CO₂ para mantener todas las placas juntas. El problema reside en que algunas cepas de enterobacterias no crecen o muestran inhibición parcial cuando son incubadas en CO₂ debido a una disminución en el pH del medio. En un estu-

Cuadro 6-2 Medios altamente selectivos para la recuperación de *Enterobacteriaceae* de muestras gastrointestinales

MEDIO	FÓRMULA	OBJETIVO E INGREDIENTES DIFERENCIALES	REACCIONES E INTERPRETACIÓN
Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	Extracto de vacuno 5 g Peptona 5 g Lactosa 10 g Sales biliares 8,5 g Citrato de sodio 8,5 g Tiosulfato de sodio 8,5 g Citrato férrico 1 g Agar 12,5 g Rojo neutro 0,025 g Verde brillante 0,033 g Agua destilada hasta pH final, 7,4	El agar SS es un medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos coliformes y permitir el crecimiento de especies de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> provenientes de muestras ambientales y clínicas. La alta concentración en sales biliares y el citrato de sodio inhiben todas las bacterias grampositivas y muchos microorganismos gramnegativos, incluidos los coliformes. La lactosa es el único hidrato de carbono y el rojo neutro es el indicador para la detección de ácido. Tiosulfato de sodio es una fuente de azufre. Cualquier bacteria que produzca gas sulfuro de hidrógeno es detectada por el precipitado negro formado con el citrato férrico (relativamente poco sensible). La alta sensibilidad del agar SS permite el uso de un inóculo importante.	Cualquier colonia que fermenta la lactosa que aparece adquiere color rojo por el rojo neutro. Algunas cepas raras de <i>Salmonella arizonae</i> son fermentadoras de la lactosa y las colonias pueden simular <i>Escherichia coli</i>. El crecimiento de especies de <i>Salmonella</i> no es inhibido y las colonias aparecen incolores con centros negros debido a la producción de gas sulfuro de hidrógeno. Algunas especies de <i>Shigella</i> muestran inhibición variable y colonias incolores sin ennegrecimiento. Algunas cepas móviles de <i>Proteus</i> que aparecen en el agar SS no se mueven hacia arriba.
Agar entérico de Hektoen (HE) (véase lámina en color 6-13E y F)	Peptona 12 g Extracto de levadura 3 g Sales biliares 9 g Lactosa 12 g Sucrosa 12 g Salicina 2 g Cloruro de sodio 5 g Tiosulfato de sodio 3 g Citrato amónico férrico 1,5 g Fucsina ácida 0,1 g Azul de timol 0,04 g Agar 14 g Agua destilada hasta pH final, 7,6	El agar HE es una fórmula reciente diseñada como medio de siembra directa para las muestras de materia fecal para aumentar el rendimiento de especies de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> a partir de la cantidad importante de flora normal. La alta concentración en sales biliares inhibe el crecimiento de todas las bacterias grampositivas y retarda el crecimiento de muchas cepas de coliformes. Se pueden producir ácidos a partir de los hidratos de carbono y la fucsina ácida que reacciona con el azul de timol produce un color amarillento cuando desciende el pH. El tiosulfato de sodio es una fuente de azufre y el gas sulfuro de hidrógeno es detectado por el citrato de amonio férrico (relativamente sensible).	Los fermentadores rápidos de lactosa (como <i>E. coli</i>) son inhibidos moderadamente y producen colonias desde amarilladas brillantes hasta rosa salmón. Algunas colonias de <i>Salmonella</i> son verde azuladas, típicamente con centros negros por el gas sulfuro de hidrógeno. <i>Shigella</i> aparece más verde que <i>Salmonella</i> y el color se borra hacia la periferia de la colonia. Algunas cepas de <i>Proteus</i> son algo inhibidas; las colonias que desarrollan son transparentes pequeñas y más brillantes o acuosas de aspecto que las especies de <i>Salmonella</i> o <i>Shigella</i>. Véase la lámina en color 6-3.
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (véase lámina en color 6-3A a D)	Xilosa 3,5 g Lisina 5 g Lactosa 7,5 g Sucrosa 7,5 g Cloruro de sodio 5 g Extracto de levadura 3 g Rojo fenol 0,08 g Agar 13,5 g Desoxicolato de sodio 2,5 g Tiosulfato de sodio 6,8 g Citrato amónico férrico 0,8 g Agua destilada hasta pH final, 7,4	El agar XLD es menos inhibitorio del crecimiento de las bacterias coliformes que el agar HE y fue ideado para detectar <i>Shigellas</i> en heces después del enriquecimiento en caldo para gramnegativos. Las sales biliares en concentración relativamente baja convierten a este medio en menos selectivo que los otros dos incluidos en este cuadro. Existen tres hidratos de carbono para la producción de ácido y el rojo fenol es el indicador del pH. Los microorganismos positivos para lisina, como la mayoría de las especies de <i>Salmonella</i>, producen colonias amarillentas iniciales a partir de la utilización de xilosa y colonias rojas retardadas a partir de la decarboxilación de lisina. El sistema de detección de sulfuro de hidrógeno es similar al del agar HE.	Los microorganismos como <i>E. coli</i> y algunas especies de <i>Klebsiella-Enterobacter</i> pueden utilizar más de un hidrato de carbono y producir colonias amarillas brillantes. Las colonias de muchas especies de <i>Proteus</i> también son amarillas. Casi todas las especies de <i>Salmonella</i> producen colonias rojas, la mayoría con centros negros por el gas sulfuro de hidrógeno. <i>Shigella</i>, <i>Providencia</i> y muchas especies de <i>Proteus</i> no utilizan ninguno de los hidratos de carbono y producen colonias translúcidas. Algunas colonias de <i>Citrobacter</i> son amarillentas con centros negros; muchas especies de <i>Proteus</i> son amarillentas o translúcidas con centros negros; las salmonelas son rojas con centros negros. Véase la lámina en color 6-3.

Recuadro 6-3 Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios selectivos

Hidrolizadas proteicas (p. ej., peptonas, infusión de carne, triptomas y caseína): las proteínas son escindidas por ácidos o enzimas en aminoácidos y péptidos que pueden ser utilizados por las bacterias para proveer el carbono y el nitrógeno necesarios para el metabolismo bacteriano.

Hidratos de carbono: distintos disacáridos (p. ej., lactosa, sacarosa y maltosa), hexosas (dextrosa) y pentosas (xilosa) se incluyen en medios selectivos con dos objetivos: 1) proveer fuentes preparadas de carbono para energía y 2) servir como sustratos en reacciones bioquímicas para la identificación de microorganismos desconocidos.

Buffers: se utilizan principalmente fosfatos monosódicos y disódicos o potásicos equilibrados. Los buffers proveen: 1) un pH estable para el crecimiento óptimo de los microorganismos y 2) un pH de referencia estándar para aquellos medios en los cuales se utilizan reacciones ácidas o alcalinas para identificar microorganismos.

Enriquecimientos (p. ej., sangre, sueros, suplementos vitamínicos y extractos de levaduras): se agregan suplementos de crecimiento a los medios para recuperar microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Los enriquecimientos se utilizan menos a menudo para la recuperación de enterobacterias porque la mayoría de los miembros de este grupo crecen sin ellos.

Inhibidores: distintos compuestos pueden servir para inhibir el crecimiento de ciertas especies bacterianas no deseadas, lo que convierte al medio en más selectivo: 1) colorantes anilínicos (p. ej., verde brillante y eosina), 2) metales pesados (p. ej., bismuto), 3) sustancias químicas (p. ej., ácido, citrato, desoxicolato, selenita y alcohol fenilético) y 4) agentes antibióticos (p. ej., neomicina, colistina, vancomicina y cloranfenicol). Sus concentraciones relativas son importantes para determinar la selectividad del medio en el cual están contenidos.

Indicadores de pH: la fucsina, el azul de metileno, el rojo neutro, el rojo fenol y el violeta de bromocresol son indicadores utilizados a menudo en los medios de prueba para medir los cambios de pH resultantes del metabolismo bacteriano de determinados sustratos.

Otros indicadores: se pueden incluir otros indicadores para detectar productos bacterianos específicos (p. ej., iones férricos y ferrosos para la detección de sulfuro de hidrógeno).

Otros compuestos y sustancias químicas: se usa comúnmente agar, un extracto gelatinoso de un alga roja que, en concentraciones variadas se agrega a un medio como agente solidificante. Se utilizan concentraciones de 1-2% para los medios de siembra; se utilizan concentraciones de 0,05-0,3% para los medios de motilidad semisólida, y se agregan pequeñas cantidades a los medios de caldo anaerobios para evitar las corrientes de convección y la penetración de oxígeno. Se agrega comúnmente tiosulfato de sodio para proveer una fuente de azufre.

dio se demostró que el medio de MacConkey III proporciona una mejor recuperación y un mayor tamaño de colonias, tanto cuando se incubaba con aire como con CO₂, en comparación con el agar de MacConkey.³⁷⁰

La decisión entre el uso de agar de MacConkey o agar eosina-azul de metileno depende en gran parte de la preferencia personal, porque las especies de bacterias que utilizan lactosa pueden diferenciarse con ambos. El agar de MacConkey contiene rojo neutro como indicador de pH y, en consecuencia, las colonias metabolizadoras de lactosa aparecen rosadas por la producción de ácidos mixtos (véase lámina en color 6-2A y B). Las bacterias productoras de ácidos fuertes, como *E. coli*, forman colonias rojo profundo con un precipitado rosado difuso en el agar que rodea las colonias causado por la precipitación de las sales biliares en el medio que ocurre con un pH bajo (véase lámina en color 6-2A). Las bacterias que producen ácidos más débiles forman colonias rosa claro o colonias que son más claras en la periferia y que tienen centros rosados, y el agar que rodea a las colonias se mantiene claro (véase lámina en color 6-1C). En agar eosina-azul de metileno, las bacterias productoras de ácidos fuertes forman colonias que tienen un brillo metálico (véase lámina en color 6-2C y D). La aparición del brillo, causada por la precipitación del colorante en las colonias, es muy sugestiva de *E. coli*, aunque otros productores de ácidos fuertes, como *Yersinia enterocolitica*, pueden tener un aspecto similar.

Medios de aislamiento de alta selectividad utilizados principalmente para muestras gastrointestinales

Los medios se convierten en altamente selectivos al agregar distintos inhibidores a sus fórmulas, en general en concentraciones mayores que en el agar de MacConkey o el agar eosina-azul de metileno. Estos medios se utilizan sobre todo para inhibir el crecimiento de *E. coli* y otros "coliformes", pero per-

miten que algunas especies de *Salmonella* y *Shigella* crezcan en las muestras de heces.

Se explican aquí varios medios selectivos formulados para su uso en laboratorios clínicos. Los más utilizados son agar para *Salmonella-Shigella* (SS), agar xilosa-lisina-desoxicolato y agar entérico de Hektoen, los cuales se describen en el cuadro 6-2.

La decisión de cuál de estos medios selectivos se usa para la recuperación de los patógenos entéricos de las heces depende tanto de la preferencia personal como de la especie por seleccionar. En general, estos medios se utilizan en el laboratorio clínico para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de heces diarreicas, o en laboratorios de salud pública para investigar la posible contaminación fecal de los suministros de alimentos y agua. Casi todas las especies de *Salmonella* crecen bien en presencia de sales biliares, lo cual explica por qué la vesícula biliar a menudo sirve como reservorio para portadores humanos. Se agregan sales biliares a los medios selectivos porque otras especies de bacilos entéricos, incluidas algunas de las cepas con requerimientos nutricionales más especiales de *Shigella*, crecen poco o nada. Los agares SS y entérico de Hektoen contienen concentraciones relativamente altas de sales biliares y están bien adaptados para la recuperación de especies de *Salmonella* de las muestras muy contaminadas por otros bacilos coliformes. Sin embargo, debido a su efecto inhibitorio sobre la recuperación de ciertas cepas de especies de *Shigella*, no se recomienda el uso sistemático de agar SS como medio selectivo único para el aislamiento de patógenos entéricos de muestras fecales.

El agar xilosa-lisina-desoxicolato contiene lactosa, sacarosa y xilosa;³⁷¹ por lo tanto, los microorganismos que fermentan estos hidratos de carbono forman colonias amarillas (véase lámina en color 6-3A). Las bacterias incapaces de fermentar estos hidratos de carbono no producen ácidos y forman colonias incoloras (véase lámina en color 6-3B). Los microorganismos

mos que producen sulfuro de hidrógeno forman pigmento negro que comienza en el centro de las colonias (véase lámina en color 6-3C). El agar xilosa-lisina-desoxicolato también contiene lisina. Esto es importante porque muchas especies de *Salmonella* fermentan la xilosa y, por consiguiente, inicialmente producen al principio colonias amarillas en agar xilosa-lisina-desoxicolato, pero como estas mismas especies también descarboxilan lisina, las colonias revierten a rosadas una vez que se consume la pequeña cantidad de xilosa en el medio. La lactosa y la sacarosa, agregadas en exceso, impiden que los coliformes lisina positivos reviertan en forma similar. Como la descarboxilación de lisina conduce a la formación de aminas fuertemente alcalinas, puede aparecer un halo rosa claro alrededor de las colonias en agar xilosa-lisina-desoxicolato (véase lámina en color 6-3C). Las colonias negras sin halo rosado son más sugestivas de una cepa productora de sulfuro de hidrógeno de las especies de *Proteus* (véase lámina en color 6-3D).

Los hidratos de carbono en agar entérico de Hektoen son lactosa, sacarosa y salicina.²⁶⁹ Los microorganismos capaces de fermentar estos hidratos de carbono también forman colonias amarillas (véase lámina en color 6-3E); las cepas asacarolíticas producen colonias translúcidas o verde claro (véase lámina en color 6-3F). Las bacterias lactosa negativas y sacarosa negativas que acidifican la salicina pueden producir colonias anaranjadas. El agar entérico de Hektoen también contiene sulfato férrico; por lo tanto, las colonias que producen sulfuro de hidrógeno aparecen negras. Los agares sulfito de bismuto y verde brillante son medios altamente selectivos que no se usan con frecuencia en los laboratorios clínicos. Es difícil prepararlos y su tiempo de conservación es muy corto (48 a 72 horas). Estos medios están ideados específicamente para recuperar *Salmonella typhi* de muestras de heces y son muy útiles cuando se evalúan muchos pacientes en áreas endémicas o durante una epidemia. Las especies de *Salmonella* (*S. typhi* en particular) pueden sospecharse en estos medios debido a la tendencia a producir colonias con un brillo negro.

Medios de enriquecimiento

Como su nombre lo indica, un medio de enriquecimiento se utiliza para aumentar el crecimiento de ciertas especies bacterianas mientras se inhibe el desarrollo de microorganismos no deseados. Se los suele utilizar en los laboratorios clínicos para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de heces. Los caldos de enriquecimiento son muy útiles para la recuperación de microorganismos de las heces de portadores de *Salmonella* o de pacientes con infecciones ligeras por *Shigella* en los cuales la cantidad de microorganismos puede ser tan sólo de 200 por gramo de heces. (*E. coli* y otros bacilos entéricos pueden alcanzar concentraciones masivas, de hasta 10^9 por gramo de heces).

Los medios de enriquecimiento funcionan sobre la base del principio de que *E. coli* y otros microorganismos gramnegativos, los cuales constituyen la flora fecal normal, se mantienen en una fase de retraso prolongada por las sustancias físicas inhibitorias en el caldo. Las especies de *Salmonella* y *Shigella* son mucho menos inhibidas, entran en una fase de crecimiento logarítmico y son más fáciles de aislar en las muestras fecales. Sin embargo, luego de varias horas los medios de enriquecimiento ya no suprimen el crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos entéricos, los cuales finalmente crecen más que el cultivo. Por lo tanto, para una recuperación máxima de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de materia fecal, se recomienda subcultivar el caldo de enriquecimiento dentro de las 8 horas.

Los dos medios de enriquecimiento más utilizados son caldo selenito y caldo para gramnegativos. El caldo selenito es más inhibitor del crecimiento de *E. coli* y otros bacilos gramnegativos entéricos que el caldo para gramnegativos; por consiguiente, se adapta mejor a la recuperación de especies de *Salmonella* o *Shigella* de muestras muy contaminadas, como heces o productos residuales. Sin embargo, el caldo para gramnegativos se utiliza más a menudo en los laboratorios clínicos porque es menos inhibitor del crecimiento de muchas de las cepas con requerimientos nutricionales muy especiales de especies de *Shigella*. El enriquecimiento de muestras de materia fecal en caldo para gramnegativos durante 4 a 6 horas y luego el subcultivo en agar entérico de Hektoen o agar xilosa-lisina-desoxicolato es la técnica óptima para la recuperación de especies de *Shigella* en los casos en que se sospecha disentería basilar. En el cuadro 6-3 se resumen las fórmulas y las características sobresalientes de estos dos medios de enriquecimiento.

Pautas para elegir medios de aislamiento selectivos

Los medios enumerados en los cuadros 6-1 a 6-3 y las distintas combinaciones en las cuales se pueden utilizar pueden ser algo confusos. La siguiente es una guía para seleccionar medios que puedan ser óptimos en la recuperación de las enterobacterias de muestras clínicas.

Para muestras diferentes de heces o hisopados rectales, suele ser suficiente una combinación de agar de MacConkey o agar eosina-azul de metileno y agar sangre. Por lo general no se requieren medios con mayores propiedades inhibitorias porque la diversidad de flora comensal o de microorganismos contaminantes es relativamente baja en la mayoría de las muestras no entéricas. Se puede realizar un subcultivo hasta un medio más inhibitor en los casos en que se considere necesario.

Para las muestras fecales o los hisopados rectales, se debe seleccionar sólo un medio para cada uno de los grupos enumerados en los cuadros 6-1 y 6-2. Se sugiere el enfoque señalado en el recuadro 6-4.

Características de las pruebas de identificación diferencial

Si bien es posible una identificación preliminar de las enterobacterias sobre la base de las características de las colonias y las reacciones bioquímicas en los medios de aislamiento primario, una identificación mejor de las especies requiere la determinación de características fenotípicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad singular del microorganismo por evaluar. El objetivo de esta explicación es revisar los elementos sobresalientes de las pruebas que miden estas características fenotípicas y que se utilizan en forma habitual en los laboratorios clínicos. Esta orientación es necesaria para que el personal del laboratorio adquiera un conocimiento fundamental de los principios subyacentes a estos procedimientos con el fin de reconocer y corregir cualquier incongruencia bioquímica, problemas con los cultivos mixtos o técnicas defectuosas. No es posible explicar las distintas pruebas diferenciales y los numerosos esquemas disponibles para la identificación final de las enterobacterias. Sin embargo, varias de las pruebas más utilizadas en los laboratorios clínicos para medir las características metabólicas por medio de las cuales se pueden identificar todas las especies de enterobacterias salvo algunas raras o atípicas se enumeran en el recuadro 6-5. Ya se ha explicado la utilización de hidratos de carbono y la actividad de ONPG.

Cuadro 6-3 Caldos de enriquecimiento para la recuperación de Enterobacteriaceae				
CALDO	FÓRMULA		OBJETIVO E INGREDIENTES DIFERENCIALES	REACCIONES E INTERPRETACIÓN
Caldo de selenita	Peptona	5 g	Se recomienda el caldo de selenita F para el aislamiento de salmonelas de las muestras —como heces, orina o desechos— que tienen concentraciones importantes de bacterias mixtas	Algunas horas después de la inoculación con la muestra, el caldo se vuelve turbio. Como los coliformes u otra flora intestinal pueden crecer más que los patógenos en algunas horas, se recomienda subcultivar en agar para <i>Salmonella-Shigella</i> (SS) o sulfito de bismuto en 8 a 12 h.
	Lactosa	4 g		
	Selenita sódica	4 g	La selenita sódica es inhibidora de <i>Escherichia coli</i> y de otros bacilos coliformes, incluidas muchas cepas de <i>Shigella</i>	El sobrecalentamiento del caldo durante la preparación puede producir un precipitado visible, lo que lo vuelve insatisfactorio para el uso.
	Fosfato sódico	10 g		
	Agua destilada hasta pH final, 7.0	1 L	El medio funciona mejor en condiciones anaerobias y se recomienda una profundidad de vertido de como mínimo 5 cm	
Caldo para gramnegativos	Peptona de polipeptona	20 g	Debido a la concentración relativamente baja de desoxicolato, el caldo para gramnegativos es un pobre inhibidor de <i>E. coli</i> y otros coliformes. La mayoría de las cepas de <i>Shigella</i> crecen bien. El desoxicolato y el citrato son inhibidores de las bacterias grampositivas	El caldo para gramnegativos está ideado para la recuperación de especies de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> cuando están en pequeñas cantidades en muestras de materia fecal.
	Glucosa	1 g		
	D-manitol	2 g		
	Citrato de sodio	5 g		
	Desoxicolato de sodio	0.5 g		
	Fosfato dipotásico	4 g	La concentración elevada de manitol sobre la glucosa limita el crecimiento de algunas especies de <i>Proteus</i> , no obstante estimula el crecimiento de especies de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> , ambas capaces de fermentar el manitol	El caldo puede volverse turbio en 4 a 6 horas de la inoculación, y se recomienda el subcultivo en agar para entéricos de Hektoen o agar XLD dentro del mismo período
	Fosfato monopotásico	1.5 g		
	Cloruro de sodio	5 g		
	Agua destilada hasta pH final, 7.0	1 L		

Producción de indol

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa pueden escindir el triptófano y producir así indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol puede detectarse en el medio de prueba del triptófano observando el desarrollo de un color rojo después de agregar una solución que contiene *p*-dimetilaminobenzaldehído (p. ej., reactivo de Ehrlich o de Kovac). La bioquímica y los detalles de la prueba del indol

se esquematizan en la figura 6-5 y el protocolo 1-4, respectivamente y en la lámina en color 6-4C se muestra una reproducción.

La elección entre los reactivos de Ehrlich y de Kovac depende de la preferencia personal. El reactivo de Ehrlich es más sensible y es el preferido cuando se evalúan bacilos no fermentadores o anaerobios en los cuales la producción de indol es mínima. Como el indol es soluble en compuestos orgánicos, se debe agregar xileno o cloroformo al medio de prueba antes de agregar el reactivo de Ehrlich. Este paso de extracción es menos crítico para el reactivo de Kovac porque se utiliza alcohol amílico como diluyente (se utiliza alcohol etílico con reactivo de Ehrlich).

Recuadro 6-4 Selección de un medio para muestras fecales o hisopado rectal

1. Inocular la muestra directamente en la placa de agar de MacConkey o de agar EMB para el aislamiento primario de todas las especies de bacilos gramnegativos entéricos
2. Inocular directamente una placa de agar XLD o HE para la detección selectiva de especies de *Salmonella* o *Shigella*
3. Enriquecer una pequeña porción de la muestra con una inoculación importante de caldo de selenita o para gramnegativos. Si se utiliza selenita, subcultivar en agar HE dentro de las 8 a 12 horas; si se utiliza caldo para gramnegativos, subcultivar dentro de las 4 horas.
Observación: en nuestro laboratorio este paso no se realiza en forma sistemática a menos que se haga el cribado de pacientes asintomáticos para la presencia de un estado de portador
4. Incubar todos los cultivos de placas a 35 °C durante 24 a 48 horas. Seleccionar las colonias sospechosas para la prueba bioquímica o serológica definitiva

Recuadro 6-5 Pruebas utilizadas para medir las características metabólicas de Enterobacteriaceae

- Utilización de hidratos de carbono
- Actividad de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG)
- Producción de indol
- Rojo de metilo
- Prueba de Voges-Proskauer (producción de acetilmetilcarbinol [acetoina])
- Utilización de citrato
- Producción de ureasa
- Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina
- Producción de fenilalanina desaminasa
- Producción de sulfuro de hidrógeno
- Motilidad

Prueba del rojo de metilo

En la figura 6-2 se ilustra un esquema simplificado que muestra sólo dos vías alternativas (ácido mixto y butilenglicol) para el metabolismo del piruvato formado a partir de la fermentación de la glucosa. Las bacterias que siguen fundamentalmente la vía de fermentación ácida mixta producen a menudo el ácido suficiente como para mantener el pH por debajo de 4,4 (el valor crítico de color de ácido del indicador de rojo de metilo). La prueba del rojo de metilo proporciona una característica útil para identificar especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de la glucosa.

En el protocolo 6-3 se muestran los detalles de la prueba del rojo de metilo. La prueba, según su descripción original, requiere 48 a 72 horas de incubación antes de obtener un resultado válido, tiempo inaceptable para la mayoría de los laboratorios de microbiología. Barry y cols.³⁰ describieron una modificación que se puede leer en 18 a 24 horas. Se utiliza una alícuota de 0,5 mL de caldo con un inóculo relativamente importante del microorganismo de prueba. Se agregan una o dos gotas de reactivo de rojo de metilo después de 18 a 24 horas de incubación a 35 °C y la aparición del color rojo indica una prueba positiva (véase lámina en color 6-4C). La modificación de Barry es tan precisa como la prueba original y ahorra un tiempo considerable.

Prueba de Voges-Proskauer

Los detalles de la prueba de Voges-Proskauer, que se muestran en el protocolo 6-4, se basan en la conversión del acetilmetilcarbinol (acetoina) en diacetilo a través de la acción de hidróxido de sodio y oxígeno atmosférico. El diacetilo se convierte en un complejo rojo bajo la acción catalítica de α -naftol y creatina (véase lámina en color 6-4D).

Obsérvese, en la figura 6-2, que la formación de acetoina y butilenglicol es una vía alternativa para el metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias que utilizan esta vía, como ciertas cepas dentro del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*, producen sólo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que pueden ser insuficientes para descender el pH del medio de rojo de metilo lo suficiente como para producir un cambio de color. En consecuencia, la mayoría de las especies de enterobacterias Voges-Proskauer positivas, con raras excepciones, son rojo de metilo negativas y viceversa (véase lámina en color 6-4C y D).

Utilización de citrato

El principio de la prueba de utilización de citrato (protocolo 6-5) es determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y crecimiento. La fórmula original, descrita por Koser² en 1923, era un medio de caldo que contenía fosfato amónico sódico, fosfato monopotásico, sulfato de magnesio y citrato de sodio. Se omitieron las proteínas y los hidratos de carbono como fuentes de carbono y nitrógeno. El parámetro de evaluación de la prueba de Koser era la presencia o ausencia de turbidez visible después de la incubación del microorganismo de prueba; este parámetro en realidad era una medida de la capacidad del microorganismo para utilizar carbono a partir del citrato de sodio para producir el crecimiento suficiente como para volverse visible. Sin embargo, pronto se reconoció que podría ocurrir una turbidez inespecífica en el medio de Koser. Simmons⁴³⁰ resolvió este problema agregando agar y azul de

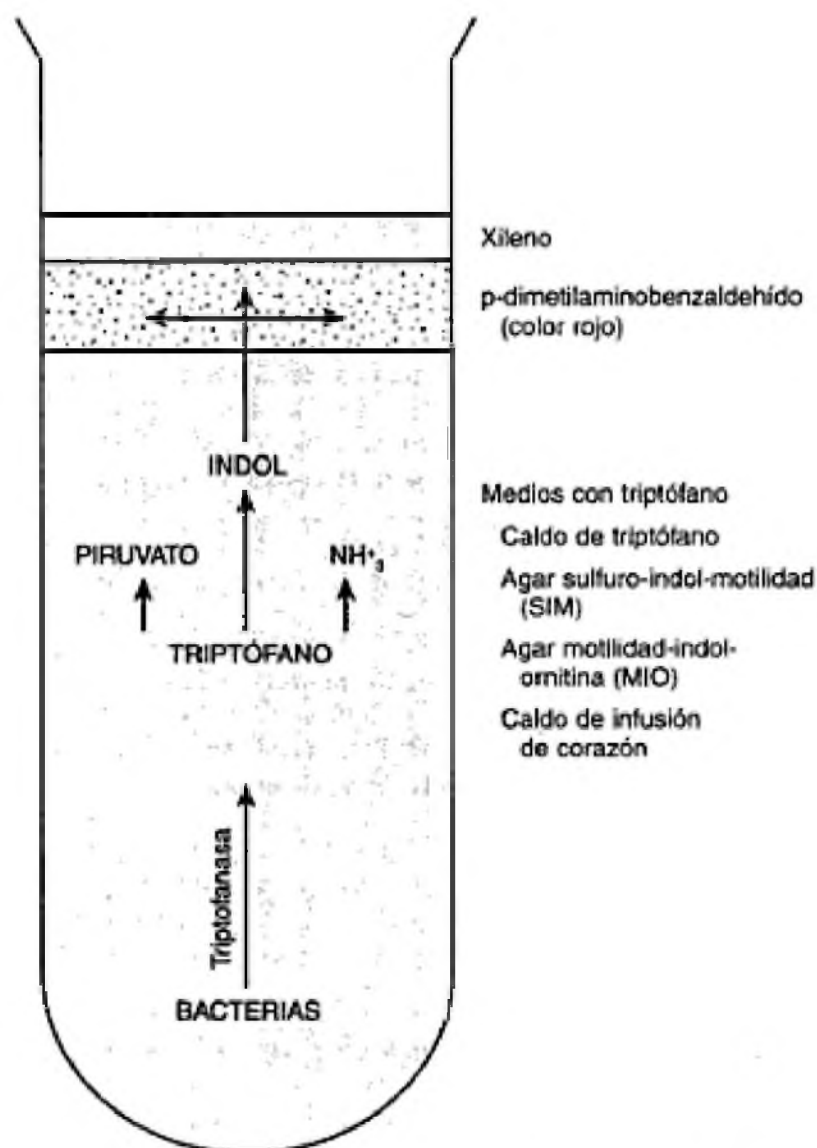


Figura 6-5 Formación de indol por las bacterias productoras de triptofanasa que crecen en un medio de cultivo que contiene triptófano. El indol es uno de los productos inmediatos de degradación (además del ácido pirúvico y el amoníaco) como resultado de la desaminación del triptófano. Puede ser extraído de la fase acuosa del medio por el cloroformo y detectado por el agregado de reactivo de Ehrlich (dimetilaminobenzaldehído).

bromotimol a la fórmula de Koser, lo que proporcionó un parámetro de color más sensible. Se vierte en un tubo de ensayo e inclina el medio de agar citrato de Simmons. Se siembra en estría un pequeño inóculo de una colonia de crecimiento del microorganismo de prueba en la superficie de la porción inclinada de agar. Cuando el inóculo es demasiado grande, los compuestos orgánicos preformados dentro de las paredes celulares de las bacterias moribundas pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno como para producir un resultado falso positivo en la prueba. Cuando se inocula una serie de tubos de medios de cultivo diferencial con un microorganismo desconocido, es importante sembrar en estría primero el medio de citrato para evitar el traspaso de proteínas o hidratos de carbono desde los otros medios.

La producción de un color azul en el medio de prueba después de 24 horas de incubación a 35 °C indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo en la prueba de utilización de citrato (véase lámina en color 6-4D). Si se utiliza carbono del citrato de sodio, también se extrae hidrógeno del fosfato de amonio contenido en el medio y se libera amoníaco.

En ocasiones, se detecta un crecimiento visible a lo largo de la línea de siembra en estría antes de la conversión del medio a un color azul. Este crecimiento visible también indica un resultado positivo de la prueba. Malonato, acetato y mucato son otros radicales aniónicos utilizados con frecuencia con el fin de determinar la capacidad de las bacterias para utilizar estos compuestos simples como única fuente de carbono.

En otra época los sanitaristas y epidemiólogos utilizaban el acrónimo IMViC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato) para referirse a las pruebas necesarias para detectar la contaminación fecal de los alimentos y el agua. Los funcionarios de salud pública han utilizado durante muchos años a *Escherichia coli* para indicar contaminación fecal. *Enterobacter aerogenes* produce colonias en medios de aislamiento primario que a menudo no pueden ser distinguidas de *E. coli*. Sin embargo, el aislamiento de *E. aerogenes* de alimentos y agua potable no siempre significa contaminación fecal porque el microorganismo está difundido en el suelo, los pastos y la materia vegetativa. Por consiguiente, es necesario un conjunto de características bioquímicas para diferenciar los dos microorganismos. Las pruebas IMViC fueron adoptadas para cumplir este objetivo. La mayoría de las cepas de *E. coli* son indol positivas y rojo de metilo positivas, y las de Voges-Proskauer y citrato son negativas. En condiciones típicas, *E. aerogenes* produce exactamente reacciones opuestas (véase lámina en color 6-4C y D). Si bien las características individuales incluidas en la serie IMViC se siguen utilizando en los sistemas de identificación bacteriana, se emplean pocas veces como conjunto de pruebas específicas.

En vista de la complejidad de diferenciar más de 100 especies de enterobacterias que se presentan en la próxima sección, cabe hacer notar que existió una época en la cual las principales decisiones en microbiología eran relativamente simples y se podían tomar sólo sobre la base de cuatro pruebas bioquímicas de fácil realización.

Producción de ureasa

Los microorganismos que tienen la enzima ureasa hidrolizan la urea, liberan amoníaco y producen un cambio de color rojoroso en el medio (véase lámina en color 6-4E). En el protocolo 6-6 se detalla la prueba de ureasa.

Se deben señalar importantes diferencias entre el caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen. El caldo de Stuart tiene muchos buffers de sales de fosfato a pH de 6,8. El microorganismo de prueba debe formar cantidades bastante grandes de amoníaco antes de que el sistema buffer se vea superado y el pH del medio se eleve por encima de 8,0 para producir un cambio de color en el indicador. Por lo tanto, es un caldo casi selectivo para especies de *Proteus*.

El agar urea de Christensen¹¹³ tiene menos buffers que el caldo urea de Stuart y contiene peptonas y glucosa. Este medio enriquecido favorece el crecimiento de muchas especies de bacterias que no pueden desarrollarse en el caldo de Stuart, y la menor capacidad de amortiguación permite la detección de cantidades menores de amoníaco. Los microorganismos que producen menos ureasa, como ciertas especies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Brucella* y *Bordetella bronchiseptica*, pueden ser evaluados con agar urea de Christensen. Para muchas de estas especies, una reacción de ureasa positiva se detecta primero como un cambio de color rosa a rojo en la porción inclinada del agar (véase lámina en color 6-4E). El pico de flauta vira al principio al rojo porque la reacción alcalina, que resulta del desdoblamiento de pequeñas cantidades de urea, aumenta por las

aminas formadas por la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos en la porción expuesta al aire del medio.

Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina

Muchas especies de bacterias tienen enzimas capaces de descarboxilar aminoácidos específicos en el medio de prueba. Las enzimas descarboxilasas eliminan una molécula de CO₂ de un aminoácido para formar aminas de reacción alcalina. Los siguientes son los aminoácidos evaluados más a menudo y sus productos de degradación de las aminas.

Lisina → cadaverina

Ornitina → putrescina

Arginina → citrulina

Se describieron algunos sistemas de prueba para medir esta propiedad, sobre la base de la detección de un cambio alcalino del pH en el medio de prueba o la medición directa de los productos de reacción. Por ejemplo, se pueden detectar aminas resultantes de la reacción de descarboxilación con el reactivo Ninhydrin[®] después de la extracción del cultivo en caldo con cloroformo. Ésta es la reacción Carlquist relativamente sensible,¹¹⁷ utilizada más a menudo para detectar la actividad de descarboxilasa débil de muchos de los bacilos gramnegativos no fermentadores y ciertas especies de bacterias anaerobias.

La actividad de descarboxilasa de las enterobacterias se mide principalmente en los laboratorios de microbiología clínica con caldo de descarboxilasa de Møller.¹²⁸ En el protocolo 6-7 se muestran los detalles de esta prueba. El parámetro de la reacción es la producción de un cambio alcalino de pH en el medio y el desarrollo de color violeta azulado después de la incubación con el microorganismo de prueba (véase lámina en color 6-4F). Obsérvese en la fórmula de Møller incluida en el protocolo 6-7, que el medio se encuentra amortiguado a pH 6,0. Esto es más ácido que la mayoría de los medios de cultivo. Este pH bajo es necesario porque las enzimas descarboxilasas no son óptimamente activas hasta que el pH del medio cae por debajo de 5,5. La caída desde 6,0 hasta 5,5 es el resultado de las bacterias en crecimiento que metabolizan la pequeña cantidad de glucosa en el medio para producir ácidos mixtos. Siempre se debe incluir un tubo control, desprovisto de aminoácidos cuando se realiza la prueba de descarboxilasa para verificar que ha ocurrido esta caída inicial en el pH. Un cambio de color amarillo en el indicador violeta del bromocresol del tubo de control muestra acidificación. El piridoxal fosfato está incluido en el medio y actúa como coenzima para aumentar más la actividad de descarboxilasa.

Muchos microbiólogos prefieren el caldo lisina de Falkow¹⁶² al medio de Møller porque la prueba de Falkow depende sólo del cambio alcalino en el indicador de pH, y no se requiere un ambiente anaerobio ni ácido. Sin embargo, no se puede utilizar este medio para detectar actividad de lisina descarboxilasa en ciertos miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*, los cuales producen acetilmetilcarbinol, que interfiere en el cambio alcalino final del pH y conduce a interpretaciones falsas negativas. Las modificaciones de este medio forman la base del agar semisólido indol-ornitina (MIO) para motilidad¹⁴⁸ utilizado en laboratorios de microbiología clínica. También se describen métodos rápidos para detectar actividad de ornitina¹⁷¹ y lisina¹⁶⁰ descarboxilasa en miembros de las enterobacterias.

Edwards y Fife⁽⁵⁰⁾ describieron un medio sólido de lisina descarboxilasa basado sobre la fórmula de Falkow, que incluye citrato amónico férrico y tiosulfato para la detección de sulfuro de hidrógeno. Este medio es agar hierro-lisina (LIA), utilizado en muchos laboratorios como auxiliar para la identificación de especies de *Salmonella*, la mayoría de las cuales son tanto sulfuro de hidrógeno positivas como lisina descarboxilasa positivas. Una porción profunda negra y un pico de flauta violeta con LIA son prácticamente indicativos de especies de *Salmonella*. Otra ventaja de LIA es que algunas especies de *Proteus* y *Providencia*, ambas de las cuales desaminan los aminoácidos en lugar de descarboxilarlos, pueden ser detectadas por la aparición de un color rojo en el pico de flauta (véase lámina en color 6-4G).

La prueba de lisina-descarboxilasa es útil para diferenciar especies de *Citrobacter lactosa* negativas (0% positivas) de especies de *Salmonella* (98% positivas). Casi todas las cepas de *Shigella sonnei* (más del 98%) tienen actividad de ornitina descarboxilasa, mientras que sólo algunas cepas de *S. boydii* (2,5%) muestran esta actividad; *S. dysenteriae* y *S. flexneri* son ornitina negativas. Tal vez la prueba de ornitina descarboxilasa sea más útil para diferenciar algunas especies de *Klebsiella* (la mayoría de las especies son negativas) de las especies de *Enterobacter* (la mayoría de las cepas son positivas).

Producción de fenilalanina desaminasa

La determinación de fenilalanina desaminasa es útil para la diferenciación inicial de especies de *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* de otros bacilos gramnegativos. Sólo miembros de estos géneros y algunos aislados relativamente raros del grupo *Enterobacter* tienen la enzima responsable de la desaminación oxidativa de fenilalanina. La prueba se realiza fácilmente, como se señaló en el protocolo 6-8. Se puede detectar ácido fenilpirúvico tan sólo en 4 horas si se utiliza un inóculo importante; sin embargo, en general se recomiendan 18 a 24 horas de incubación. El medio de prueba de fenilalanina utiliza extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno. Los extractos de carne o los hidrolizados proteicos contienen cantidades variadas de fenilalanina de producción natural que pueden conducir a resultados incongruentes. La aparición de un color verde luego del agregado de un reactivo de cloruro férrico es inmediata y fácil de visualizar (véase lámina en color 6-4E).

Producción de sulfuro de hidrógeno

La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de los aminoácidos que contienen azufre u otros compuestos en forma de H_2S es una característica importante para su identificación. Los medios más utilizados para la detección de H_2S y las fuentes de azufre y los indicadores de sulfuro se enumeran en el cuadro 6-4. En el recuadro 6-6 se menciona la secuencia de pasos que conduce a la producción y detección de H_2S .

Las diferencias para detectar la producción de H_2S en los diferentes medios son el resultado de una alteración en una o más de estas condiciones. El H_2S detectado en un medio puede no ser detectado en otro, y es necesario conocer el sistema de prueba utilizado cuando se interpretan protocolos de identificación. El medio SIM es más sensible que KIA para la detección de H_2S , debido tal vez a la consistencia semisólida de KIA, la ausencia de hidratos de carbono para suprimir la formación de H_2S y el uso de hierro peptonizado como indicador (véase lámina en color 6-4B). Por otro lado, el KIA es más sensible que el agar triple azúcar-hierro porque se cree que la sacarosa suprime los mecanismos enzimáticos responsables de la producción de H_2S . El acetato de plomo es el indicador más sensible y debe emplearse siempre que se evalúen bacterias que producen sólo pequeñas cantidades de H_2S . Lamentablemente, cuando se incorpora acetato de plomo en medios de cultivo, también inhibe el crecimiento de muchas bacterias con requerimientos nutricionales especiales, sobre todo las que pueden requerir un sistema de detección sensible. Estos microorganismos pueden ser evaluados para la producción de H_2S colocando una tira de papel de filtro impregnada en acetato de plomo debajo de la tapa de un tubo de cultivo con medio KIA. Así, es posible utilizar la extrema sensibilidad del indicador de acetato de plomo sin incorporarlo en forma directa en el medio.

Con todos los sistemas de detección de H_2S , el parámetro es un sulfuro insoluble de un metal pesado, que produce un precipitado negro en el medio o en la tira de papel de filtro. Como debe haber iones hidrógenos disponibles para la formación de H_2S , el emblanquecimiento se observa primero en los medios de prueba en los cuales la formación de ácido es máxima, es decir, a lo largo de la línea de inoculación, dentro de las profundidades de los medios de agar inclinado o en los centros de las colonias que crecen sobre las superficies de agar.

Cuadro 6-4 Medios para la detección de sulfuro de hidrógeno (H_2S)

MEDIOS	FUENTE DE AZUFRE	INDICADOR DE H_2S
Sulfito de bismuto	Peptonas más sulfito	Sulfato ferroso
Agar citrato sulfito	Tiosulfato de sodio	Citrato amónico férrico
Agar desoxicolato citrato	Peptonas	Citrato férrico
Agar lisina hierro	Tiosulfato de sodio	Citrato amónico férrico
Agar hierro de Kligler	Tiosulfato de sodio	Sulfato ferroso
Agar hierro triple azúcar	Tiosulfato de sodio	Sulfato ferroso
Agar plomo acetato	Tiosulfato de sodio	Acetato de plomo
Agar para <i>Salmonella-Shigella</i>	Tiosulfato de sodio	Citrato férrico
Medio de sulfito-indol-motilidad	Tiosulfato de sodio	Hierro peptonizado
Xilosa-lisina-desoxicolato o entérico de Hektoen	Tiosulfato de sodio	Citrato amónico férrico

Recuadro 6-6 Cómo se produce H_2S

1. Liberación de sulfuro a partir de la cisteína o disulfuro por la acción enzimática bacteriana
2. Acoplamiento de sulfuro (S^{2-}) con un ión hidrógeno (H^+) para formar H_2S
3. Detención de H_2S por hierro, bismuto o plomo para producir sulfuros insolubles de metales pesados que aparecen como un precipitado negro

Motilidad

La motilidad bacteriana es otro determinante importante para la identificación final de una especie. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varían entre las especies. Existen tinciones flagelares para esta determinación (véase cap. 7).

La motilidad bacteriana se puede observar colocando una gota de medio de caldo de cultivo en un portaobjetos microscópico y observándola directamente con un microscopio. Existen cámaras colgantes para gotas donde es posible ver el preparado con mayor aumento sin el peligro de descender los objetivos sobre la gota contaminada. Esta técnica se utiliza sobre todo para detectar la motilidad de las especies de bacterias que no crecen bien en medios de agar semisólido. Sin embargo, las enterobacterias crecen bien y se utilizan más comúnmente tubos que contienen agar semisólido.

Los medios para motilidad tienen concentraciones de agar de 0,4% o menores. Con concentraciones mayores, el gel es demasiado firme como para permitir que los microorganismos se dispersen con libertad. Los medios combinados, como el SIM¹⁴⁹ o el agar MIO,¹⁴⁸ tienen un uso amplio en los laboratorios de microbiología clínica porque se puede medir más de una característica en el mismo tubo. Se debe interpretar primero la prueba de motilidad porque el agregado de un reactivo de indol puede oscurecer los resultados. Como el medio SIM y el agar MIO tienen un fondo ligeramente turbio, las interpretaciones pueden ser difíciles con especies bacterianas que crecen lentamente en estos medios. En estos casos, se recomienda un medio para prueba de motilidad (recuadro 6-7) porque sostiene el crecimiento de la mayoría de las bacterias con requerimientos nutricionales especiales y tiene un aspecto claro como el cristal.

La prueba de motilidad se interpreta haciendo un examen macroscópico del medio para una zona difusa de crecimiento que se propaga desde la línea de inoculación (véase lámina en color 6-4H). Se han recomendado las sales de tetrazolio en un medio para motilidad como auxiliar para la detección visual del crecimiento bacteriano. Estas sales son incoloras pero son convertidas en complejos de formazán rojo insolubles por las propiedades reductoras de las bacterias en crecimiento. En un medio de prueba para motilidad que contiene tetrazolio, la aparición del color rojo ayuda a rastrear la propagación de bacterias desde la línea de inoculación. Sin embargo, estas sales pue-

den inhibir ciertas bacterias con requerimientos nutricionales especiales y no se pueden utilizar en todos los casos. Entre las enterobacterias, algunas especies de *Shigella* y *Klebsiella* son uniformemente inmóviles. La mayoría de las especies móviles de enterobacterias pueden detectarse a 35 °C; sin embargo, *Yersinia enterocolitica*, en la cual las proteínas flagelares se desarrollan más rápidamente a temperaturas inferiores, es móvil a 22 °C (temperatura ambiente) pero no a 35 °C. *Listeria monocytogenes* es otra especie bacteriana que requiere incubación a temperatura ambiente antes de que desarrolle motilidad. *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganismo que sólo crece bien en presencia de oxígeno, produce una película de propagación sobre la superficie de agar para motilidad y no muestra la extensión en abanico característica desde la línea de inoculación porque no crece en las porciones más profundas deficientes de oxígeno del tubo.

Taxonomía de Enterobacteriaceae

La aplicación de nuevas tecnologías al estudio de la taxonomía de los microorganismos ha conducido a un rápido aumento en la cantidad de géneros y especies de bacterias que se ajustan a los criterios generales de las enterobacterias. En 1972, Edwards y Ewing¹⁴⁹ describieron 11 géneros y 26 especies pertenecientes a las enterobacterias. En 1985, Farmer y cols.¹⁴⁸ describieron 22 géneros que comprendían 69 especies y 29 grupos entéricos. En este capítulo se describen 31 géneros y 139 especies, biogrupos y grupos entéricos sin nombre de enterobacterias.

Clasificación de Enterobacteriaceae por tribus

La división de las enterobacterias en tribus no se utiliza en la edición actual del *Manual de Bergey* ni en la clasificación de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) porque los autores creen que el uso de tribus carece de importancia diagnóstica y tiene una importancia taxonómica cuestionable. Este argumento es válido desde la perspectiva de la clasificación pura. No obstante, para los lectores de este libro que son nuevos en el campo de la microbiología y que deben orientarse en las complejas y confusas enterobacterias, el concepto de tribu propuesto por Ewing¹⁵⁷ tiene ciertas ventajas para la enseñanza y el aprendizaje. Estamos de acuerdo con Ewing en que su esquema, si bien imperfecto, representa un buen compromiso entre las taxonomías práctica e ideal.

El concepto de tribu proporelona a los estudiantes y a los profesionales un método conveniente para agrupar los principales géneros dentro de la familia que comparten reacciones bioquímicas similares y que tienen una importancia diagnóstica similar. Creemos conveniente que los microbiólogos en ejercicio mantengan una base firme de conocimiento apoyada en la morfología, la fisiología y la bioquímica de las bacterias de importancia médica. Además, es necesario memorizar ciertos patrones fenotípicos que permiten el fácil subagrupamiento y la reunión de especies relacionadas. Esta orientación es muy importante cuando los microbiólogos utilizan sistemas comerciales semiautomáticos y automáticos con identificación computarizada, porque sirve como control de calidad para validar la información generada por los instrumentos. El concepto de tribu como criterio para aprender las enterobacterias cumple bien estos objetivos y es el abordaje elegido en este libro para enseñar las características clave de los géneros establecidos de las enterobacterias. En el cuadro 6-5 se mencionan las especies actuales incluidas en los géneros establecidos.

Recuadro 6-7 Medio de prueba para motilidad (Edwards y Ewing)

Extracto de carne vacuna, 3 g	Agar, 4 g
Peptona, 10 g	Agua destilada hasta igualar 1 L
Cloruro de sodio, 5 g	pH final, 7,3

Cuadro 6-5 Cambios recientes importantes en los géneros establecidos de enterobacterias

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
Tribu I: Escherichieae <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> inactiva <i>Escherichia albertii</i> <i>Escherichia blattae</i> <i>Escherichia fergusonii</i> <i>Escherichia hermannii</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Shigella</i>	 Alkalescens-Dispar Nuevas especies Grupo entérico 10 Grupo entérico 11 Grupo entérico 1 Grupo API 2 Grupo Alma 1	Sorbitol (+) excepto para serotipo O157:H7. Todas las otras especies son sorbitol (-) Anerógenas, lactosa-negativas (o tardías) e inmóviles Asociadas con enfermedad diarreica en los niños de Bangladesh. Indol negativa, fermenta el D-manitol pero no la D-xilosa. Separada de <i>E. alvei</i> por prueba de VP negativa No se encuentra en muestras humanas Aislada en heces de cucarachas Se encuentra en sangre, orina y heces. Indol (+), Sorbitol (-), LAO (+,-,+), lactosa (-), pero ONPG (+) Las heridas y las heces son las muestras más frecuentes. Con pigmento amarillo, indol (+), sorbitol (-), LAO (-,-,+) La mayoría de las cepas provienen de heridas humanas. Más del 50% de las cepas tienen un pigmento amarillo Las cuatro especies de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> forman una única especie sobre la base de hibridación del DNA. <i>S. dysenteriae</i> (grupo A), <i>S. flexneri</i> (grupo B), y <i>S. boydii</i> (grupo C) son bioquímicamente similares y deben ser separadas mediante métodos serológicos. <i>S. sonnei</i> es ornitina (+)
Tribu II: Edwardsiellae <i>Edwardsiella ictaluri</i> <i>Edwardsiella ictaluri</i> biogrupo I <i>Edwardsiella hortorum</i> <i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Edwardsiella anguillimortifera</i> Grupo Arakusa 	Producen indol y abundante H ₂ S, fermentan la glucosa y la maltosa pero no manitol, lactosa, sacarosa ni arabinosa. Se encuentran en animales de sangre fría Patógeno humano oportunista. Puede producir infecciones de las heridas y diarrea Indol (+), H ₂ S (-), manitol, sacarosa y arabinosa (+). Se encuentra en víboras, no es una cepa clínica humana Indol (-) H ₂ S (-), aislada en aves, reptiles y agua. Varios aislamientos en heces humanas No aislada en humanos; produce septicemia entérica en el pez gato
Tribu III: Salmonelleae <i>Salmonella</i>	<i>S. cholerae-suis</i> <i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i>	Se considera que todos los subgrupos (subgéneros) de <i>Salmonella</i> y <i>Arizona</i> pertenecen a la misma especie. Los microorganismos se comunican actualmente por género y serotipo, omitiendo la referencia a la especie
Tribu IV: Citrobacterae <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Citrobacter braakii</i> <i>Citrobacter farmeri</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter gillenii</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Citrobacter murellinae</i> <i>Citrobacter rodentium</i> <i>Citrobacter sedlakii</i> <i>Citrobacter werkmanii</i> <i>Citrobacter youngae</i>	<i>Levinea amalonaticus</i> <i>Citrobacter</i> especie genómica 6 <i>Citrobacter amalonaticus</i> biogrupo I <i>Citrobacter</i> especie genómica 10 <i>Levinea malonatica</i> <i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter</i> especie genómica 11 <i>Citrobacter</i> especie genómica 9 <i>Citrobacter</i> especie genómica 8 <i>Citrobacter</i> especie genómica 7 <i>Citrobacter</i> especie genómica 5	H ₂ S (-), indol (+), adonitol (-), malonato (-). Se encuentra fundamentalmente en heces humanas, muy pocas veces se aísla en la sangre H ₂ S e indol son variables, adonitol (-), malonato (-). Aislado en heces humanas, orina y heridas y de animales y alimentos Se encuentra fundamentalmente en heces humanas. Las cepas del biogrupo I fermentan la sacarosa, la rafinosa, el alfa-metil-D-glucósido y la melibiosa y son citrato (-). <i>C. amalonaticus</i> habitualmente tiene las reacciones opuestas H ₂ S (+), indol (-), adonitol (-), malonato (-). Se encuentra en orina, fauces, esputo, sangre y heridas H ₂ S es variable, indol (-), adonitol (-), malonato (+). Se encuentra en heces humanas y alimentos H ₂ S (-), indol (+), adonitol (+), malonato (+). Se encuentra en orina, fauces, nariz, esputo y heridas. Causa rara de meningitis neonatal H ₂ S es variable, indol (+), adonitol (-), malonato (-). Se encuentra en heces humanas y sangre H ₂ S (-), indol (-), adonitol (-), malonato (+). Este microorganismo ha sido aislado sólo en roedores H ₂ S (-), indol (+), adonitol (-), malonato (+). Se encuentra en heces, sangre y heridas humanas H ₂ S (+), indol (-), adonitol (-), malonato (+). Se encuentra en heces y orina humanas y en los alimentos El H ₂ S y el indol son variables, adonitol (-), malonato (-). Aislado en heces y sangre humanas y de animales y alimentos

(Continúa)

Cuadro 6-5 Cambios recientes importantes en los géneros establecidos de enterobacterias (cont.)

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
Tribu V: Klebsielleae		
<i>Klebsiella granulomatis</i>	<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	No puede ser cultivado en medios de cultivo convencionales. Agente causal del granuloma inguinal
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> indet (+)	MIO (-,+,-). Aislamiento clínico frecuente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>pneumoniae</i>		MIO (-,-,-). Aislamiento clínico frecuente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cepa bioquímicamente inactiva de <i>K. pneumoniae</i> . Produce rinitis atófica, un trastorno denominado ozena
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Cepa bioquímicamente inactiva de <i>K. pneumoniae</i> . Produce una enfermedad granulomatosa conocida como rinoscleroma
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella</i> grupo 47 <i>Klebsiella ornithinolytica</i>	MIO (-,+,-). Aislada en sangre, orina, esputo y heridas
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Klebsiella</i> especie 2 <i>Klebsiella trevisanii</i> <i>Klebsiella planticola</i>	Aisladas en agua y plantas. Aislados clínicos humanos raros
<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	Aisladas en el suelo y el agua
<i>Enterobacter aerogenes</i> "Complejo <i>Enterobacter agglomerans</i> "	<i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia milletiae</i>	LAO (+,-,+). Aislamiento clínico frecuente Grupo heterogéneo de microorganismos que representan más de 13 grupos de hibridación de DNA (HIG). HIG XIII ha sido transferido al nuevo género <i>Pantoea</i> como <i>Pantoea agglomerans</i> . Los microorganismos que son LAO negativos (denominados "triple descarboxilasa negativos") y que tienen pigmento amarillo eran identificados en el pasado como <i>E. agglomerans</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogrupo 1 <i>Enterobacter amnigenus</i> biogrupo 2	Grupo H3	Dos biogrupos. Los del biogrupo 1 fermentan la sacarosa y la rafinosa, pero no el D-sorbitol. Los del biogrupo 2 fermentan el D-sorbitol pero no la sacarosa ni la rafinosa. Microorganismos fundamentalmente del agua. Han sido aislados de muestras humanas pero sin evidencia de que <i>E. amnigenus</i> pueda producir infección humana.
<i>Enterobacter asburiae</i>	Grupo entérico 17 <i>Citrobacter utipico</i>	Bioquímicamente similar a <i>E. cloacae</i> . Inmóvil, VP (-), (79% después de 2 días), urea (+) (tarde). Aislado en distintas fuentes humanas: sangre, orina, heridas, aparato respiratorio y heces
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Erwinia cancerigena</i> <i>Enterobacteraylorae</i> Grupo entérico 19	Incluye microorganismos antes clasificados como <i>E. taylorae</i> . LAO (-,+,+), adonitol, inositol, sorbitol, rafinosa y melibiosa todos negativos. Aislados en distintas fuentes clínicas, que incluyen sangre y líquido cefalorraquídeo
<i>Enterobacter cloacae</i> Similar a <i>Enterobacter cloacae</i> -especie sin nombre 1 Similar a <i>Enterobacter cloacae</i> -especie sin nombre 2 Similar a <i>Enterobacter cloacae</i> -especie sin nombre 3		
<i>Enterobacter communii</i>	Grupo NIH japonés 42	La mayoría de las cepas aisladas de muestras clínicas son LAO (-,+,+). Aislamiento clínico frecuente
<i>Enterobacter dissolvens</i>	<i>Erwinia dissolvens</i>	Estrechamente relacionado con <i>E. cloacae</i> . No se encuentra en muestras clínicas humanas
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> atípico	LAO (+,-,+). Ureasa (+) fuerte. Se encuentra en el medioambiente y en la orina y el aparato respiratorio de los seres humanos. Se han recuperado raras cepas en sangre
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Grupo entérico 75	LAO (-,+,+). Bioquímicamente más cercano a <i>E. cancerogenus</i> , excepto en urea (+), sacarosa (+) y esculina (-) Aislamientos comunicados en sangre, heridas y esputo
<i>Enterobacter intermedius</i>	Grupo H1 <i>Enterobacter intermedius</i>	Se encuentra en agua y suelo. Se han recuperado cepas en sangre, heces, heridas y bilis humana
<i>Enterobacter kobei</i>	Grupo entérico 69 Grupo NIH japonés 21	Estrechamente relacionado con <i>E. cloacae</i> . La mayoría aislada en muestras clínicas

Cuadro 6-5 Cambios recientes importantes en los géneros establecidos de enterobacterias (cont.)

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	<i>Erwinia nimipressuralis</i>	Estrechamente relacionado con <i>E. cloacae</i> . No se encuentran muestras clínicas humanas
<i>Enterobacter pyritus</i>	<i>Erwinia pyritus</i>	Ureasa (+), semejantes a <i>E. gergoviae</i> , se diferencian por su crecimiento en caldo de cianuro de potasio, la producción de ácido a partir del inositol y la falta de producción de ácido a partir de la rutinosa. Produce la enfermedad de las manchas en hojas pardas de los perales
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> con pigmento amarillo	LAO (-,+,+). Pigmento amarillo brillante a 35 °C. Puede producir meningitis, abscesos encefálicos y bacteriemia en recién nacidos
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter hafniae</i>	Lactosa (-). LAO (+,-,+). Crece a 35 °C pero es bioquímicamente más activo a 25 °C. Se encuentra en muestras clínicas, especialmente heces, en ocasiones en sangre, esputo, orina y heridas
<i>Hafnia alvei</i> biogrupo 1	" <i>Hafnia proteus</i> " <i>Obesumbacterium proteus</i> biogrupo 1	No se aisló clínicamente en humanos. Se presenta en los establos, donde crece en las heces de las vacas
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> HG XIII <i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia melleiae</i>	LAO (-,-,-), algunos pueden tener pigmento amarillo. Aislado en la superficie de las plantas, las semillas y el agua, y también de los seres humanos (heridas, sangre, orina, órganos internos) y de los animales
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Pantoea ananatis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> HG VI <i>Erwinia ananatis</i> <i>Erwinia uredoeura</i>	Patógeno de las plantas, produce la enfermedad del ananá
<i>Pantoea citrea</i>	Nuevas especies	Aislada en mandarinas en Japón
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> HG III	Aislada en superficies de plantas, semillas, seres humanos y medioambiente. Separado de <i>P. agglomerans</i> por reacción de salicilina negativa
<i>Pantoea punctata</i>	Especie nueva	Aislada en mandarinas en Japón
<i>Pantoea stewartii</i> subespecie <i>indologenes</i>	<i>Erwinia stewartii</i>	Causa manchas en las hojas del uña en cola de zorro y del uña perlado
<i>Pantoea stewartii</i> subespecie <i>stewartii</i>	<i>Erwinia stewartii</i>	Agente causal del marchitamiento del maíz de Stewart
<i>Pantoea terra</i>	Especie nueva	Aislada en el suelo en Japón
<i>Serratia entomophila</i>		Se asemeja a <i>S. marcescens</i> (arabinosa-negativo). Patógeno de los insectos, no se comunican cepas aisladas y en humanos
<i>Serratia ficaria</i>		El hábitat natural son los higos y las avispas de los higos. Comunicado muy pocas veces en muestras clínicas humanas
" <i>Serratia</i> " <i>fonticola</i>		No es realmente una especie de <i>Serratia</i> . Microorganismo del agua, pocas veces aislada en muestras humanas, principalmente de heridas
<i>Serratia grimesii</i>	Véase grupo de <i>Serratia liquefaciens</i>	Aislada en el medioambiente y de muestras clínicas humanas. No puede ser diferenciado de otros miembros del "grupo <i>S. liquefaciens</i> " por las pruebas habituales
Grupo de " <i>Serratia liquefaciens</i> "	<i>Enterobacter liquefaciens</i> Diferentes biogrupos dentro de la especie <i>S. liquefaciens</i>	Consiste en varios grupos de hibridación de DNA, que incluyen especies ahora denominadas <i>Serratia proteumaculus</i> y <i>S. grimesii</i> . No puede ser separado por las pruebas bioquímicas habituales. Difiere de <i>S. marcescens</i> por ser L-arabinosa (+). Se comunica como "grupo <i>S. liquefaciens</i> "
<i>Serratia marcescens</i>		DNasa (+), gelatina (+), L-arabinosa (-) (otras especies son positivas). Aislamiento clínico frecuente. Algunas cepas producen pigmento rojo
<i>Serratia odorifera</i> biogrupo 1 <i>Serratia odorifera</i> biogrupo 2		Olor a sociedad y musgo, similar a las patatas. Dos biogrupos. El biogrupo 1 es ornitina, sacarosa y rafinosa positivo y es predominantemente aislada en esputo. El biogrupo 2 es negativo para estas tres reacciones y ha sido recuperado de sangre y líquido cefalorraquídeo
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Bacterium plymuthica</i>	Puede tener pigmento rojo. Aislada en el suelo, agua y esputo. Extremadamente raro en muestras clínicas

(Continúa)

Cuadro 6-5 Cambios recientes importantes en los géneros establecidos de enterobacterias (cont.)

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
<i>Serratia proteamaculans</i> subespecie <i>proteamaculans</i>	Véase grupo de <i>Serratia liquefaciens</i>	No puede ser separado de otros miembros del "grupo de <i>S. liquefaciens</i> " por las pruebas bioquímicas actuales. Difieren de <i>S. marcescens</i> por ser L-arabinosa (+).
<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Serratia proteamaculans</i> subespecie <i>quinivora</i> véase grupo de <i>Serratia liquefaciens</i>	Aislada en plantas, roedores salvajes, insectos y agua, pero no aún en muestras clínicas humanas.
<i>Serratia rubideae</i>		Se produce pigmento rojo. Pocas veces aislado en seres humanos
Tribu VI: <i>Proteeae</i>		
<i>Proteus hauseri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biogrupo 3, DNA grupo 3	H ₂ S (+), indol (+); salicina y esculina son (-).
<i>Proteus mirabilis</i>		H ₂ S (+), indol (-), ornitina (+). Aislamiento clínico frecuente
<i>Proteus myxofaciens</i>		No se comunicaron por aislamientos humanos. Aislada sólo en lagartas vivas y muertas
<i>Proteus penneri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biogrupo 1	Estrechamente relacionado con <i>P. vulgaris</i> , excepto en que es indol (-), salicina (-), esculina (-) y resistente al cloranfenicol
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biogrupo 2	H ₂ S (+), indol (+), ornitina (-). Aislamiento clínico frecuente. Indol, salicina y esculina son positivos.
<i>Proteus vulgaris</i> biogrupo 3		Consiste en cuatro especies genéticamente separadas que se designan como grupos de DNA 3, 4, 5 y 6. Indol (+), pero salicina y esculina (-). El grupo DNA 3 ha sido denominado recientemente <i>Proteus hauseri</i>
<i>Morganella morganii</i> subespecie <i>morganii</i>	<i>Proteus morganii</i>	H ₂ S (-), lisina, ornitina y motilidad todas variables, trehalosa (-). Produce infecciones de las vías urinarias y es cultivado de muchos otros sitios del cuerpo. Contiene cuatro biogrupos designados A a D
<i>Morganella morganii</i> subespecie <i>sibonii</i>	<i>Morganella morganii</i> biogrupo 1	H ₂ S (-), lisina, ornitina variable, trehalosa y motilidad (+). Contiene tres biogrupos designados E a G
<i>Morganella morganii</i> subespecie 3		
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biogrupos 1 y 2	Urea (-), adonitol (+), inositol (-). En general es aislada en heces diarreicas, sobre todo en niños
<i>Providencia hainbuchae</i>		No es una cepa aislada clínicamente en humanos. Se encuentra en heces de pingüinos y en un feto de vaca abortado
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Proteus rettgeri</i>	Urea (+), adonitol (+), inositol (+). Principalmente aislada en orina de pacientes hospitalizados y muestras de catéteres
<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biogrupo 3, <i>Providencia fredericiensis</i>	Urea (-), adonitol (-), inositol (-). Pocas veces hallado en muestras clínicas, principalmente en heces humanas
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biogrupo 4	Urea (+), adonitol (-), inositol (+). Aislado principalmente de orina, menos a menudo de heridas, quemaduras y bacteriemia. Puede producir brotes hospitalarios
Tribu V: <i>Yersiniinae</i>		
<i>Yersinia aldovae</i>	Grupo K2 similar a <i>Yersinia enterocolitica</i>	Bioquímicamente similar a <i>Y. enterocolitica</i> . Aislada en agua de superficie, agua potable y peces
<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> biogrupo 3B	Bioquímicamente similar a <i>Y. enterocolitica</i> . Aislada en heces humanas, agua, suelo y vegetales crudos
<i>Yersinia enterocolitica</i>		Puede producir diarrea, ileítis terminal, linfadenitis mesentérica, artritis y septicemia en seres humanos
<i>Yersinia frederiksenii</i>	Biogrupo de <i>Y. enterocolitica</i>	Se encuentra principalmente en agua, aguas cloacales y peces. En ocasiones, en heces, sangre y esputo humanos. Pocas veces asociado con enfermedad gastrointestinal
<i>Yersinia intermedia</i>	Biogrupo de <i>Y. enterocolitica</i>	Se encuentra en agua dulce, aguas cloacales y animales acuáticos. Se han hallado cepas aisladas en heces, sangre, heridas y orina humanas. Probablemente no es una causa de enfermedad gastrointestinal
<i>Yersinia kristensenii</i>	Biogrupo de <i>Y. enterocolitica</i>	Se encuentra en agua, suelo y animales. Las cepas se aislaron en heces, sangre y orina humanas. No hay evidencia de que pueda producir enfermedad gastrointestinal

(Continúa)

Cuadro 6-5 Cambios recientes importantes en los géneros establecidos de enterobacterias (cont.)

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
<i>Yersinia mollaretii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> biogrupo 3A	Bioquímicamente similar a <i>Y. enterocolitica</i> . Aislada en heces humanas, agua de consumo humano, carne y vegetales crudos
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Pasteurella pestis</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> subespecie <i>pestis</i>	Agente causal de la peste
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		Puede producir linfadenitis mesentérica, diarrea y septicemia en seres humanos
<i>Yersinia rohdei</i>		Bioquímicamente similar a <i>Y. enterocolitica</i> . Aislada en heces de perros, agua y heces humanas
" <i>Yersinia</i> " <i>ruckeri</i>	"Bacteria de boca roja"	Probablemente se cambiará a un nuevo género. Patógeno de los peces. Las cepas humanas son extremadamente raras

LAO: lisina, arginina, ornitina; MIO: motilidad, indol, ornitina; PAD: fenilalanina desaminasa; HG: grupo de hibridación; (+): > 90% de las cepas positivas; (-): > 90% de las cepas negativas; (v): variable.

Características claves para la identificación de las especies más comunes

En el cuadro 6-6 se muestran las características claves de identificación utilizadas para separar los géneros establecidos de enterobacterias en siete tribus. Los estudiantes deben estudiar este cuadro y aprender a categorizar un aislado desconocido en una de estas tribus sobre las bases de las reacciones que se observan en estas pruebas claves. Las siguientes observaciones ayudarán a los estudiantes a identificar las especies más comunes.

Los miembros de *Escherichieae* tienen las siguientes reacciones claves: indol positivos, rojo de metilo positivos, Voges Proskauer negativos y citrato negativos (el ejemplo clásico de los fermentadores de ácidos mixtos). Son negativos para todas las otras pruebas bioquímicas claves: sulfuro de hidrógeno, fenilalanina desaminasa y urea. Obsérvese a partir del cuadro 6-6 que las especies de *Shigella* son similares a las de *Escherichia*, salvo en que son negativas para el gas CO₂ y la motilidad.

Edwardsiellae son similares a *Escherichieae* salvo para la propiedad de ser sulfuro de hidrógeno positivos. Los estudiantes pueden pensar en *Edwardsiella tarda* como *E. coli* sulfuro de hidrógeno positivo. *Salmonellae* se asemejan a *Edwardsiella*, salvo en que son indol negativos y citrato positivos. *Citrobacter freundii* es similar a *Salmonella*, salvo en que es lisina negativo. *C. koseri* difiere de *C. freundii* por ser sulfuro de hidrógeno negativo e indol positivo.

Klebsiellae están compuestos por miembros Voges-Proskauer positivos de las enterobacterias. Como se muestra en el cuadro 6-6 y se ilustra en la figura 6-2, la mayoría de los miembros de esta tribu producen cantidades abundantes de CO₂, tanto que la porción profunda de los agares inclinados KIA y TSI a menudo es empujada hacia arriba hasta mitad de camino en el tubo. Obsérvese que las especies de *Klebsiella* son inmóviles y que *Pantoeae* es triple descarboxilasa negativo (lisina negativo, arginina negativo y ornitina negativo).

Proteeae están separados de todos los otros en virtud de ser fenilalanina desaminasa positivos, una característica exclusiva de esta tribu. La reacción de la urea para las especies del género *Proteus* y *Morganella* y una de las especies de *Providencia* (*P. rettgeri*) es fuertemente positiva. Ambas especies de *Pro-*

teus mencionadas en el cuadro 6-6 son sulfuro de hidrógeno positivas y muestran motilidad ascendente.

Yersinieae representados aquí por la especie aislada más frecuente, *Y. enterocolitica*, son muy similares a los miembros de *Escherichieae*, excepto en que *Y. enterocolitica* suele ser urea positivo. Los estudiantes pueden pensar en *Y. enterocolitica* como *E. coli* urea positivo. Obsérvese que la motilidad de *Y. enterocolitica* es negativa a 36 °C pero positiva a 22 °C.

En el recuadro 6-8 se muestran las reacciones clave que deben recordar los estudiantes. Cuando sea necesario confirmar la identificación de una enterobacteria común con un patrón bioquímico inusual o cuando se sospeche una especie poco común, será necesario consultar el cuadro 6-7, que proporciona las reacciones a 47 sustratos bioquímicos de todas las especies de enterobacterias que tienen nombre.

TRIBU ESCHERICHIEAE

Los dos géneros dentro de esta tribu son *Escherichia* y *Shigella*. Como primera reflexión, estos dos grupos de bacterias no parecerían estar relacionados debido a las diferencias en las características de crecimiento y el aspecto en los medios de aislamiento entérico (*E. coli* característicamente fermenta la lactosa, las especies de *Shigella*, no). En general, *E. coli* es bioquímicamente activa en comparación con las especies de *Shigella*, que tienden a ser inertes. Sin embargo, *E. coli* y las especies de *Shigella* están estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético; de hecho, las cuatro especies de *Shigella* y *E. coli* forman una sola especie sobre la base de estudios de hibridación del DNA.⁴⁸ Sin embargo, como las especies de *Shigella* se asocian con un espectro específico de enfermedad (disentería bacilar) y, como existen en el comercio antisuecos para la tipificación específica que permite separar *E. coli* de *Shigella*, seguiremos clasificando las especies de *Shigella* en un género separado, al menos por ahora. Empero, los estudiantes deben observar que puede ser difícil diferenciar ciertas cepas de *E. coli* fermentadoras tardías de glucosa, inmóviles y bioquímicamente inactivas de las especies de *Shigella* y que algunas raras cepas de especies de *Shigella* (*S. flexneri*) también producen gas a partir de la fermentación de la glucosa. El espectro patológico de *E. coli* es mucho más amplio que el de las especies de *Shigella* y las cepas toxigénicas de *E. coli*

Cuadro 6-6 Características claves de identificación para las enterobacterias más frecuentes

	K/A	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LIS	ARG	ORN	ONPG
Tribu I: Escherichiae														
Género: Escherichia														
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+
Género: Shigella														
Grupos A, B, C	A/c/A	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	A/c/A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tribu II: Edwardsiellae														
Género: Edwardsiella														
<i>E. tarda</i>	A/c/A	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Tribu III: Salmonellae														
Género: Salmonella														
	A/c/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-
Tribu IV: Citrobacterae														
Género: Citrobacter														
<i>C. freundii</i>	A/A; A/c/A	+	+	+	-	-	+	-	+/-	+	-	+/-	+/-	+
<i>C. koseri</i>	A/c/A	+	-	+	-	+	+	-	+/-	+	-	+/-	+	+
Tribu V: Klebsiellae														
Género: Klebsiella														
<i>K. pneumoniae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>K. oxytoca</i>	A/A	++	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Género: Enterobacter														
<i>E. aerogenes</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>E. cloacae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+	+	+
Género: Hafnia														
<i>H. alvei</i>	A/c/A	+	-	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Género: Pantoea														
<i>P. agglomerans</i>	A/A; A/c/A	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+
Género: Serratia														
<i>S. marcescens</i>	A/c/A	+	-	+/-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Tribu VI: Proteae														
Género: Proteus														
<i>P. vulgaris</i>	A/c/A	+/-	+	+	-	+	+/-	+	++	++	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	A/c/A	+	+	+	+/-	-	+/-	+	++	++	-	-	+	-
Género: Morganella														
<i>M. morganii</i>	A/c/A	+	-	+	-	+	-	+	++	+	-	-	+	-
Género: Providencia														
<i>P. rettgeri</i>	A/c/A	-	-	+	-	+	+	+	++	+	-	-	-	-
<i>P. stuartii</i>	A/c/A	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
<i>P. alcalifaciens</i>	A/c/A	+/-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Tribu VII: Yersiniace														
Género: Yersinia														
<i>Y. enterocolitica</i>	A/c/A	-	-	+	-	+/-	-	-	+/-	-†	-	-	+	+

K/A: agar hierro de Níglie; H₂S: sulfuro de hidrógeno; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; IND: indol; CIT: citrato; PAD: fenilalanina desaminasa; URE: ureasa; MOT: motilidad; LIS: lisina; ARG: arginina; ORN: ornitina; ONPG: o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido; ++: reacción positiva fuerte; +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; +/-: 50-90% de cepas positivas; +/-: 50-90% de cepas negativas; las áreas sombreadas indican reacciones claves.

* Atualidad ascendente demostrada en medios no inhibitorios.

† Inmóvil a 36 °C, móvil a 22 °C.

Recuadro 6-8 Hechos claves para recordar en la identificación de Enterobacteriaceae**Sulfuro de hidrógeno positivas**

<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Especies de <i>Salmonella</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	

Voges-Proskauer positivas

Especies de <i>Klebsiella</i>	Especies de <i>Pantoea</i>
Especies de <i>Enterobacter</i>	Especies de <i>Serratia</i>
Especies de <i>Hafnia</i>	

Fenilalanina desaminasa positivas

Especies de <i>Proteus</i>	Especies de <i>Providencia</i>
Especies de <i>Morganella</i>	

Inmóviles a 36 °C

Especies de <i>Shigella</i>	Especies de <i>Klebsiella</i>
Especies de <i>Yersinia</i> (móviles a 22 °C)	

pueden causar síndromes disenteriformes indistinguibles de la shigelosis. En algunos casos, pueden ser necesarias las pruebas serológicas para diferenciar ciertas cepas estrechamente relacionadas. Las características clave de *Escherichiae* se proporcionan en el cuadro 6-6.

Género *Escherichia*. *E. coli* es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. Es uno de los microorganismos más frecuentes involucrados en la sepsis por gramnegativos y en el shock inducido por endotoxinas. Otras infecciones habituales producidas por *E. coli* son las de las vías urinarias y la de las heridas, la neumonía en los pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y la meningitis en los recién nacidos. *E. coli* se serotifica sobre la base de sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular). En la actualidad se reconocen más de 170 serogrupos diferentes de antígenos O.³³⁹ La combinación de antígenos O y H define un "serotipo" de un aislado; por ejemplo, *E. coli* O157:H7 es un serotipo de una cepa virulenta de *E. coli* asociado con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.

***E. coli* que producen gastroenteritis.** Ciertas cepas de *E. coli* pueden producir enteritis o gastroenteritis por seis mecanismos distintos, que conducen a seis síndromes clínicos diferentes. Estas cepas incluyen *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC).³³⁹ (Véase cuadro 6-8). Los aislados de EPEC, EAEC y DAEC se caracterizan por sus patrones distintos de adherencia a las células epiteliales in vitro. Las cepas EPEC se unen a las células huésped en un patrón denominado adherencia local, en el cual se forman microcolonias sobre las superficies de las células. Los aislados de EAEC se unen en un patrón de adherencia agregante caracterizado por una disposición similar a ladrillos apilados sobre las superficies de las células. Las cepas DAEC están definidas por un patrón de adherencia difusa en el cual las bacterias cubren difusamente la

totalidad de la superficie celular.³³⁹ Además de las seis clases de *E. coli* diarreicogénicas mencionadas, existen otras clases potenciales, como *E. coli* productora de toxina citolética distensora (CDT) y la *E. coli* desprendedora de células (CDEC) no caracterizadas aún en forma completa.³³⁹

Si bien existen ensayos para identificar todas las categorías de *E. coli* que producen gastroenteritis, en la mayoría de los casos no es necesario identificar un patógeno específico de *E. coli* en un paciente particular. En casi todos los pacientes con gastroenteritis debida a *E. coli* la diarrea se resuelve antes de buscar atención médica o luego del tratamiento con antibióticos empíricos administrados para otras diarreas bacterianas. Por lo tanto, con excepción de los ensayos para la detección de EHEC (explicados luego), no se realizan en forma habitual en el laboratorio clínico ensayos fenotípicos ni serotificación de *E. coli* para el diagnóstico de las cepas diarreicogénicas.

Fisiopatología de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). No se conoció la importancia clínica de EHEC hasta 1982, cuando estos microorganismos fueron asociados con dos trastornos cuya etiología se desconocía hasta ese momento: la colitis hemorrágica³³⁸ y el síndrome urémico-hemolítico.³³⁷ (Véase recuadro de correlación clínica 6-1). *E. coli* O157:H7 fue el primero de los serotipos productores de toxina Shiga del que se supo que producía enfermedad humana. Se denomina así porque expresa el 157 antígeno somático (O) identificado y el séptimo antígeno flagelar (H). Entre las características más importantes de virulencia de *E. coli* O157:H7 está su capacidad para producir una o más toxinas Shiga (también denominadas verocitotoxinas, antes conocidas como toxinas similares a la Shiga). La toxina Shiga 1 (Stx1) es indistinguible de la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. La toxina Shiga 2 (Stx2) es una molécula más divergente que tiene múltiples variantes (Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f) estrechamente relacionadas entre sí pero con una relación más distante con Stx1. Algunas cepas de *E. coli* O157 producen sólo Stx1, sólo Stx2, mientras que otras producen ambas. Las toxinas no implican riesgos equivalentes de producir síndrome urémico-hemolítico. Las cepas que producen sólo Stx2 acarream el riesgo máximo; las cepas que producen sólo Stx1 tienen el riesgo más bajo, mientras que las cepas que elaboran ambas toxinas acarream un riesgo intermedio. Ambas toxinas están compuestas por cinco subunidades B y una sola subunidad A. La subunidad B se une a globotriaosilceramida (Gb₃), un glucolípido hallado en grados variados en las membranas de las células eucariontes. La subunidad A es una citotoxina potente y es responsable de la lesión celular. La producción de toxina Shiga no es por sí sola suficiente para producir enfermedad. Otros factores de virulencia identificados en *E. coli* O157 incluyen un plásmido de virulencia de 60 MDa (pO157) y el locus de borramiento del enterocito (LEE). El plásmido de 60 MDa codifica una enterohemolisina (designada EHEC-Hly) que puede permitir que *E. coli* O157 utilice la hemoglobina liberada por la acción de EHEC-Hly como fuente de hierro, estimulando así el crecimiento de *E. coli* O157 en el intestino.³³⁹ El LEE contiene genes para una molécula de adhesión (intimina) y para otros factores importantes para la producción de lesiones de fijación-borramiento. Las manifestaciones clínicas de la infección por *E. coli* O157 van desde la portación asintomática hasta diarrea no sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico-hemolítico y muerte. El período de incubación varía de uno a 8 días, con un intervalo promedio de 3 días antes de la exposición y la enfermedad. La mayoría de los pacientes con colitis hemorrágica se recuperan dentro de los 7 días. En los casos típicos, la enfermedad comienza con cólicos abdominales y diarrea no

Cuadro 6-7 Reacciones bioquímicas de especies con nombre y grupos sin nombre de la familia *Enterobacteriaceae*

"MICROORGANISMO"	PRODUCCIÓN DE INDOLO	ROJO DE METILO	VOGES-PROSKAUER	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSI)	HIDRÓLISIS DE UREA	PENTILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANITOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA
Biobacillus																					
<i>B. aquatica</i>	0	93	0	0	80	33	0	0	0	0	27	0	0	0	100	53	87	0	60	0	0
Bulbacella																					
<i>B. agrestis</i>	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	80	60	100	100	100	0	100	0	100
<i>B. bronnerae</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	33	100	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100
<i>B. ferruginea</i>	0	100	0	0	0	0	0	100	0	80	60	0	40	0	100	100	0	0	100	0	100
<i>B. garciniae</i>	0	100	0	20	0	0	0	0	20	0	80	0	60	100	100	40	60	0	100	0	100
<i>B. liparii</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	67	100	100	100	100	0	100	0	100
<i>B. noackiae</i>	33	100	0	33	0	0	100	0	67	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100
<i>B. warmboldiae</i>	0	100	0	33	0	0	100	0	0	0	100	0	33	100	100	100	0	0	100	0	100
Cedecia																					
<i>C. daviana</i>	0	100	50	95	0	0	0	0	50	95	95	0	86	91	100	70	19	100	100	0	99
<i>C. lapagei</i>	0	40	80	99	0	0	0	0	80	0	80	0	100	99	100	100	60	0	100	0	100
<i>C. neteri</i>	0	100	50	100	0	0	0	0	100	0	100	0	65	100	100	100	35	100	100	0	100
<i>Cedecia</i> especie 3	0	100	50	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0	50	100	0	100
<i>Cedecia</i> especie 5	0	100	50	100	0	0	0	0	50	50	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100
Citrobacter																					
<i>C. amalonaticus</i>	100	100	0	95	5	85	0	0	85	95	95	0	99	1	100	97	35	9	100	1	30
<i>C. braunii</i>	33	100	0	87	60	47	0	0	67	93	87	0	100	0	100	93	80	7	100	33	0
<i>C. formosus</i>	100	100	0	10	0	59	0	0	85	100	97	0	93	0	100	96	15	100	100	2	9
<i>C. freundii</i>	33	100	0	78	78	44	0	0	67	0	89	0	89	11	100	89	78	89	100	11	0
<i>C. gillenii</i>	0	100	0	33	67	0	0	0	33	0	67	0	100	100	100	100	67	33	100	0	0
<i>C. koseri</i> (diversus)	99	100	0	99	0	75	0	0	80	99	95	0	0	95	100	98	50	40	99	40	15
<i>C. murliniae</i>	100	100	0	100	67	67	0	0	67	0	100	0	100	0	100	100	67	33	100	100	33
<i>C. rodentium</i>	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	0
<i>C. seifriedii</i>	83	100	0	83	0	100	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100	17
<i>C. werkmanii</i>	0	100	0	100	100	100	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100	17	0	100	0	0
<i>C. youngiae</i>	15	100	0	75	65	80	0	0	50	5	95	0	95	5	100	75	25	20	100	35	10
Edwardsiella																					
<i>E. hoshiniae</i>	50	100	0	0	0	0	0	100	0	95	100	0	0	100	100	35	0	100	100	0	50
<i>E. ictaluri</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0	65	0	0	0	0	100	50	0	0	0	0	0
<i>E. rancia</i>	99	100	0	1	100	0	0	100	0	100	98	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
<i>E. rancia</i> biogrupo 1	100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	100	50	0	100	100	0	0
Enterobacter																					
<i>E. aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	98	95	100	100	95	100	100	5	100
<i>E. amnigenus</i> biogrupo 1	0	7	100	70	0	0	0	0	9	55	92	0	100	91	100	100	70	100	100	0	91
<i>E. amnigenus</i> biogrupo 2	0	65	100	100	0	0	0	35	100	100	0	0	100	100	100	100	35	0	100	0	100
<i>E. asburiae</i>	0	100	2	100	0	60	0	0	21	95	0	0	97	3	100	95	75	100	100	0	100
<i>E. cancerogenus</i> (<i>E. molyneuxii</i>)	0	5	100	100	0	1	0	0	94	99	99	0	98	100	100	100	10	0	100	0	92

FERMENTACIÓN DE ADONITOL	FERMENTACIÓN DE MIOINOSITOL	FERMENTACIÓN DE D-SORBITOL	FERMENTACIÓN DE L-ARABINÓSIDO	FERMENTACIÓN DE RAFINOSA	FERMENTACIÓN DE L-RAMNOSA	FERMENTACIÓN DE MALTOSA	FERMENTACIÓN DE D-XILOSA	FERMENTACIÓN DE TREHALOSA	FERMENTACIÓN DE CELOBIOSA	FERMENTACIÓN DE α-METIL D-GLUCÓSIDO	FERMENTACIÓN DE ERITRITOL	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	FERMENTACIÓN DE MELIBIOSA	FERMENTACIÓN DE D-ARABITOL	FERMENTACIÓN DE GLICEROL	FERMENTACIÓN DE MUCATO	"TARTRATO, DE JORDAN"	UTILIZACIÓN DE ACETATO	LIPASA (ACEITE DE MAÍZ)	DNASA (25 °C)	NITRATO NITRITO	"OXIDASA, DE KOVAC"	PRUEBA DE ONPG	PIGMENTO AMARILLO	FERMENTACIÓN DE D-MANNOSA
0	0	0	80	0	100	0	93	0	0	0	0	0	0	27	0	20	27	0	0	0	100	0	93	0	0
0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	60	100	60	0	0	0	100	0	100	0	100
67	0	0	100	100	33	100	100	100	100	0	0	100	100	67	67	67	0	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	40	0	100	0	0	0	60	0	0	0	0	100	0	100	0	100
100	0	0	100	0	100	60	100	100	100	0	0	100	0	80	0	80	40	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	100	33	100	100	100	100	100	0	0	100	67	0	33	100	67	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	100	0	100	100	100	100	100	33	0	100	0	0	0	100	100	0	0	0	100	0	100	0	100
0	67	0	100	0	100	100	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	0	10	0	100	100	100	100	5	0	45	0	100	0	0	0	0	91	0	100	0	90	0	100
0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	0	100	0	0	0	60	100	0	100	0	99	0	100
0	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100
0	0	0	0	100	0	100	100	100	100	50	0	100	100	100	0	0	0	50	100	0	100	0	100	0	100
0	0	100	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	0	50	50	0	100	0	100	0	100
0	0	99	99	5	100	99	99	100	100	2	0	5	0	0	60	96	96	86	0	0	99	0	97	0	100
0	0	100	100	7	100	100	100	100	73	33	0	0	80	0	87	100	93	53	0	0	100	0	80	0	100
0	0	98	100	100	100	100	100	100	100	75	0	0	100	0	65	100	93	80	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	44	100	100	89	100	44	11	0	0	100	0	100	100	100	44	0	0	100	0	89	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	67	0	0	0	67	0	67	67	100	0	0	0	100	0	67	0	100
99	0	99	99	0	99	100	100	100	99	40	0	1	0	98	99	95	90	75	0	0	100	0	99	0	100
0	0	100	100	33	100	100	100	100	100	0	0	0	33	0	100	100	100	33	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	17	100	0	83	100	100	83	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100	0	100
0	5	100	100	10	100	95	100	100	45	0	0	5	10	5	90	100	100	65	0	0	85	0	90	0	100
0	0	0	13	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	65	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	0	9	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	25	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
98	95	100	100	96	99	99	100	100	100	95	0	98	99	100	98	90	95	50	0	0	100	0	100	0	95
0	0	9	100	100	100	100	100	100	100	55	0	91	100	0	0	35	9	0	0	0	100	0	91	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	70	5	100	97	100	100	95	0	95	0	0	11	21	30	87	0	0	100	0	100	0	100
0	0	1	100	0	100	99	100	100	100	1	0	90	0	0	1	75	0	35	0	0	100	0	100	0	100

(Continúa)

Cuadro 6-7 Reacciones bioquímicas de especies con nombre y grupos sin nombre de la familia *Enterobacteriaceae* (cont.)

"MICROORGANISMO" ^{1,2}	PRODUCCIÓN DE INDOL	ROJO DE METILO	Voges-Proskauer	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSI)	HIDRÓLISIS DE UREA	FENILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANTOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA
Enterobacter																					
<i>E. cloacae</i>	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	0	98	75	100	100	93	97	100	15	75
<i>E. cowanii</i>	0	ND	92	100	0	0	0	0	0	0	92	0	92	0	100	100	100	100	100	100	100
<i>E. dissolvens</i>	0	0	100	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	0	100	100	0	100
<i>E. gergoviae</i>	0	5	100	99	0	93	0	90	0	100	90	0	0	96	100	98	55	98	99	0	99
<i>E. hormaechei</i>	0	57	100	96	0	87	4	0	78	91	52	0	100	100	100	83	9	100	100	87	44
<i>E. intermedius</i>	0	100	100	65	0	0	0	0	0	89	89	0	65	100	100	100	100	65	100	100	100
<i>E. lobeli</i> (grupo <i>entericus</i> 69)	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	25	100	100	100
<i>E. nimipressuralis</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100
<i>E. pyruus</i>	0	29	86	0	0	86	0	100	0	100	43	0	0	86	100	100	14	0	100	0	100
<i>E. sakazakii</i>	11	5	100	99	0	1	50	0	94	91	96	0	99	18	100	98	99	0	100	5	99
Escherichia																					
<i>E. albertii</i>	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0
<i>E. blautae</i>	0	100	0	50	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	3	0	100	95	25	0	98	60	40
" <i>E. coli</i> , inactiva"	80	95	0	1	1	1	0	40	3	20	5	0	1	0	100	5	25	0	93	40	10
<i>E. fergusonii</i>	98	100	0	17	0	0	0	95	5	100	93	0	0	35	100	95	0	0	98	60	65
<i>E. hermannii</i>	99	100	0	1	0	0	0	6	0	100	99	0	94	0	100	97	45	0	100	19	40
<i>E. vulneris</i>	0	100	0	0	0	0	0	85	30	0	100	0	15	85	100	97	15	0	100	0	30
Ewingella																					
<i>E. americana</i>	0	84	95	95	0	0	0	0	0	0	60	0	5	0	100	0	70	0	100	0	80
Haefia																					
<i>H. alvei</i>	0	40	85	10	0	4	0	100	6	98	85	0	95	50	100	98	5	0	99	0	13
<i>H. alvei</i> biogrupo 1	0	85	70	0	0	0	0	100	0	45	0	0	0	45	100	0	0	0	55	0	55
Klebsiella																					
<i>K. oxytoca</i>	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	0	97	98	100	97	100	0	99	55	100
<i>K. pneumoniae</i> subespecie <i>ozaenae</i>	0	98	0	30	0	10	0	40	6	3	0	0	88	3	100	50	30	0	100	2	97
<i>K. pneumoniae</i> subespecie <i>pneumoniae</i>	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	0	98	93	100	97	98	0	99	30	99
<i>K. pneumoniae</i> subespecie <i>rhinoscleromatis</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	95	100	0	0	0	100	0	98
Raoultella																					
<i>R. (Klebsiella) ornithinolytica</i>	100	96	70	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100	100	100	100	100	0	100	10	100
<i>R. (Klebsiella) planticola</i>	20	100	98	100	0	98	0	100	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	15	100
<i>R. (Klebsiella) terrigena</i>	0	60	100	40	0	0	0	100	0	20	0	0	100	100	100	80	100	0	100	20	100
Kluyvera																					
<i>K. ascorbata</i>	92	100	0	96	0	0	0	97	0	100	98	0	92	96	100	93	98	0	100	25	100
<i>K. cryocrescens</i>	90	100	0	80	0	0	0	23	0	100	90	0	86	56	100	95	95	0	95	0	100
<i>K. georgiana</i>	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	83	50	100	17	83	0	100	33	100

FERMENTACIÓN DE ADONITOL	FERMENTACIÓN DE MIOINOSITOL	FERMENTACIÓN DE D-SORBITOL	FERMENTACIÓN DE L-ARABINOSA	FERMENTACIÓN DE RAFINOSA	FERMENTACIÓN DE L-RAMNOSA	FERMENTACIÓN DE MALTOSA	FERMENTACIÓN DE D-XILOSA	FERMENTACIÓN DE TREHALOSA	FERMENTACIÓN DE CELOBIOSA	FERMENTACIÓN DE A-METIL-D-GLUCÓSIDO	FERMENTACIÓN DE ERITRITOL	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	FERMENTACIÓN DE MELIBIOSA	FERMENTACIÓN DE D-ARABITOL	FERMENTACIÓN DE GLICEROL	FERMENTACIÓN DE MUCATO	"TARTRATO, DE JORDAN"	UTILIZACIÓN DE ACETATO	LIPASA (ACEITE DE MAÍZ)	DNASA (25 °C)	NITRATO NITRITO	"OXIDASA, DE KOVAC"	PRUEBA DE ONPG	PIGMENTO AMARILLO	FERMENTACIÓN DE D-MANNOSA
25	15	95	100	97	92	100	99	100	99	85	0	30	90	15	40	75	30	75	0	0	99	0	99	0	100
0	0	100	0	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	100	91	100	100	0	0	100	0	100	66	100
0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	99	97	99	100	99	100	99	2	0	97	97	97	100	2	97	93	0	0	99	0	97	0	100
0	0	0	100	0	100	100	96	100	100	83	0	0	0	0	4	96	13	74	0	0	100	0	95	0	100
0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	0	25	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100
0	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100
0	75	0	100	99	100	100	100	100	100	96	0	100	100	0	15	1	1	96	0	0	99	0	100	95	100
0	0	0	100	0	0	60	0	60	0	0	0	0	0	0	0	ND	100	0	0	100	0	100	0	100	0
0	0	0	100	0	100	100	100	75	0	0	0	0	0	0	100	50	50	0	0	0	100	0	0	0	100
5	1	94	99	50	80	95	95	98	2	0	0	35	75	5	75	95	95	90	0	0	100	0	95	0	98
3	1	75	85	15	65	80	70	90	2	0	0	5	40	5	65	30	85	40	0	0	98	0	45	0	97
98	0	0	98	0	92	96	96	96	96	0	0	46	0	100	20	0	96	96	0	0	100	0	83	0	100
0	0	0	100	40	97	100	100	100	97	0	0	40	0	8	3	97	35	78	0	0	100	0	98	98	100
0	0	1	100	99	93	100	100	100	100	25	0	20	100	0	25	78	2	30	0	0	100	0	100	50	100
0	0	0	0	0	23	16	13	99	10	0	0	50	0	99	24	0	35	10	0	0	97	0	85	0	99
0	0	0	95	2	97	100	98	95	15	0	0	7	0	0	95	0	70	15	0	0	100	0	90	0	100
0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	100	0	30	0	100
99	98	99	98	100	100	100	100	100	100	98	2	100	99	98	99	93	98	90	0	0	100	0	100	1	100
97	55	65	98	90	55	95	95	98	92	70	0	80	97	95	65	25	50	2	0	0	80	0	80	0	100
90	95	99	99	99	99	98	99	99	98	90	0	99	99	98	97	90	95	75	0	0	99	0	99	0	99
100	95	100	100	90	96	100	100	100	100	0	0	30	100	100	50	0	50	0	0	0	100	0	0	0	100
100	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	96	100	95	0	0	100	0	100	0	100
100	100	92	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	62	0	0	100	0	100	1	100
100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	20	0	0	100	0	100	0	100
0	0	40	100	98	100	100	99	100	100	98	0	99	99	0	40	90	35	50	0	0	100	0	100	0	100
0	0	45	100	100	100	100	91	100	100	95	0	100	100	0	5	81	19	86	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	100	100	83	100	100	100	100	100	0	100	100	0	33	83	50	83	0	0	100	0	100	0	100

(Continúa)

Cuadro 6-7 Reacciones bioquímicas de especies con nombre y grupos sin nombre de la familia *Enterobacteriaceae* (cont.)

"MICROORGANISMO"	PRODUCCIÓN DE INDOLO	ROJO DE METILO	VOGES-PROSKAUER	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSI)	HIDRÓLISIS DE UREA	FENILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANITOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA
Ledercia																					
<i>L. oleocarboxylans</i>	100	100	0	0	0	48	0	0	0	0	79	0	97	93	100	97	93	0	100	86	100
Leminorella																					
<i>L. griseoviridis</i>	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	33	0	0	0	83	0
<i>L. richardsii</i>	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
Moseliella																					
<i>M. wilsonsonensis</i>	0	100	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	100	0	100	0	60	0	0
Morganella																					
<i>M. morganii</i> subespecie <i>morganii</i>	95	95	0	0	20	95	95	1	0	95	95	0	98	1	99	90	1	0	0	0	0
<i>M. morganii</i> subespecie <i>albani</i>	50	86	0	0	7	100	93	29	0	64	79	0	79	0	100	86	0	0	0	0	0
<i>M. morganii</i> biogrupo 1	100	95	0	0	13	100	100	100	0	80	0	0	90	5	100	93	0	0	0	0	0
Obesumbacterium																					
<i>O. proteus</i> biogrupo 2	0	15	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
Pantoea																					
<i>P. agglomerans</i>	20	50	70	50	0	20	20	0	0	0	85	2	35	65	100	20	40	0	100	13	65
<i>P. dispersa</i>	0	82	64	100	0	0	9	0	0	0	100	0	82	9	100	0	0	0	100	0	0
Photobacterium																					
<i>P. luminescens</i> (23 °C)	50	0	0	50	0	25	0	0	0	0	100	50	0	0	75	0	0	0	0	0	0
<i>P. aerophilum</i>	0	0	0	20	0	60	0	0	0	0	100	80	20	0	100	0	0	0	0	0	0
Pragia																					
<i>P. fontium</i>	0	100	0	89	89	0	22	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	78
Proteus																					
<i>P. hauseri</i>	100	100	0	0	50	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	90	98	2	100	96	2	0	0	0	0
<i>P. morganii</i>	0	100	100	50	0	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	100	0	0	0	0	0
<i>P. penneri</i>	0	100	0	0	20	100	99	0	0	0	85	50	99	0	100	45	1	0	0	0	0
<i>P. vulgaris</i>	98	95	0	15	95	95	99	0	0	0	95	91	99	0	100	85	2	0	0	0	50
Providencia																					
<i>P. alcalifaciens</i>	99	99	0	98	0	0	98	0	0	1	98	0	100	0	100	85	0	0	2	0	1
<i>P. heimbachiae</i>	0	85	0	0	0	0	100	0	0	0	46	0	8	0	100	0	0	0	0	0	0
<i>P. rettgeri</i>	99	93	0	95	0	98	98	0	0	0	94	0	97	0	100	10	5	0	100	0	50
<i>P. rustiganii</i>	98	65	0	15	0	0	100	0	0	0	30	0	100	0	100	35	0	0	0	0	0
<i>P. stuartii</i>	98	100	0	93	0	20	95	0	0	0	55	0	100	0	100	0	2	0	10	0	2
Rahnella																					
<i>R. aquatilis</i>	0	88	100	94	0	0	95	0	0	0	6	0	0	100	100	98	100	0	100	83	100
Salmonella																					
<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i> (grupo 1)																					
Mayoría de serotipos	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	0	0	0	100	96	1	1	100	96	0

FERMENTACIÓN DE ADONITOL	FERMENTACIÓN DE MIOINOSITOL	FERMENTACIÓN DE D-SORBITOL	FERMENTACIÓN DE L-ARABINOSA	FERMENTACIÓN DE RAFINOSA	FERMENTACIÓN DE L-RAMNOSA	FERMENTACIÓN DE MALTOSA	FERMENTACIÓN DE D-XILOSA	FERMENTACIÓN DE TREHALOSA	FERMENTACIÓN DE CELOBIOSA	FERMENTACIÓN DE α-METIL-D-GLUCÓSIDO	FERMENTACIÓN DE ERITRITOL	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	FERMENTACIÓN DE MELIBIOSA	FERMENTACIÓN DE D-ARABITOL	FERMENTACIÓN DE GLICEROL	FERMENTACIÓN DE MUCATO	"TARTRATO, DE JORDAN"	UTILIZACIÓN DE ACETATO	LIPASA (ACEITE DE MAÍZ)	DNASA (25 °C)	NITRATO NITRITO	"OXIDASA, DE KOVAC"	PRUEBA DE ONPG	PIGMENTO AMARILLO	FERMENTACIÓN DE D-MANNOZA
93	0	0	100	66	100	100	100	100	100	0	0	100	100	96	3	93	83	28	0	0	100	0	100	37	100
0	0	0	100	0	0	0	83	0	0	0	0	0	0	0	17	100	100	0	0	0	100	0	0	0	0
0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	0	0	0	100	0	0	0	0
100	0	0	0	100	0	30	0	0	0	0	0	0	100	75	10	0	30	10	0	0	90	0	90	0	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	95	0	0	0	90	0	10	0	98
0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	7	7	100	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	90	0	20	0	100
0	0	0	0	0	15	30	15	85	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	100	0	0	0	85
7	15	30	95	30	85	89	93	97	55	7	0	60	50	50	30	40	25	30	0	0	85	0	90	75	98
0	0	0	100	0	91	82	100	100	55	0	0	0	0	100	27	0	9	100	0	0	91	0	91	27	100
0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	30	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	20	0	0	0	0	0	60	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	98	98	1	0	0	0	0	0	70	0	87	20	92	50	95	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	50	100	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	100	100	55	0	80	0	0	0	0	55	0	85	5	45	40	90	0	1	0	0
0	0	0	0	1	5	97	95	30	0	60	1	50	0	0	60	0	80	25	80	80	98	0	1	0	0
98	1	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	15	0	90	40	0	0	100	0	1	0	100
92	46	0	0	0	100	54	8	0	0	0	0	0	0	92	0	0	69	0	0	0	100	0	0	0	100
100	90	1	0	5	70	2	10	0	3	2	75	35	5	100	60	0	95	60	0	0	100	0	5	0	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	50	25	0	0	100	0	0	0	100
5	95	1	1	7	0	1	7	98	5	0	0	0	0	0	50	0	90	75	0	10	100	0	10	0	100
0	0	94	100	94	94	94	94	100	100	0	0	100	100	0	13	30	6	6	0	0	100	0	100	0	100
0	35	95	99	2	95	97	97	99	5	2	0	5	95	0	5	90	90	90	0	2	100	0	2	0	100

(Continúa)

Cuadro 6-7 Reacciones bioquímicas de especies con nombre y grupos sin nombre de la familia *Enterobacteriaceae* (cont.)

"MICROORGANISMO"	PRODUCCIÓN DE INDOLO	ROJO DE METILO	VÓGES-PROSKAUER	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSI)	HIDRÓLISIS DE UREA	FENILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANITOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA
Salmonella																					
<i>S. serotipo</i>	0	100	0	25	50	0	0	95	55	100	95	0	0	0	100	95	0	0	98	5	0
<i>Choleraesuis</i>																					
<i>S. serotipo</i>	0	100	0	0	100	0	0	90	10	1	0	0	0	0	100	0	0	0	100	90	0
<i>Gallinarum</i>																					
<i>S. serotipo</i>	0	100	0	0	10	0	0	0	15	95	95	0	0	0	100	99	0	0	100	90	0
<i>Paratyphi A</i>																					
<i>S. serotipo</i>	0	90	0	0	90	0	0	100	10	95	0	0	0	0	100	90	0	0	100	0	0
<i>Pullorum</i>																					
<i>S. serotipo Typhi</i>	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	0	0	0	100	0	1	0	100	0	0
<i>S. enterica subespecie</i>	2	100	0	100	100	0	0	100	90	100	98	2	0	95	100	100	1	1	100	90	5
<i>salamae</i> (grupo II)																					
<i>S. enterica subespecie</i>	1	100	0	99	99	0	0	99	70	99	99	0	1	95	100	99	15	1	100	0	0
<i>arizonae</i> (grupo IIIa)																					
<i>S. enterica subespecie</i>	2	100	0	98	99	0	0	99	70	99	99	0	1	95	100	99	85	5	10	1	0
<i>diarizonae</i> (grupo IIIb)																					
<i>S. enterica subespecie</i>	0	100	0	98	100	2	0	100	70	100	98	0	95	0	100	100	0	0	98	0	0
<i>feculentae</i> (grupo IV)																					
<i>S. enterica subsp. indiana</i>	0	100	0	89	100	0	0	100	67	100	100	0	0	0	100	100	22	0	100	67	0
(grupo VI)																					
<i>S. bongori</i>	0	100	0	94	100	0	0	100	94	100	100	0	100	0	100	94	0	0	100	94	0
(grupo V)																					
Serratia																					
<i>S. entomophila</i>	0	20	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	100	0	0	100	100	0	100
<i>S. ficaria</i>	0	75	75	100	0	0	0	0	0	0	100	100	55	0	100	0	15	100	100	0	100
" <i>S. fonticola</i> "	0	100	0	91	0	13	0	100	0	97	91	0	70	88	100	79	97	21	100	91	100
Grupo <i>S. flagreficiens</i>	1	93	93	90	0	3	0	95	0	95	95	90	90	2	100	75	10	98	100	0	97
<i>S. marcescens</i>	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	90	95	3	100	55	2	99	99	0	95
<i>S. marcescens</i>	0	100	60	30	0	0	0	55	4	65	17	30	70	0	100	0	4	100	96	0	92
biogrupo 1																					
<i>S. odorifera</i>	60	100	50	100	0	5	0	100	0	100	100	95	60	0	100	0	70	100	100	0	98
biogrupo 1																					
<i>S. odorifera</i>	50	60	100	97	0	0	0	94	0	0	100	94	19	0	100	13	97	0	97	0	45
biogrupo 2																					
<i>S. plymuthica</i>	0	94	80	75	0	0	0	0	0	0	50	60	30	0	100	40	80	100	100	0	94
<i>S. rubida</i>	0	20	100	95	0	2	0	35	0	0	85	90	25	94	100	30	100	99	100	0	99
Shigella																					
<i>S. dysenteriae</i>	45	99	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	5	0
(grupo A)																					
<i>S. flexneri</i>	50	100	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	100	3	1	1	95	1	0
(grupo B)																					
<i>S. boydii</i>	25	100	0	0	0	0	0	0	18	2	0	0	0	0	100	0	1	0	97	5	0
(grupo C)																					
<i>S. sonnei</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	0	0	0	100	0	2	1	99	0	0
(grupo D)																					

FERMENTACIÓN DE ADONITOL	FERMENTACIÓN DE MIOINOSITOL	FERMENTACIÓN DE D-SORBITOL	FERMENTACIÓN DE L-ARABINOSA	FERMENTACIÓN DE RAFINOSA	FERMENTACIÓN DE L-RAMNOSA	FERMENTACIÓN DE MALTOSA	FERMENTACIÓN DE D-XILOSA	FERMENTACIÓN DE TREHALOSA	FERMENTACIÓN DE CELOBIOSA	FERMENTACIÓN DE A-METIL-D-GLUCÓSIDO	FERMENTACIÓN DE ERITRITOL	HIDÓLISIS DE ESCULINA	FERMENTACIÓN DE MELIBIOSA	FERMENTACIÓN DE D-ARABITOL	FERMENTACIÓN DE GLICEROL	FERMENTACIÓN DE MUCCATO	"TARTRATO, DE JORDAN"	UTILIZACIÓN DE ACETATO	LIPASA (ACEITE DE MAÍZ)	DNASA (25 °C)	NITRATO NITRITO	"OXIDASA, DE KOVAC"	PRUEBA DE ONPG	PIGMENTO AMARILLO	FERMENTACIÓN DE D-MANNOSA
0	0	90	0	1	100	95	98	0	0	0	1	0	45	1	0	0	85	1	0	0	98	0	0	0	95
0	0	1	80	10	10	90	70	50	10	0	1	0	0	0	0	50	100	0	0	10	100	0	0	0	100
0	0	95	100	0	100	95	0	100	5	0	0	0	95	0	10	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	10	100	1	100	5	90	90	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	99	2	0	0	97	82	100	0	0	0	0	100	0	20	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100
0	5	100	100	0	100	100	100	100	0	8	0	15	8	0	25	96	50	95	0	0	100	0	15	0	95
0	0	99	99	1	99	98	100	99	1	1	0	1	95	1	10	90	5	90	0	2	100	0	100	0	100
0	0	99	99	1	99	98	100	99	1	1	0	1	95	1	10	30	20	75	0	2	100	0	95	0	100
5	0	100	100	0	98	100	100	100	50	0	0	0	100	5	0	0	65	70	0	0	100	0	0	0	100
0	0	0	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	89	0	33	89	100	89	0	0	100	0	44	0	100
0	0	100	94	0	88	100	100	100	0	0	0	0	94	0	0	88	0	100	0	0	100	0	94	0	100
0	0	0	0	0	0	100	40	100	0	0	0	100	0	60	0	0	100	80	20	100	100	0	100	0	100
0	55	100	100	70	35	100	100	100	100	8	0	100	40	100	0	0	17	40	77	100	92	8	100	0	100
100	30	100	100	100	76	97	85	100	6	91	0	100	98	100	88	0	58	15	0	0	100	0	100	0	100
5	60	95	98	85	15	98	100	100	5	5	0	97	75	0	95	0	75	40	85	85	100	0	95	0	100
40	75	99	0	2	0	96	7	99	5	0	1	95	0	0	95	0	75	50	98	98	98	0	95	0	99
30	30	92	0	0	0	70	0	100	4	0	0	96	0	0	92	0	50	4	75	82	83	0	75	0	100
50	100	100	100	100	95	100	100	100	100	0	0	95	100	0	40	5	100	60	35	100	100	0	100	0	100
55	100	100	100	7	94	100	100	100	100	0	7	40	96	0	50	0	100	65	65	100	100	0	100	0	100
0	50	65	100	94	0	94	94	100	88	70	0	81	93	0	50	0	100	55	70	100	100	0	70	0	100
99	20	1	100	99	1	99	99	100	94	1	0	94	99	85	20	0	70	80	99	99	100	0	100	0	100
0	0	30	45	0	30	15	4	90	0	0	0	0	0	0	10	0	75	0	0	0	99	0	30	0	100
0	0	29	60	40	5	30	2	65	0	0	0	0	55	1	10	0	30	8	0	0	99	0	1	0	100
0	0	43	94	0	1	20	11	85	0	0	0	0	15	0	50	0	50	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	2	95	3	75	90	2	100	5	0	0	0	25	0	15	10	90	0	0	0	100	0	90	0	100

(Continúa)

Cuadro 6-7 Reacciones bioquímicas de especies con nombre y grupos sin nombre de la familia Enterobacteriaceae (cont.)

"MICROORGANISMO"	PRODUCCIÓN DE INDOL	ROJO DE METILO	Voges-Proskauer	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSD)	HIDRÓLISIS DE UREA	FENILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANITOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA
Enterobacter																					
<i>E. proteus</i>	0	0	5	2	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	98	0	0	55
Shigella																					
<i>S. flexnerii</i>	40	100	0	88	100	0	0	100	50	100	100	0	100	0	100	100	0	0	100	0	13
Xanthobacter																					
<i>X. nematophilus</i> (25 °C)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	80	0	0	80	0	0	0	0	0	0
Yersinia																					
<i>Y. aldovae</i>	0	80	0	0	0	60	0	0	0	40	0	0	0	0	100	0	0	20	80	0	0
<i>Y. bercantora</i>	0	100	0	0	0	60	0	0	0	80	0	0	0	0	100	0	20	100	100	0	20
<i>Y. enterocolitica</i>	50	97	2	0	0	75	0	0	0	95	2	0	2	0	100	5	5	95	98	0	20
<i>Y. frederiksenii</i>	100	100	0	15	0	70	0	0	0	95	5	0	0	0	100	40	40	100	100	0	92
<i>Y. intermedia</i>	100	100	5	5	0	80	0	0	0	100	5	0	10	5	100	18	35	100	100	0	100
<i>Y. kristensenii</i>	30	92	0	0	0	77	0	0	0	92	5	0	0	0	100	23	8	0	100	0	15
<i>Y. mollaretii</i>	0	100	0	0	0	20	0	0	0	80	0	0	0	0	100	0	40	100	100	0	20
<i>Y. parva</i>	0	80	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	97	0	70
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0	100	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	25
<i>Y. ruckeri</i>	0	62	0	0	0	62	0	0	0	25	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
" <i>Y. ruckeri</i> "	0	97	10	0	0	0	0	30	5	100	0	30	15	0	100	5	0	0	100	0	0
Yokenella																					
<i>Y. regensburgii</i> (<i>Kosmetella tubulsi</i>)	0	100	0	92	0	0	0	100	8	100	100	0	92	0	100	100	0	0	100	0	8
Grupo entérico 58	0	100	0	85	0	70	0	100	0	85	100	0	100	85	100	85	30	0	100	85	100
Grupo entérico 59	10	100	0	100	0	0	30	0	60	0	100	0	80	90	100	100	80	0	100	0	100
Grupo entérico 60	0	100	0	0	0	50	0	0	0	100	75	0	0	100	100	100	0	0	50	0	0
Grupo entérico 68	0	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	100	0	50
Grupo entérico 137	100	100	0	0	0	70	0	0	20	100	100	0	100	0	100	0	100	100	100	0	100

*Cada número es el porcentaje de reacciones positivas luego de dos días de incubación a 36 °C salvo indicación contraria (licuefacción de gelatina y desoxirribonucleasa, y todas las reacciones de las especies de *Xanthobacter* y *P. luminescens* y *Yersinia ruckeri*). La mayoría de las reacciones positivas ocurren dentro de las primeras 24 horas. No se consideran las reacciones que se tornan positivas después de dos días.

†Todos los datos de los Centers for Disease Control, excepto *E. alberti*; ¹*E. crassus*; ²⁰*P. hauseri* ²¹ y grupo entérico 137. ²²

TSD: agar hierro triple azúcar; ONPG: α -nitrofenil- β -D-galactopiranosidasa; ND: no disponible.

sanguinolenta. Las heces pueden tornarse sanguinolentas luego de 1 a 2 días y la cantidad de sangre varía desde algunas pequeñas estrías hasta heces que constituyen casi por completo sangre. Se presentan vómitos en el 30-60% de los casos y la fiebre es leve o está ausente.³¹⁵ Se ha comunicado síndrome urémico-hemolítico luego de una infección urinaria por EHEC;^{121,130} sin embargo, debido a su baja prevalencia, no parece justificado realizar pruebas de rutina de los aislados urinarios de *E. coli* sorbitol-negativos para la presencia de toxina Shiga.^{477,500} En la

actualidad, no se recomiendan los antibióticos para el tratamiento de las infecciones por *E. coli* O157 debido a la preocupación de que su uso aumente la producción de toxinas Shiga. Los genes para estas toxinas son codificados por bacteriófagos y los antibióticos que producen inducción de bacteriófagos (p. ej., fluoroquinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y furazolidona) pueden aumentar la expresión de Stx. En vista de estas cuestiones, se recomienda a los laboratorios no comunicar los resultados de la sensibilidad a los antibióticos para los aislados

FERMENTACIÓN DE ADONITOL	FERMENTACIÓN DE MIOINOSITOL	FERMENTACIÓN DE D-SORBITOL	FERMENTACIÓN DE L-ARABINOSA	FERMENTACIÓN DE RAFINOSA	FERMENTACIÓN DE L-RAMINOSA	FERMENTACIÓN DE MALTOSA	FERMENTACIÓN DE D-XILOSA	FERMENTACIÓN DE TREHALOSA	FERMENTACIÓN DE CELOBIOSA	FERMENTACIÓN DE α-METIL-D-GLUCÓSIDO	FERMENTACIÓN DE ERITRITOL	HIDROLISIS DE ESCULINA	FERMENTACIÓN DE MELIBIOSA	FERMENTACIÓN DE D-ARABITOL	FERMENTACIÓN DE GLICEROL	FERMENTACIÓN DE MUCATO	"TARTRATO, DE JORDAN"	UTILIZACIÓN DE ACETATO	LIPASA (ACEITE DE MAÍZ)	DNASA (25 °C)	NITRATO NITRITO	"OXIDASA, DE KOVAC"	PRUEBA DE ONPG	PIGMENTO AMARILLO	FERMENTACIÓN DE D-MANNOSA
0	0	0	0	13	0	0	9	93	0	0	0	0	25	0	7	0	0	0	0	0	98	0	0	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	40	0	0	0	100	50	88	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	20	20	0	0	60	80
0	0	60	60	0	0	0	40	80	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100
0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	0	0	20	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	80	0	100
0	30	99	98	5	1	75	70	98	75	0	0	25	1	40	90	0	83	13	55	5	95	0	95	0	100
0	20	100	100	30	99	100	100	100	100	0	0	85	0	100	85	5	55	15	55	0	100	0	100	0	100
0	15	100	100	45	100	100	100	100	96	77	0	100	80	45	60	6	88	18	12	0	94	0	90	0	100
0	15	100	77	0	0	100	85	100	100	0	0	0	0	45	70	0	40	8	0	0	100	0	70	0	100
0	0	100	100	0	0	60	60	100	100	0	0	0	0	0	20	0	100	0	0	0	100	0	20	0	100
0	0	50	100	0	1	80	90	100	0	0	0	50	20	0	50	0	0	0	0	0	85	0	50	0	100
0	0	0	50	15	70	95	100	100	0	0	0	95	70	0	50	0	50	0	0	0	95	0	70	0	100
0	0	100	100	62	0	0	38	100	25	0	0	0	50	0	38	0	100	0	0	0	88	0	50	0	100
0	0	50	5	5	0	95	0	95	5	0	0	0	0	0	30	0	30	0	30	0	75	0	50	0	100
0	0	0	100	25	100	100	100	100	100	0	0	67	92	0	0	0	0	25	0	0	100	0	100	0	100
0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	55	0	0	0	0	30	0	60	45	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	100	0	100	100	100	100	100	10	0	100	0	10	10	60	50	50	0	0	100	0	100	25	100
0	0	0	25	0	75	0	0	100	0	0	0	0	0	0	75	0	75	0	0	0	100	0	100	0	100
0	0	0	0	0	0	50	0	100	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100
0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	80	0	100	100	0	100	100	50	100	0	0	100	0	100	0	100

de *E. coli* O157 u otros aislados de *E. coli* productores de toxina Shiga.^{267,108}

Epidemiología de *E. coli* enterohemorrágica. A comienzos de 1993, se produjo el brote más grande de intoxicación alimentaria por *E. coli* hasta la fecha causado por *E. coli* O157:H7 en los estados de Washington, Idaho, California y Nevada. En conjunto, se comunicaron 582 casos confirmados por cultivo que produjeron 171 hospitalizaciones, 41 casos de síndrome urémico-hemolítico y 4 muertes. Se implicó a las

hamburguesas de una única cadena de restaurantes de comidas rápidas. Se considera que el origen de la mayoría de las enfermedades relacionadas con *E. coli* en los Estados Unidos es la carne de vaca molida. Las hamburguesas en particular han sido la causa de múltiples brotes de enfermedad. Esto se debe a la alta prevalencia de infecciones por *E. coli* O157:H7 en las vacas. Para un resumen de los factores de riesgo durante todos los pasos de la producción de carne vacuna en escala industrial desde la granja hasta el tenedor véase la revisión de Meyer-

Cuadro 6-8 Características claves de *E. coli* diarreicogénica^{146,329}

TÉRMINO	ABREVIATURA	FENOTIPO PATÓGENO	SIGNOS Y SÍNTOMAS
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	ETEC	Elaboración de enterotoxinas termolábiles y/o termoinestables secretoras que no dañan el epitelio mucoso. La producción de toxina está mediada por plásmidos y suele involucrar <i>E. coli</i> serogrupos O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O92, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159 y O167. ¹⁴⁶ Desde 1996 hasta 2003, ocurrieron 16 brotes de infecciones por ETEC en los Estados Unidos y en barcos de crucero. <i>E. coli</i> O169:H41 fue identificada en 10 brotes. Este serotipo se identificó en 1 de 21 brotes confirmados por ETEC antes de 1996 ¹⁴⁶	Asociados con dos síndromes clínicos importantes: "diarrea (del destete)" los niños de los países en vías de desarrollo y "diarrea del viajero". Tienen un inicio brusco típico con período corto de incubación (14-50 horas). La diarrea acuosa profusa es el síntoma predominante (similar a <i>Vibrio cholerae</i>), casi siempre sin sangre, moco ni pus. A menudo se acompaña por cólicos abdominales leves. La deshidratación y los vómitos ocurren en algunos casos
<i>E. coli</i> enteropatógena	EPEC	Se adhieren a las células epiteliales intestinales en microcolonias localizadas que producen lesiones histopatológicas características conocidas como "lesiones de fijación y desprendimiento" serogrupos O55, O86, O111, O119, O126, O127, O128ab y O142 son los involucrados con mayor frecuencia ¹⁴⁹ invaden las células epiteliales colónicas	Habitualmente ocurre en lactantes. Se caracteriza por fiebre leve, malestar general, vómitos y diarrea acuosa profusa, con gran cantidad de moco, pero sin sangre macroscópica. Se observan leucocitos en las heces sólo a veces
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC	La patogenia es casi idéntica a la de las especies de <i>Shigella</i> . Como sucede con <i>Shigella</i> , la mayoría de las cepas son inmóviles, fermentadoras tardías o no fermentadoras de la lactosa y anaerógenas. Los serogrupos involucrados con mayor frecuencia son O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152 y O164 ¹⁴⁹	La infección se presenta principalmente como diarrea acuosa, indistinguible de la ETEC. Algunos pacientes presentan un síndrome disenterico; los puntos sobresalientes son fiebre y colitis. Los síntomas son necesidad imperiosa de defecar y tenesmo rectal; sangre, moco y muchos leucocitos en las heces
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	EHEC	Elaboración de toxinas Shiga, una enterolisina y, tal como EPEC, producen lesiones A/E. El serotipo más frecuente es O157:H7	Diarrea sanguinolenta sin leucocitos. A menudo sin fiebre. El dolor abdominal es frecuente. Puede progresar hasta el síndrome urémico hemolítico
<i>E. coli</i> enteroagregante	EAEC	Se adhieren a las células epiteliales en un patrón que se asemeja a una pila de ladrillos y producen una toxina similar a ST (EAST1), toxina termolábil y factores de colonización de las fibras denominados fimbrias de adherencia agregante (AAF)	Enfermedad diarreica secretora mucóide acuosa con fiebre leve y poco o ningún vómito. Las deposiciones suelen ser sin sangre macroscópica ni leucocitos fecales. Se recupera principalmente de niños con diarrea crónica ^{146,372}
<i>E. coli</i> difusamente adherente	DAEC	Se adhieren a las células epiteliales en un patrón difuso y transportan un gen que codifica las fimbrias de superficie designadas F1845	La mayoría de los pacientes tienen diarrea acuosa sin sangre ni leucocitos fecales

Broseta y cols.³²¹ Según encuestas recientes de canastas de mercado, *E. coli* O157:H7 está presente en el 1,0-2,5% de las muestras de carne y de aves. También se presenta con menor frecuencia en muestras de cordero y cerdo en los supermercados, aunque estos aislados podrían surgir por contaminación secundaria en el área de carnicerías. En los Estados Unidos, los casos tendieron a ocurrir en los dos últimos tercios del año y en los estados limítrofes con Canadá. La infección persiste en los reservorios animales en parte porque el microorganismo sobrevive en el suelo durante largos períodos. Otros animales, como cerdos, ovejas, ciervos y conejos, también portan EHEC, y muchos otros alimentos y el agua se pueden contaminar con las heces de animales infectados.^{185,350} Como resultado se produje-

ron brotes en los que tuvieron participación suministros municipales de agua,³⁶⁸ carnes de venado,⁴⁰⁹ verduras crudas, requesón,⁹⁷ sidra de manzana⁹¹ y brotes de alfalfa.^{39,327} Además, como cantidades increíblemente bajas de estos microorganismos pueden causar enfermedad, han ocurrido infecciones por transmisión entre personas en familias y guarderías, entre los niños durante las visitas a granjas lecheras,⁹⁸ en zoológicos donde se puede tocar a los animales³¹⁸ y entre individuos expuestos a aserrín y otros materiales del suelo en ferias de exposiciones de animales.⁴⁰⁶ Si bien O157:H7 es el prototipo del serotipo de EHEC en los Estados Unidos, se han reconocido en otros países otros distintos serotipos como O26:H11, O48:H21, O103HH2, O111:NM (inmóvil) y O145:NM.^{153,252,293}

RECUADRO DE CORRELACIONES CLÍNICAS 8-1 **Colitis hemorrágica y síndrome urémico-hemolítico**

El síndrome urémico-hemolítico es una enfermedad trombotica de la microvasculatura renal en la cual la célula endotelial es el sitio primario de daño. Se define por una tríada de características: 1) aparición de eritrocitos fragmentados (anemia hemolítica microangiopática), 2) reducción del recuento de plaquetas (trombocitopenia) y 3) insuficiencia renal aguda, que se pone en evidencia por un índice de filtración glomerular reducido y volumen urinario bajo. El síndrome urémico-hemolítico es la causa principal de insuficiencia renal aguda en los niños. En su forma más frecuente, este síndrome está precedido por una enfermedad diarreica que se presenta con dolor abdominal grave, vómitos y diarrea acuosa. La diarrea adquiere luego estrías sanguinolentas o se vuelve microscópicamente sanguinolenta y, a pesar de las pruebas de colitis, los niños tienen poca fiebre o ninguna. Este conjunto de signos y síntomas se denomina **colitis hemorrágica**. En los casos más graves, puede ocurrir una colitis isquémica con perforación. En algunos pacientes, se puede desarrollar una estenosis colónica luego de la colitis isquémica. Los microorganismos EHEC colonizan el intestino grueso a través de la formación de lesiones diferenciadas de fijación y borramiento que proporcionan una unión estrecha entre EHEC y la superficie de las células epiteliales intestinales. El desarrollo de lesiones de fijación y borramiento requiere muchos genes que se localizan sobre un islole de patogenicidad cromosómico de 35 kb denominado locus de borramiento del enterocito. Luego de la colonización, EHEC produce toxinas Shiga que se translocan en la circulación, tal vez facilitadas por el ingreso (transmigración) de neutrófilos. Una vez en la circulación, la toxina Shiga viaja hasta los riñones, donde es transferida y se une a través de las subunidades B de la toxina a receptores para el glucolípid neuro glícosídesilceramida (Gb₃) sobre las células diana (células endoteliales glomerulares y células epiteliales tubulares). Luego la toxina es internalizada y se dirige al retículo endoplasmático, donde la subunidad A única inactiva enzimáticamente los ribosomas y produce inhibición de la síntesis proteica y daño celular. Esto conduce a la tumefacción de las células endoteliales glomerulares y al desprendimiento de la membrana basal subyacente con activación secundaria tanto de las plaquetas como de la cascada de la coagulación.

Esta secuencia de acontecimientos da lugar a los signos clásicos del síndrome urémico-hemolítico mediado por toxina Shiga. La cascada de la coagulación conduce al depósito de fibrina, lo que produce estrechamiento de los capilares y cizallamiento de eritrocitos cuando intentan atravesar los vasos dañados. El cizallamiento y el desgarramiento de los eritrocitos lleva a los eritrocitos fragmentados típicos de la anemia hemolítica microangiopática. El consumo de plaquetas causa trombocitopenia y la anemia, junto con el flujo sanguíneo restringido en los riñones, deriva en insuficiencia renal.⁴⁴⁷ No existe ningún tratamiento comprobado fuera de la asistencia de sostén. El tratamiento antibiótico de los niños con infección por *E. coli* O157:H7 aumenta el riesgo de síndrome urémico-hemolítico y, por lo tanto, debe evitarse.³⁸

En la actualidad se realizan investigaciones para desarrollar anticuerpos específicos contra las toxinas Shiga con el fin de bloquear su unión a las células endoteliales y los análogos sintéticos de los receptores de Gb₃ que se pueden administrar por vía oral, atrapar las toxinas en el intestino y evitar así su ingreso en la circulación.^{236,448}

Los serotipos no-O157 de EHEC son raros en los Estados Unidos, pero se comunicó un brote de colitis hemorrágica producida por EHEC serotipo O104:H21 en 11 pacientes en Helena, Montana en 1994.⁴⁰ Otro brote ocurrió entre acampantes adolescentes en Texas en junio de 1999, causado por EHEC serotipo O111:H8, en el cual 55 acampantes se enfermaron y se desarrolló síndrome urémico-hemolítico en dos.^{61,96} *E. coli*

O111 es la segunda STEC no-O157 en frecuencia comunicada en los Estados Unidos,⁶² y una de las más frecuentes en Europa.⁶⁵ Para saber más sobre las infecciones causadas por EHEC se pueden consultar las revisiones de Kaper y O'Brien,²⁵⁴ Mead y Griffin,³¹⁵ Nataro y Kaper,³³⁹ Paton y Paton,³⁸⁰ y Tarr.⁴⁶⁹

Detección de *E. coli* enterohemorrágica. El aislamiento de *E. coli* O157:H7 sólo es posible durante la fase aguda de la enfermedad y los microorganismos pueden no detectarse 5-7 días después del inicio. Como la mayoría de las infecciones por EHEC son causadas por *E. coli* serotipo O157:H7, los abortajes actuales de laboratorio se basan en la detección de cepas productoras de la toxina Shiga o la detección del serotipo O157:H7. Los métodos actuales para la detección pueden resumirse así: 1) ensayos para la detección del serotipo O157^{294,376,458} o toxinas Shiga^{259,299,346} directamente de las heces; 2) siembra directa en agar de MacConkey sorbitol (SMAC),³⁰⁶ cefixima-SMAC,¹⁰⁸ SMAC complementado con cefixima y telurito (CT-SMAC)²¹⁴ o medios que contienen 5-bromo-5-cloro-3-indoxil-β-D-glucuronida³⁶⁷ o 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronida⁴⁷⁶ y 3) separación inmunomagnética utilizando esferas revestidas con anticuerpos específicos de O157, seguida de cultivo bacteriológico.^{109,225} Muchos laboratorios en los Estados Unidos y en otros sitios utilizan agar de MacConkey-sorbitol (SMAC) para identificar el fenotipo de fermentación lenta del sorbitol (sorbitol negativo a las 24 horas) de O157:H7. El agar SMAC contiene D-sorbitol al 1% en lugar de lactosa para diferenciar las cepas de *E. coli* sorbitol negativas (las colonias aparecen incoloras, similares a las colonias lactosa negativas en agar de MacConkey regular). Luego los aislamientos sospechosos son confirmados con antiseros O157:H7 específicos. Sin embargo, este medio no detecta otros serotipos EHEC sorbitol-positivos. Otros métodos de detección como medio cromogénico y métodos ELISA para la detección de toxina Shiga son más sensibles y específicos pero mucho más caros que SMAC.^{345,376} La incorporación de esta prueba en el laboratorio de microbiología de rutina implica un costo adicional importante y es posible que los laboratorios deseen limitar las pruebas a los pacientes con máximo riesgo. Kehl propuso una mini-revisión sobre el papel del laboratorio en el diagnóstico de infecciones por EHEC.²⁸⁰

Especies distintas de *E. coli*. Las cepas designadas en la clasificación de los CDC como *E. coli* inactivas son anaerógenas (no productoras de gas), lactosa negativas (o tardías) e inmóviles. Estas cepas se conocían antes como serotipo Alkalescens-Dispar.

E. albertii es una especie recién descrita de enterobacterias indoi negativas, D-sorbitol negativas y lactosa negativas aisladas en heces diarreicas de niños.²³³ Como estas cepas no están incluidas en las bases de datos de los sistemas comerciales actuales, se las identifica más a menudo como *Hafnia*, *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Yersinia ruckeri*.³ *E. albertii* se asemeja principalmente a *E. coli* inactiva, aunque no se asemeja al grupo Alkalescens-Dispar debido a su capacidad para producir gas a partir de D-glucosa. Puede separarse de *D. alvei* sobre la base de la asimilación de acetato, la prueba de Voges-Proskauer negativa y la falta de crecimiento en cianuro de potasio (KCN). Además, *E. albertii* muestra reacciones débiles a moderadas a L-prolineaminopeptidasa (PYR), mientras que *H. alvei* expresa una actividad fuerte de PYR.³ Se debe aconsejar al personal del laboratorio que las cepas aisladas en muestras de heces que proporcionen una identificación negativa en primera instancia para *H. alvei* y que sean L-ramnosa negativas, D-xilosa negativas y Voges-Proskauer negativas deben evaluarse mejor para descartar *E. albertii*.

E. fergusonii (antes grupo entérico 10 de los CDC) fue recuperado de sangre, vesícula biliar, orina y heces; sin embargo, no se ha establecido aún su importancia clínica.^{165,166,179,180,413} Se diferencia de *E. coli* por las pruebas de sorbitol negativa y lactosa negativa, pero adonitol positiva y celobiosa positiva.

E. hermanii (antes grupo entérico 11 de los CDC) fue hallado principalmente en heridas, esputo y heces humanos.³⁹⁴ De las ocho cepas aisladas en el University of Illinois Medical Center, cinco han sido de muestras de heridas, que incluyeron cuatro heridas de las piernas en pacientes con celulitis y una herida de un dedo de la mano y se ha aislado una cepa en orina, senos maxilares y sangre. Las cepas aisladas de las heridas estaban mezcladas con otras especies de patógenos; sin embargo, las de sangre, orina y senos paranasales estaban presentes como cepas únicas. Ginsberg y Daum³⁹⁴ comunicaron la recuperación de *E. hermanii* de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido peritoneal de un recién nacido séptico con perforación intestinal; no obstante, se recuperaron otros microorganismos de la sangre y el papel patogénico en este paciente fue incierto. El único caso documentado de enfermedad invasiva causada por *E. hermanii* es de un recién nacido con una infección bacteriana de un cefalohematoma con meningitis documentada mediante cultivo de múltiples muestras de LCR y líquido aspirado de un cefalohematoma en crecimiento.¹²⁶ Las cepas de *E. hermanii* tienen pigmento amarillo y son indol positivas y sorbitol negativas.⁵⁰ Como *E. hermanii* son sorbitol negativas, parecen bioquímicamente similares al serotipo O157 de *E. coli*.

E. vulneris (antes grupo entérico 1 de los CDC) tiene alta propensión a producir infecciones en las heridas humanas, sobre todo en los brazos y las piernas,^{34,394} que pueden conducir a osteomielitis.²⁵³ Además, existen comunicaciones de urosepsis y bacteriemia relacionada con catéteres intravenosos causada por *E. vulneris*.^{19,239,455} Se observó un caso de bacteriemia por *E. vulneris* en un lactante de 40 días en el University of Illinois Medical Center. Más del 50% de las cepas tienen pigmento amarillo y son tanto indol negativas como sorbitol negativas.

E. blattae, aislado del tubo digestivo de las cucarachas, es indol negativo y no fermenta la lactosa. No ha se ha asociado con infecciones humanas.

E. adecarboxylata ha sido asignado a un género nuevo como *Leclercia adecarboxylata*.⁴⁶⁷ En el cuadro 6-9 se muestran las diferentes reacciones bioquímicas para las especies reconocidos de *Escherichia*.

Género *Shigella*. Las especies de *Shigella* pueden sospecharse en cultivos porque son no fermentadoras de la lactosa y tienden a ser bioquímicamente inertes. En los casos típicos, no producen gas a partir de hidratos de carbono, con excepción de ciertos biogrupos de *S. flexneri* que son aerógenos. Pocas cepas de *S. sonnei* pueden fermentar lentamente la lactosa (2%) y la sacarosa (1%) y la mayoría de las cepas pueden descarboxilar ornitina, características no compartidas por otras especies de *Shigella*.

Existen cuatro subgrupos mayores y 43 serotipos reconocidos de *Shigella* como se muestra en el recuadro 6-9.⁷⁸ La clasificación de los CDC combina *S. dysenteriae* (grupo A), *S. flexneri* (grupo B) y *S. boydii* (grupo C) como "*Shigella* serogrupos A, B y C" debido a sus similitudes bioquímicas. Debido a la presencia de actividad de ornitina descarboxilasa y β -galactosidasa, la mayoría de las cepas de *S. sonnei* son bioquímicamente distintas de las otras especies de *Shigella*. La incapacidad para fermentar el manitol distingue a *S. dysenteriae*. En el cuadro 6-10 se incluyen las características diferenciales de las

cuatro especies de *Shigella*. Cuando se sospechan especies de *Shigella*, las cepas aisladas de las muestras de heces de pacientes con diarrea deben ser categorizadas bioquímicamente y las especies deben confirmarse mediante pruebas serológicas. En un futuro cercano, quizá sea posible detectar especies de *Shigella* y cepas enteroinvasivas de *E. coli* utilizando sondas de DNA seleccionadas para detectar los plásmidos de virulencia responsables de codificar los productos genéticos que inician la penetración celular y la invasión de la pared intestinal.⁴³

Incidencia y fuentes de las infecciones por *Shigella*. La shigelosis es la más contagiosa de las diarreas bacterianas. Los seres humanos sirven como huésped natural, la enfermedad es transmitida por la vía fecal-oral y se requieren tan sólo 200 microorganismos viables para producir enfermedad. Se comunican entre 20 000 y 30 000 casos de shigelosis anuales en los Estados Unidos.¹⁰⁴ *S. sonnei* es el serotipo asociado con mayor frecuencia con diarrea en ese país y representó el 77% de los serogrupos de *Shigella* comunicados a los CDC en 2001.⁷⁸ Los síntomas relacionados con la infección por *S. sonnei* tienden a ser leves y algunos pacientes pueden estar asintomáticos. *S. dysenteriae* es la especie recuperada menos a menudo en los Estados Unidos, pero es el serotipo más virulento y el serotipo más frecuente aislado en los países en vías de desarrollo. Es posible que la idea de que las especies de *Shigella* siguen estando limitadas al intestino y que ninguna invade los linfáticos intestinales ni se extiende a otros órganos ya no sea pertinente. Drow y cols.¹³⁸ comunicaron la recuperación de *S. flexneri* de un absceso esplénico en un paciente con diabetes, lo que indica que se pueden hallar sitios extraintestinales de infección. Las muestras distintas de heces de donde se han aislado especies de *Shigella* incluyen hígado, ganglios linfáticos mesentéricos, LCR, líquido sinovial, lesiones vaginales, pulmones, sacos conjuntivales, raspados corneales, sangre, lesiones cutáneas del cuerpo del pene y orina.^{141,374} Las infecciones de las vías urinarias debidas a especies de *Shigella* en adultos son excepcionales. Se ha comunicado vaginitis por *Shigella* con infección de las vías urinarias asociada o sin ella en niñas prepúberes.²³ Algunas pacientes experimentan una secreción vaginal sanguinolenta que puede confundirse con gonorrea.⁴⁹³ La mayoría de los casos de vulvovaginitis por *Shigella* son causados por *S. flexneri*.³³⁵

TRIBU EDWARDSIELLEAE

Edwardsiella fueron denominados inicialmente grupo Asakusa por Sakazaki y Murata en 1963⁴³³ y grupo Bartholomew por King y Adler en 1964.²⁸⁸ Ewing y cols. sugirieron el nombre *Edwardsiella* en 1965,¹⁵⁸ en honor del sobresaliente microbiólogo norteamericano P. R. Edwards. *Edwardsiella* consiste en un género, *Edwardsiella*, que tiene tres especies; sin embargo, sólo *E. tarda* tiene importancia médica. Los principales reservorios en la naturaleza son los reptiles (sobre todo víboras, sapos y tortugas) y los peces de agua dulce. Las características claves que sugieren *E. tarda* se proporcionan en el cuadro 6-6.

Una característica clave de *E. tarda* es la producción de abundantes cantidades de sulfuro de hidrógeno. Salvo por esta característica, la bacteria tiene propiedades bioquímicas similares a las de *Escherichia coli*. El microorganismo también se asemeja a algunas especies de *Citrobacter* y *Salmonella* por su producción de sulfuro de hidrógeno en agar triple azúcar-hierro y su falta de utilización de lactosa. Esta falta de fermentación de lactosa y muchos otros hidratos de carbono es la base para el nombre de la especie *tarda*. Una especie similar de *E.*

Cuadro 6-9 Diferenciación de las especies dentro del género *Escherichia*

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>E. albertii</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>
Indol	-	-	+	+	+	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	V (50)	-	V (17)	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	-	V (85)
Arginina dihidrolasa	-	-	V (17)	-	-	V (30)
Ornitina descarboxilasa	+	+	V (65)	+	+	-
ONPG	+	-	+	(V 83)	+	+
Fermentación de:						
Lactosa	-	-	+	-	V (45)	V (15)
Sorbitol	-	-	+	-	-	-
Manitol	+	-	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	+	-	-
Celobiosa	-	-	-	+	+	+
Pigmento amarillo	-	-	-	-	+	V (50)

*Las cepas de *E. coli* pertenecientes al serotipo O157:H7 son sorbitol negativas.
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas.

tarda que es sulfuro de hidrógeno negativa, pero manitol positiva, sacarosa positiva y arabinósido positiva, ha sido designada "*E. tarda* biogrupo 1".¹⁶⁹ Este biotipo pocas veces se encuentra en la práctica de laboratorio y aún no parece tener importancia clínica.

E. tarda ha sido citado como causa de distintas infecciones extraintestinales.^{117,451} Las más frecuentes son las infecciones de heridas como resultado de traumatismo, a menudo relacionado con accidentes acuáticos. También son frecuentes los abscesos que pueden conducir a bacteriemia o mionecrosis.⁴⁵¹ Siete pacientes en un estudio tuvieron enfermedades tifoideas, una consideración diferencial importante porque *E. tarda* puede simular *Salmonella typhi* en cultivo.¹⁸⁷ La mayoría de las comunicaciones de enfermedad entérica describen una gastroenteritis leve que mejora sin tratamiento al cabo de 2 a 3 días. Sin embargo, Valdepitte y cols.⁴⁸⁴ comunicaron un caso de diarrea prolongada en un lactante de 2 meses de vida en el cual *E. tarda* (del mismo biogrupo aislado de un pez de acuario tropical en el hogar del paciente) fue el único patógeno potencial aislado. Marsh y Gorbach³³⁷ comunicaron el aislamiento de *E. tarda* de las heces de un paciente con diarrea sanguinolenta y hallazgos sigmoidoscópicos de múltiples úlceras colónicas y engrosamiento mucoso compatible con enfermedad de Crohn. El paciente se volvió asintomático después de 2 días de tratamiento antibiótico. Se ha considerado que la disponibilidad de hierro regula la gravedad de la infección por *E. tarda*.^{242,243} La sobrecarga de hierro, causada por trastornos como eritrocitos falciformes, leucemia y cirrosis, se asocia con septicemia por *E. tarda*.^{242,506,511} También se ha comunicado infección por *E. tarda* relacionada con prótesis vasculares.^{123,243} Se cree que ocurren en los seres humanos brotes de infecciones asintomáticas por *E. tarda* y se informó al menos uno de estos brotes entre siete niños y un maestro en una guardería de Florida.¹³²

Se describieron otras dos especies del género *Edwardsiella*. Grimont y cols.²⁶⁷ describieron *E. hoshinae*, aislada inicialmente en aves, reptiles y en el agua. Esta especie también fue aislada en heces humanas; sin embargo, no se conoce que produzca diarrea. Hawke y cols.²¹⁴ describieron *E. ictaluri*, un microorganismo que ha sido aislado sólo en peces y, en la

actualidad, no tiene importancia clínica. En el cuadro 6-11 se muestra la caracterización bioquímica de las especies de *Edwardsiella*.

TRIBU SALMONELLEAE

Salmonelleae contienen un único género, *Salmonella* y reciben el nombre del microbiólogo estadounidense D. E. Salmon. Las salmonelas tienen antígenos somáticos (O) que son lipopolisacáridos y antígenos flagelares (H) que son proteínas. *S. typhi* tiene también un antígeno capsular o de virulencia (Vi). Desde el punto de vista de las pruebas bioquímicas, suelen ser

RECUADRO DE CORRELACIONES CLÍNICAS 6-2

Infección por *Shigella* (disentería bacilar)

El término "disentería" fue utilizado por Hipócrates para indicar un trastorno caracterizado por la evacuación frecuente de heces que contienen sangre y moco acompañadas por tenesmo y defecación dolorosa.¹⁴² Los seres humanos constituyen el único huésped natural para *Shigella* y la infección ocurre por ingestión. La disentería bacilar es la más transmisible de las diarreas bacterianas y una dosis infectante de tan sólo 10-100 bacterias produce enfermedad en los adultos sanos.¹⁴³ La fiebre, la diarrea acuosa con dolor abdominal cólico y las mialgias generalizadas constituyen los síntomas tempranos más frecuentes que sugieren shigelosis.⁶⁶ También se pueden observar pérdidas de líquidos y electrolitos al comienzo de la enfermedad, debido a la acción de la enterotoxina sobre las células epiteliales intestinales. Después de 2 a 3 días, los movimientos intestinales se tornan menos frecuentes y la cantidad de las deposiciones disminuye, pero la presencia de sangre roja brillante y moco en las heces y el inicio de tenesmo (esfuerzos de defecación) indican la fase disentérica de la enfermedad, lo que sugiere que probablemente ha ocurrido la penetración bacteriana en el intestino. Se deben sospechar infecciones por *Shigella* en los brotes comunitarios de enfermedad diarreica que afectan en forma desproporcionada a los niños pequeños. Los brotes pueden ocurrir en cualquier momento del año, pero son más frecuentes en el verano.

Cuadro 6-10 Diferenciación de las especies dentro del género <i>Shigella</i>				
PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Serogrupo	A	B	C	D
ONPG	—	—	—	+
Omitina descarboxilasa	—	—	—	+
Fermentación de:				
Lactosa	—	—	—	—
Manitol	—	+	+	+
Rafinosa	—	D	—	—
Sacarosa	—	—	—	—
Xilosa	—	—	D	—
Producción de indol	D	D	D	—

+; 90% o más de cepas positivas; —; 90% o más de cepas negativas; D: diferentes cepas positivas/negativas.

tanto lactosa negativas como sacarosa negativas. Las características claves por las cuales se puede sospechar el género *Salmonella* se proporcionan en el cuadro 6-6.

Clasificación de Salmonellas. Desde el momento del primer aislamiento de microorganismos del grupo *Salmonella*, comunicado en 1884 por Gaffky (*Bacterium typhosum*) y en 1886 por Salmon y Smith (*Salmonella choleraesuis*) el desarrollo de la nomenclatura de las salmonelas ha sido muy complejo y es un tema de debate (recuadro 6-10). Las salmonelas son las enterobacterias más complejas, con más de 2 400 serotipos descritos en el esquema actual de Kauffmann-White.⁴⁰² Antes del 1º de julio de 1983, se utilizaban tres especies de *Salmonella* para comunicar resultados positivos: *S. choleraesuis*, *S. typhi* y *S. enteritidis*, y la mayoría de los serotipos pertenecían a esta última especie. En la actualidad, todas las especies y subgrupos anteriores de *Salmonella* y *Arizona* se consideran de la misma especie, pero pueden separarse en siete taxones que representan seis subgrupos. La única excepción es *S. bongori*, antes conocido como subgénero V, el cual por la hibridación de DNA-DNA es una especie distinta.⁴¹⁴ Por lo tanto, existen dos especies y seis subespecies de *S. enterica* en el sistema actual utilizado por los CDC (recuadro 6-11). En el cuadro 6-12 se proporcionan las características diferenciales de las especies y las subespecies de *Salmonella*.

Nomenclatura de Salmonellas. Desde 1966, la OMS comenzó a denominar a los serotipos sólo en subespecies I y abandonó todos los nombres de serotipos existentes en las otras subespecies. Los CDC siguen esta práctica y utilizan nombres para los serotipos en la subespecie I y fórmulas antigénicas para los serotipos sin nombre descritos después de 1966 en las subespe-

cies II, IV y VI y *S. bongori*. Para los serotipos con nombre, destaquemos que no son especies separadas, el nombre con serotipo no se escribe en bastardilla y la primera letra se pone en mayúsculas. En la primera mención de un serotipo el nombre del género se da seguido por la palabra “serotipo” o por la abreviatura “ser” y luego el nombre del serotipo (*Salmonella* serotipo o ser. Typhimurium). Posteriormente, el nombre se puede escribir con el género seguido directamente por el nombre del serotipo *Salmonella* Typhimurium o *S. Typhimurium* (recuadro 6-12).

En la práctica cotidiana, las cepas desconocidas de muestras clínicas que sean sugestivas desde el punto de vista bioquímico de especies de *Salmonella* se confirman utilizando antisueños policlonales que contienen anticuerpos contra todos los subgrupos principales. Los subcultivos de cepas confirmadas se remiten a laboratorios de salud pública, donde las designaciones de los serotipos (p. ej., *S. serotipo* Typhimurium) se hacen sobre la base de las reacciones serológicas a los determinantes O y H.

Identificación de Salmonella typhi. Si bien la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no pueden ser distinguidos mediante reacciones bioquímicas, un serotipo, denominado *S. typhi*, tiene algunas características bioquímicas singulares que permiten diferenciarlo de otros serotipos. Primero y ante todo está la observación de que algunas cepas de *S. typhi* producen sólo una pequeña cantidad de sulfuro de hidrógeno, el cual se suele observar como una cuña semilunar de precipitado negro que se forma en la interfaz de la porción inclinada y el extremo en los medios KIA y TSI (lámina en color 6-4B). Además, se observa que las cepas de *S. typhi* son menos activas bioquímicamente que los serotipos más frecuentes y específicamente son negativas en las siguientes reacciones: citrato de Simmon; omitina descarboxilasa; gas proveniente de glucosa; fermentación de ducitol, arabinosa y ramnosa; y utilización de mucato y acetato. En consecuencia, creemos que la mayoría de los laboratorios pueden realizar un informe preliminar de *S. typhi* o de especies de *Salmonella* distintas de *S. typhi* mientras se espera la confirmación serológica específica del laboratorio local de salud pública.

Incidencia y fuentes de las salmonelosis. La salmonelosis es una causa importante de enfermedad entérica bacteriana tanto en seres humanos como en animales (véase recuadro de correlación clínica 6-3). Se estima que ocurren 1,4 millones de casos anuales de salmonelosis en seres humanos en los Estados

Recuadro 6-9 Subgrupos, serotipos y subtipos de <i>Shigella</i>	
Subgrupo	Serotipos y subtipos
Grupo A: <i>Shigella dysenteriae</i>	15 serotipos (el tipo 1 produce toxina Shiga)
Grupo B: <i>Shigella flexneri</i>	8 serotipos y 9 subtipos
Grupo C: <i>Shigella boydii</i>	19 serotipos
Grupo D: <i>Shigella sonnei</i>	1 serotipo

Cuadro 6-11 Diferenciación de las especies dentro del género *Edwardsiella*

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i> BIOGRUPO 1	<i>E. hoshinaz</i>	<i>E. ictaluri</i>
Indol	+	+	V (50)	-
Sulfuro de hidrógeno	+	-	-	-
Motilidad	+	+	+	-
Fermentación de:				
Manitol	-	+	+	-
Sacarosa	-	+	+	-
Azahinosa	-	+	V (13)	-
Trehalosa	-	-	+	-

+ : 90% o más de cepas positivas; - : 90% o más de cepas negativas; V: 11-69% de cepas positivas.

Unidos, lo que conduce a 16 000 hospitalizaciones y casi a 600 muertes.⁷¹⁶ Alrededor de 35 000 de estos casos son serotipificados por laboratorios de salud pública y los resultados son transmitidos electrónicamente a los CDC. Las infecciones humanas por salmonelas son causadas principalmente por la ingestión de alimentos, agua o leche contaminados con excrementos humanos o animales. Las salmonelas son patógenos primarios de los animales inferiores (p. ej., aves de corral, vacas, cerdos, mascotas, aves, ovejas, focas, burros, lagartos y víboras), que constituyen la fuente principal de salmonelosis no tifoidea en los seres humanos. Es interesante destacar que el hombre es el único reservorio conocido de *S. typhi*. Si bien la incidencia de fiebre tifoidea ha declinado en los países desarrollados, siguen ocurriendo brotes esporádicos. En los Estados Unidos se comunican alrededor de 400 casos anuales.⁷⁷ Cerca del 50% de las epidemias de salmonelosis son el resultado de

la transmisión por aves y productos avícolas contaminados. Las salmonelas en las heces de las gallinas contaminan la superficie de los huevos o penetran internamente a través de grietas finas. En gallinas con infección ovárica, los microorganismos pueden contaminar las yemas. La Ley de inspección de productos de huevos de 1970 requiere la pasteurización de todos los productos de los huevos y la inspección supervisada federal de los huevos con cáscara para detectar grietas.

Históricamente, *S. Typhimurium* ha sido el serotipo más comunicado y representa un poco más del 20% de los aislados comunicados por año a los CDC. Los tres serotipos más frecuentes de *Salmonella* en 2001 fueron Typhimurium (22%), Enteritidis (18%) y Newport (10%), que representaron el 50% de todos los aislados. El brote más grande de salmonelosis proveniente de fuente única en la historia de los Estados Unidos (16 000 casos confirmados por cultivo con datos epidemiológi-

Recuadro 6-10 Taxonomía y nomenclatura de las salmonelas

Las fórmulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella* son definidas y mantenidas por el Centro Cooperativo para Referencia e Investigación sobre *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el Pasteur Institute de París, Francia. Se mencionan los nuevos serotipos en las actualizaciones anuales del esquema de Kauffmann-White.^{402,403} En este esquema, las salmonelas se agrupan (A, B, C, etc.) sobre la base de los antígenos O somáticos y se subdividen en serotipos (1, 2, 3, etc.) por sus antígenos flagelares, lo que conduce a los serogrupos designados A, B, C₁, C₂, C₃, etc. Cada serotipo singular recibe un nombre. Las primeras salmonelas recibieron nombres que indicaban la enfermedad, el animal del cual se aislaba el microorganismo (p. ej., *Salmonella* serotipo Typhi, *Salmonella* serotipo Choleraesuis) o ambos. En la actualidad, los nombres nuevos se dan según la localidad geográfica de donde se aisló por primera vez (*Salmonella* serotipo Canada, *Salmonella* serotipo Cleveland, etc.). Inicialmente, cada serotipo fue considerado una especie separada (p. ej., *S. canada*, *S. clevelandi*); sin embargo, en la actualidad esto conduciría a más de 2 400 especies de *Salmonella*. Los estudios de relación del DNA han demostrado que todas las cepas de *Salmonella* y todos los serotipos de "Arizona" forman un grupo único de hibridación del DNA con siete subgrupos, con excepción de *S. bongori* (subgrupo V) del que se ha demostrado mediante hibridación DNA-DNA que forma una especie distinta.^{124,281,294,414} Como *S. choleraesuis* ya fue reconocida como la especie tipo de *Salmonella*, tuvo prioridad como designación de especie para los seis subgrupos considerados comprendidos en un único grupo de hibridación. Sin embargo, el nombre "choleraesuis" puede conducir a confusión, dado que se refiere tanto a una especie como a un serotipo. Por lo tanto, en el XIV Congreso Internacional de Microbiología de 1986, el Subcomité de enterobacterias del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática recomendó unánimemente cambiar la especie tipo de *Salmonella* a *S. enterica*, nombre que no se había utilizado antes como serovariedad.⁴⁰⁴ En 1987, Le Minor y Popoff⁴⁰⁵ presentaron una "ponencia de opinión" a la Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática de que el género *Salmonella* consistiera sólo en una especie "*Salmonella enterica*", para incluir siete subespecies. *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* fueron incluidas en *S. enterica*. Esta recomendación fue adoptada por los CDC y muchos otros laboratorios. Sin embargo, después de una larga demora, la Comisión Judicial negó la solicitud sobre la base de que la condición de *Salmonella* serotipo Typhi no había sido truida de manera adecuada en la propuesta de Le Minor y Popoff.^{407,408} Estaban preocupados por el hecho de que si se adoptaba *S. enterica*, se referirían a *Salmonella* serotipo Typhi como *S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhi y podría ser omitida o pasada por alto por los médicos.⁴⁰ Por lo tanto, el Comité Judicial reglamentó que se retuviera *S. choleraesuis* como especie tipo legítima mientras se esperaba una solicitud corregida para una opinión.^{407,408} Le Minor y Popoff⁴⁰⁵ también propusieron en 1987 denominar a los siete subgrupos de *Salmonella* como subespecies (subespecie I, II, IIIa, IIIb, IV, V y VI). Más recientemente, Ezubuy⁴¹⁶ propuso que el género *Salmonella* consista en tres especies denominadas *S. bongori*, *S. enterica* y *S. typhi*. También propuso dividir *S. enterica* en seis subespecies: *S. enterica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. enterica* subespecie *diarizonae*, *S. enterica* subespecie *haustrae*, *S. enterica* subespecie *indica* y *S. enterica* subespecie *salmata*. Hasta el momento en que se publicó este libro, el Comité Judicial no se había pronunciado sobre esta última propuesta.

Recuadro 8-11 Clasificación de las especies y subespecies de *Salmonella*

Existen dos especies de *Salmonella*: *S. enterica*, que comprende seis subespecies y *S. bongori*
S. enterica subespecie *enterica* (I; incluye la mayoría de los serotipos)
S. enterica subespecie *salamae* (II)
S. enterica subespecie *arizonae* (IIIa)
S. enterica subespecie *diarizonae* (IIIb)
S. enterica subespecie *houstenae* (IV)
S. enterica subespecie *indica* (VI)
Salmonella bongori (antes subespecie V)

cos que indicaban que se infectaron en realidad 150 000 a 200 000 personas) ocurrió en 1985 en Illinois y los estados circundantes y fue rastreado a una válvula defectuosa en una firma comercial importante de suministro de leche.⁸² Desde 1990 han ocurrido varios brotes de *S. Enteritidis* en los Estados Unidos asociados con huevos con cáscara.^{83,85,87,95} Se estima que el 0.01% de todos los huevos con cáscara contienen *S. Enteritidis*. En consecuencia, los alimentos que contienen huevos crudos o subcocidos (p. ej., ponche de huevo o helado casero, salsa holandesa, aderezo para ensalada del César, mayonesa casera y tortillas líquidas) plantean un riesgo leve de infección por *S. Enteritidis*.^{85,87} En 1994, un brote de infección por *S. Enteritidis* fue relacionado con una marca de helado de distribución nacional. Se documentaron enfermedades en 41 estados y se estimó que se habían enfermado más de 200 000 personas.⁸⁸ La incidencia de enfermedad por *S. Enteritidis* y la cantidad de estos brotes en los Estados Unidos ha disminuido casi un 50% entre mediados de 1990 y 1999.⁹⁰ Para reducir aún más la incidencia de estas infecciones, el Consejo presidencial de seguridad en los alimentos anunció el 10 de diciembre de 1999 un plan con el objetivo de transición de reducir las infecciones por *S. Enteritidis* asociadas con huevos al 50% en 2005 y de eliminarlas en 2010.⁴⁰⁶ Estos brotes sirven como recordatorio constante de que la tecnología moderna no siem-

pre puede proteger contra los estragos de las enfermedades infecciosas que pueden ocurrir en epidemias súbitas y masivas. La salmonelosis también se ha asociado con el contacto directo o indirecto con reptiles (p. ej., lagartos, víboras, tortugas). Los reptiles están colonizados comúnmente por *Salmonella* y eliminan el microorganismo en forma intermitente en las heces.⁹⁸ Durante comienzos de la década de 1970, las pequeñas tortugas masentas constituyeron una fuente importante de infección por salmonelas en los Estados Unidos. En 1975, la Food and Drug Administration prohibió la distribución y la venta de tortugas pequeñas, lo que condujo a la prevención de 100 000 casos de salmonelosis por año.¹¹⁹ Sin embargo, desde 1986, la popularidad de las iguanas y otros reptiles que pueden transmitir infecciones a los seres humanos ha provocado un aumento de la incidencia de infecciones por salmonelas con serotipos encontrados en los reptiles.^{89,94,100} Los datos actuales sugieren con creciente certeza que los anfibios (p. ej., ranas, sapos, tritones y salamandras) también pueden representar un riesgo de salmonelosis para los seres humanos.¹¹⁹ Globalmente, se estima que los contactos con reptiles y anfibios explican 74 000 (6%) de las infecciones por *Salmonella* que ocurren cada año en los Estados Unidos.¹¹⁹ Como los niños pequeños tienen un mayor riesgo de desarrollar salmonelosis asociada con reptiles y anfibios con complicaciones potencialmente graves (p. ej., septicemia y meningitis), es muy importante reducir la exposición de los lactantes o los niños menores de 5 años a esos animales. Por esta razón, los reptiles y anfibios deben ser mantenidos alejados de las casas donde habiten niños menores de 5 años o personas inmunodeprimidas y no se debe permitir su permanencia en las guarderías infantiles.¹⁰³ **Emergencia de *Salmonellae* multirresistentes.** Durante la década de 1990 apareció en los Estados Unidos una cepa multirresistente de *S. Typhimurium* tipo definitivo 104 (DT 104) que es resistente a cinco antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina).¹⁰⁶ En una encuesta nacional llevada a cabo por los CDC en el año 2000, el 50% de las cepas de *S. Typhimurium* fueron resistentes a uno o más fármacos y el 28% tenía un patrón de resistencia a cinco fármacos característico del fago tipo DT104.⁷⁷ Asimismo, desde 1998 ha surgido *S. Newport* como patógeno multirresistente

Cuadro 6-12 Características diferenciales de las especies y subespecies de salmonelas (modificadas de Ewing [1986]) ⁹⁷							
ESPECIE	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
SUBESPECIE	I <i>Enterica</i>	II <i>Salamae</i>	III A <i>Arizonae</i>	III B <i>Diarizonae</i>	IV <i>Houstenae</i>	VI <i>Indica</i>	
Prueba bioquímica							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 horas)	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-/+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
D-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Galecturonasa	-	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidasa (MUG)	D	D	-	+	-	D	-
Mucato	+	+	+	(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	(75%)	+(75%)	-	D	-

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; D: diferentes reacciones por diferentes serovariedades.

Recuadro 6-12 Nomenclatura de *Salmonella* en uso en los CDC

NOMENCLATURA ACTUAL DE POSICIÓN TAXONÓMICA

Género (bastardilla)	<i>Salmonella</i>
Especie (bastardilla)	<i>enterica</i> , que incluye las subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV y VI <i>bongori</i> (antes subespecie V)
Serotipo (con mayúscula, sin bastardilla)	- La primera vez que se menciona un serotipo, el nombre debe ir precedido por la palabra "serotipo" o "ser." - Los serotipos son nombrados en sero-especies I y designados por las fórmulas antígenicas en las subespecies II, III, IV y VI y <i>S. bongori</i> (p. ej., <i>Salmonella</i> serotipo (ser.) Typhimurium, <i>Salmonella</i> II 50:k:z, <i>Salmonella</i> IIIb 60:k:z) - Los miembros de las subespecies II, IV y VI y <i>S. bongori</i> tienen sus nombres si los recibieron antes de 1966 (p. ej., <i>Salmonella</i> serotipo Marina (IV 48:g,z₁₆-))

Tomado de la referencia¹⁷⁷.

importante.¹⁰⁸ En 2001, 33 (26%) de 128 aislados de *S. Newport* enviados al sistema estadounidense de monitorización de resistencia a los antibióticos (disponible en www.cdc.gov/narms/index.htm) fueron resistentes al menos a 9 de los 17 agentes antibióticos evaluados.¹⁰⁹

Infecciones debidas a *Salmonella enterica subespecie arizonae*. *Salmonella enterica subespecie arizonae* se asemeja a las salmonelas desde el punto de vista antígeno, clínico y epidemiológico.

CUADRO DE CORRELACIONES CLÍNICAS 6-3 Infección por *Salmonella*

Se pueden distinguir cuatro tipos de infección por *Salmonella*:¹⁰⁹ 1) gastroenteritis, la manifestación más frecuente, que varía desde una diarrea leve hasta una fulminante, acompañada por fiebre leve y grados variados de náuseas y vómitos; 2) bacteriemia o septicemia sin síntomas gastrointestinales mayores (*S. choleraesuis* es particularmente invasiva), caracterizada por fiebre alta en picos y hemocultivos positivos; 3) fiebre entérica, causada potencialmente por cualquier cepa de especie de *Salmonella*, que suele manifestarse por fiebre leve y diarrea, salvo en los casos clásicos de fiebre tifoidea (*S. typhi*), en la que la enfermedad se desarrolla en forma bimodal, caracterizada por un período temprano (que dura 1 a 2 semanas) de fiebre y estreñimiento, durante el cual los hemocultivos son positivos y los coprocultivos se mantienen negativos, seguida por una segunda fase (diarreica) durante la cual los hemocultivos se tornan negativos y los coprocultivos positivos y 4) un estado de portador en el que las personas con una infección previa, sobre todo por *S. typhi*, pueden seguir excretando el microorganismo en las heces hasta un año después de la remisión de los síntomas. Son algo preocupantes las comunicaciones de cepas lactosa positivas de *S. virchow* que producen bacteriemia y meningitis.¹¹⁰ Si bien no sería difícil la detección de cepas lactosa positivas en sangre o líquido cefalorraquídeo, su hallazgo en las heces plantearía un problema en la mayoría de los laboratorios debido a la similitud de su aspecto con el de otros coliformes lactosa positivos presentes en las muestras fecales.

gico. Aislada por primera vez en 1939 en reptiles enfermos en Arizona, se la denominó al principio "especie de *Salmonella* tipo Dar-es-salaam, variedad de Arizona".¹⁶¹ Más tarde se la distinguió de *Salmonella* y se la ubicó en el nuevo género *Arizona*, con una única especie *A. hinshawii*. Sin embargo, en 1983 fue reclasificada como un serotipo del género *Salmonella* sobre la base de estudios de homología de DNA. Si bien la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no pueden ser distinguidos por reacciones bioquímicas, *Salmonella enterica subespecie arizonae* puede diferenciarse con facilidad porque tiene reacción positiva al malonato y negativa al dulcitol. Además, algunas cepas fermentan la lactosa y todas las cepas son ONGP positivas. Como resultado de estas reacciones bioquímicas singulares, se puede hacer fácilmente una designación correcta de los serotipos mediante la mayoría de los sistemas de identificación comerciales. Para la importancia clínica véase el recuadro de correlación clínica 6-4.

Nuevos métodos de recuperación y caracterización de Salmonellae. Además de los medios clásicos ya explicados (véanse cuadros 6-1 a 6-3), se describieron nuevos medios destinados a mejorar el aislamiento de especies de *Salmonella* de las muestras fecales.

Medios selectivos y diferenciales. Estos medios incluyen agar novobiocina-verde brillante-glucosa (NBG),¹¹¹ agar novobiocina-verde brillante-glicerol-lactosa (NBGL),^{101,120} medio de xilosa-lisina-Tergitol 4 (XLT4)¹²⁶ y medio de Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV).^{18,153,159} Las fórmulas y las propiedades diferenciales de estos medios se proporcionan en el cuadro 6-13.

CUADRO DE CORRELACIONES CLÍNICAS 6-4 *Salmonella Arizonae*

Los reptiles, sobre todo las víboras, constituyen el principal reservorio natural de *S. Arizonae*, pero los seres humanos, las aves de corral y otros animales también han contraído la enfermedad por este microorganismo. La infección humana debe desencadenar la investigación de una posible conexión con reptiles y aves de corral y productos de huevo. Varios investigadores han comunicado infección por *S. Arizonae* en pacientes oncológicos y pacientes HIV positivos luego del consumo de cápsulas de polvo de víbora como uno de los denominados remedios populares.^{20,20,161,162} Se ha comunicado un caso fatal de gastroenteritis por *S. Arizonae* en un niño con microcefalia hijo de una familia de encantadores de serpientes de Nueva Delhi, India.¹⁶³

El espectro clínico de la enfermedad varía desde gastroenteritis benigna, hasta fiebre entérica y septicemia con infección localizada y es similar al causado por otros serotipos de *Salmonella*. Keren y cols. comunicaron que se puede observar una gastroenteritis en cualquier grupo etario y se caracteriza por dolor abdominal cólico, diarrea (a menudo acuosa), náuseas, vómitos e hipotermia leve.¹⁶⁴ En general, la diarrea es autolimitada y dura de uno a 5 días. Puede seguir una septicemia, pero también se ha informado en ausencia de gastroenteritis. Se presume que ocurre una infección localizada en diversos sitios orgánicos, como cerebro, hueso, hígado, pulmones, articulaciones y vesícula biliar luego de la bacteriemia, aunque no siempre es documentada. También se han comunicado casos bien documentados de osteomielitis.¹⁶⁵ Es probable que la prevalencia de las infecciones humanas causadas por *S. Arizonae* sea subcomunicada porque los síntomas gastrointestinales suelen ser leves. Sin embargo, este patógeno debe ser considerado en los diagnósticos diferenciales de los pacientes con sepsis y gastroenteritis grave que tienen antecedentes de contacto con reptiles, en especial víboras. Se debe recomendar no tener reptiles, sobre todo en las casas con niños menores de 5 años.¹⁶⁴

Cuadro 6-13 Nuevos medios para la recuperación de especies de *Salmonella* de las heces

MEDIO	FÓRMULA	PRINCIPIO E INTERPRETACIÓN
Agar novobiocina-verde brillante-glucosa (NBG)	Agar tripticasa soja, 40 g Citrato amónico férreo, 1,5 g Tiosulfato sódico pentahidrato, 5 g Rojo fenol (sal sódica), 80 mg Glucosa, 1 g Verde brillante, 7 mg Novobiocina, 10 mg Agua destilada a 1 L pH final, 7,3	Las colonias de <i>Salmonella</i> aparecen lisas y enteras con centros nucleados de color negro intenso y tamaño intermedio a grande debido a la producción de H ₂ S. Además, se presenta entorpecimiento y una zona visible de aclaración en el medio alrededor de cada colonia. Los coliformes son inhibidos o no producen colonias de centro negro. Algunas cepas de <i>Citrobacter freundii</i> producen colonias indistinguibles de las especies de <i>Salmonella</i> .
Agar novobiocina-verde brillante-glicerol-lactosa (NBGL)	Agar tripticasa soja, 40 g Citrato amónico férreo, 1,5 g Tiosulfato sódico, 5 g Lactosa, 10 g Glicerol, 10 mL Verde brillante, 7 mg Novobiocina, 10 mg Agua destilada a 1 L	La detección de especies de <i>Salmonella</i> se basa sobre la producción de H ₂ S, que conduce a colonias negras. Sólo se logra una formación suficiente de H ₂ S con colonias que no producen ácido a partir de glicerol o lactosa, porque un pH bajo interfiere en la formación de H ₂ S. Esto conduce a colonias incolores para la mayoría de las especies de <i>Proteus</i> y <i>Citrobacter</i> .
Agar de Rambach	Propilenglicol, 10 g Peptona, 5 g Extracto de levadura, 2 g Desoxicolato sódico, 1 g Rojo neutro, 0,03 g 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, 0,1 g Agar, 15 g Agua destilada hasta 1 L.	Detecta la capacidad de especies de <i>Salmonella</i> para metabolizar propilenglicol. Las colonias sospechosas en este medio son casi siempre rojas brillantes. Contiene una cantidad moderada de sales biliares para inhibir los coliformes.
Agar SM-ID	Extracto de carne de vaca, 3 g Bisopolitona, 6 g Extracto de levadura, 2 g Sales biliares, 4 g Rojo neutro, 0,025 g Boffler Tris, 0,65 g Verde brillante, 0,3 mg Sustrato cromógeno 1 (galactopiranosido), 0,17 g Glucuronato sódico, 12 g Sustrato cromógeno 2 (glucopiranosido), 0,026 g Sorbitol, 8 g Agar, 13,5 g Agua destilada hasta 1 L pH final, 7,6 $\pm$ 0,2	La detección de especies de <i>Salmonella</i> se basa sobre la formación de ácido a partir de glucuronato y en la ausencia de β -galactosidasa. Los serotipos de <i>Salmonella</i> producen colonias rojo rosadas (a veces con un borde incoloro), mientras que los coliformes forman otros colores (verde, azul o violeta) si son positivos para β -galactosidasa o se mantienen incolores. Contiene una cantidad moderada de sales biliares para inhibir a los coliformes.
Medio de Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV)	Triptosa, 4,59 g Hidrolizado ácido de caseína, 4,59 g Cloruro de sodio, 7,34 g Fosfato dihidrógeno potásico, 1,47 g Cloruro de magnesio (anhídrido), 10,93 g Oxalato de verde de malaquita, 0,037 g Agar, 2,7 g Agua destilada hasta 1 L Novobiocina (solución al 2%) agregada después de esterilización de 1 mL pH final 5,2 $\pm$ 2	Sobre la base del fenómeno del movimiento ascendente de las bacterias móviles (especies de <i>Salmonella</i> y otras) en concentraciones reducidas de agar. Después de la incubación se controlan las placas para detectar bacterias móviles que aparecen como un halo de crecimiento que se propaga desde el punto de inoculación original. Se toman subcultivos del borde de nigración para controlar la pureza y para realizar otras pruebas bioquímicas y serológicas. Los coliformes son inhibidos por una combinación de aumento de la presión osmótica, verde de malaquita e incubación a 41-43 °C.
Xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4)	Proteosa peptona Bacto n° 3, 1,6 g Extracto de levadura Bacto, 3,0 g L-lisina, 5,0 g Xilosa Bacto, 3,75 g Lactosa Bacto, 7,5 g Sacarosa Bacto, 7,5 g Citrato amónico férreo, 0,8 g Tiosulfato de sodio, 6,8 g Cloruro de sodio, 5 g Agar Bacto, 18 g Rojo fenol Bacto, 0,08 g	Este es un medio altamente selectivo que sustituye el desoxicolato de sodio que se encuentra en el agar XLD por el surfactante aniónico Tergitol 4. El agar XLT4 inhibe por completo el crecimiento de todas las bacterias grampositivas y hongos, e inhibe total o fuertemente el crecimiento de muchas bacterias gramnegativas, que incluyen <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> y <i>Pseudomonas</i> . Además, las especies de <i>Citrobacter</i> son algo inhibidas y muy pocas veces producen colonias con centros negros después de una incubación de toda la noche. Las colonias de <i>Salmonella</i> (H ₂ S-positivas) aparecen negras o de centro negro con una periferia amarilla después de 18-24 horas de incubación. Después de una incubación continua, las colonias se vuelven completamente negras.

Cuadro 6-13 Nuevos medios para la recuperación de especies de *Salmonella* de las heces (Cont.)

MEDIO	FÓRMULA	PRINCIPIO E INTERPRETACIÓN
	Agua destilada hasta 1 L pH final, 7,4 ± 0,2	o rosadas a rojas con centros negros. Raras cepas de <i>Salmonella</i> que no producen H ₂ S muestran colonias rosadas a amarillo rosadas que pueden ser diferenciadas de las colonias no salmonelas amarillas brillantes
Medio ABC modificado (medio αβ-cromogénico con alfafosfalin)	Agar bacteriológico, 10 g L-arginina, 0,1 g Ácido L-aspártico, 0,1 g L-cisteína, 0,005 g Glicina, 0,1 g L-histidina, 0,1 g L-isoleucina, 0,1 g L-leucina, 0,1 g L-lisina, 0,1 g L-metionina, 0,005 g L-fenilalanina, 0,1 g L-prolina, 0,1 g L-serina, 0,1 g L-treonina, 0,1 g L-triptófano, 0,1 g L-tirosina, 0,1 g L-valina, 0,1 g Guanina, 0,01 g Uracilo, 0,01 g Citosina, 0,01 g Adenina, 0,01 g Citrate de sodio, 6,5 g Sulfato de magnesio, 0,1 g Sulfato amónico, 1 g Extracto de levadura, 0,1 g Fosfato de hidrógeno dipotásico, 7 g Fosfato de dihidrógeno potásico, 2 g Mezcla de cromógenos: Citrate amónico férrico, 0,5 g X-alfa-Gal, 0,08 g CHE-Gal, 0,3 g IPTG, 0,03 g Agua destilada hasta 1 L Ingredientes agregados después de la esterilización: Desoxicolato de sodio, 0,5 g La concentración final de alfafosfalina varía en agar de 32 a 0,125 mg/L (Perry y cols. ¹²⁸)	<i>Salmonella</i> da colonias azules; otras enterobacterias dan colonias negras. La alfafosfalin es captada por bacterias a diferentes velocidades a través de una permeasa estereoespecífica y puede ser escindida intracelularmente por una aminopeptidasa para dar fosfalina. Este compuesto liberado interfiere en el metabolismo bacteriano a través de la interacción con la enzima alanina racemasa responsable de generar D-alanina. Esta interacción puede conducir a la inhibición del crecimiento ¹²⁹
BBL®CHROMagar® <i>Salmonella</i> (comercializado por BD bajo un acuerdo de licencia con CHROMagar, París, Francia)	Cromopeptona, 22 g Mezcla de cromógenos, 0,34 g Agentes inhibidores, 0,02 g Agar, 15 g Agua destilada hasta 1 L	Las especies de <i>Salmonella</i> aparecen como colonias color malva claro a malva. <i>Citrobacter freundii</i> y otros coliformes aparecen como colonias verde azuladas claras o verde azuladas. Algunos microorganismos que no hidrolizan ninguno de los compuestos cromogénicos pueden aparecer como colonias incolores (véase lámina en color 6-SE a H)
Observación: el uso de Rambach, XLT4, MSRV, NRG y NRG2, no es apropiado para el aislamiento de los serotipos de <i>Salmonella</i> <i>Sifitoeax</i> .		

Medios cromogénicos. Los sustratos enzimáticos cromogénicos son compuestos que actúan como sustratos para enzimas específicas y cambian de color debido a la acción de la enzima sobre el sustrato (fig. 6-6). El primer medio de este tipo fue el agar de Rambach que utiliza un sustrato cromogénico para β-galactosidasa (X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) junto con propilenglicol, que es fermentado por las especies de *Salmonella* para generar ácido.¹⁴¹ El agar de Rambach es altamente específico; sin embargo, no detecta *S. Typhi* ni *S. Paratyphi* A.^{144,145,193} El agar SM-ID es similar al de Rambach salvo en que incorpora dos sustratos cromogénicos: X-Gal, para β-galactosidasa y X-GLU, para β-glucosidasa. El medio SM-ID detecta tanto el serotipo Typhi como Paratyphi

A.^{144,145,329,385,395,429} El medio cromogénico para *Salmonella* (SCM; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) contiene dos sustratos cromogénicos. El primero es Magenta-cap (5-bromo-6-cloro-3-indolilcaprilato), que es hidrolizado por especies de *Salmonella* con lo que se generan colonias magenta. El segundo sustrato es X-Gal, que hace virar al azul a los microorganismos productores de β-D-galactosidasa. Otras colonias que se utiliza los cromógenos crecen como colonias incolores.⁷⁵ El medio ABC (medio αβ-cromogénico) utiliza dos sustratos cromogénicos. El primero, 3,4-ciclohexenoesculetina-β-D-galactósido (CHE-GAL), se utiliza para detectar microorganismos productores de β-galactosidasa que aparecen como colonias negras en presencia de hierro. El segundo sustrato, 5-bromo-4-

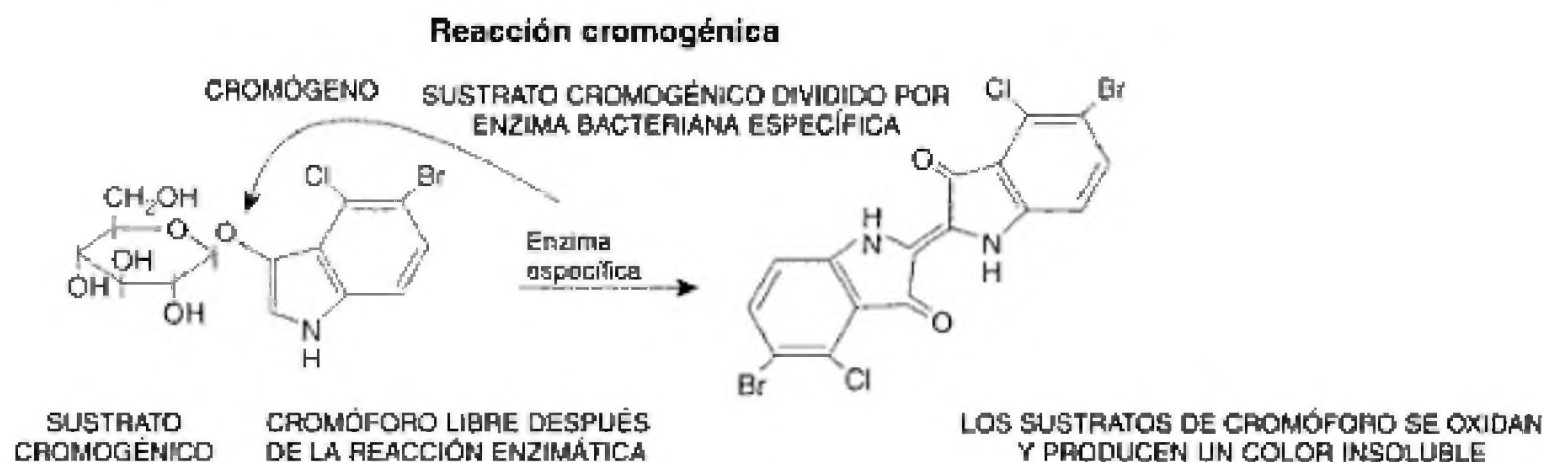


Figura 6-6 Reacción cromogénica: los sustratos artificiales (cromógenos) liberan compuestos de diferentes colores después de la degradación por enzimas bacterianas específicas.

cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido (X- α -Gal), es hidrolizado por especies de *Salmonella* que se presentan como colonias verdes.^{349,385,387} Perry y cols. modificaron más tarde el medio ABC con la incorporación de alfafosfalina (ácido L-alanil-L-aminoetilfosfónico), un "sustrato suicida" que ayuda a la recuperación de especies *Salmonella* al inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias gramnegativas.³⁸⁸ El agar para *Salmonella* COMPASS (Biotar Diagnostics, Beauvais, Francia) utiliza dos sustratos cromogénicos -5-bromo-6-cloro-3-indolil-caprilato, que detecta actividad de esterasa de especies de *Salmonella* que arrojan colonias magenta, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucopiranosido, que detecta actividad de β -glucosidasa de otras enterobacterias que dan colonias azules.³⁸⁹ CHROMagar *Salmonella* (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia; también vendido por BD con el nombre BBL CHROMagar *Salmonella*, BD Diagnostics Sparks, MD) es un medio cromogénico selectivo más nuevo que utiliza una mezcla de cromógenos (sustratos patentados) que detecta actividad de esterasa de especies de *Salmonella* y actividad de β -galactosidasa de otras enterobacterias.^{352,384,390,395} En el cuadro 6-13 se proporcionan las fórmulas, los principios y las interpretaciones de los agares cromogénicos. En las láminas en color 6-5E a H se presentan dibujos de colonias que crecen en CHROMagar.

Evaluaciones. En un estudio de Ruiz y cols. que comparó los medios de siembra para el aislamiento de *Salmonella*, los medios NBGL tuvieron la máxima selectividad (78,4%) y el valor predictivo más alto (61%) para la recuperación directa de *Salmonella* de las heces.⁴²⁹ Estos autores recomiendan utilizar SM-ID para el aislamiento de *S. Typhi* que no es detectado en agar NBGL. Monnery y cols. observaron que los agares SMID y Rambach eran mucho más específicos que el agar para salmonelas-shigelas y el agar de Hektoen.³²⁹ Dusch y Altwegg compararon seis medios (agar entérico de Hektoen [HE], agar de Rambach, medio SM-ID, agar XLT4, agar NBLG y medio MSRV) y llegaron a la conclusión de que MSRV era el más sensible para el aislamiento de salmonelas no tifoideas de las heces; sin embargo, estos autores observaron que la naturaleza semisólida del medio era una desventaja y requiere una manipulación cuidadosa en el laboratorio. Señalaron que XLT4 tenía una sensibilidad comparable con HE y una especificidad de casi el 100% y puede considerarse una alternativa para el aislamiento de salmonelas de las heces.³⁴⁵ Perez y cols.³⁹⁵ compararon cuatro medios cromogénicos (medio ABC, agar para salmonelas COMPASS, agar para salmonelas CHROMagar y

agar SM-ID) con agar de Hektoen convencional en 916 muestras de heces de pacientes internados en tres hospitales. Después de 48 horas de incubación, la sensibilidad antes y después del enriquecimiento en caldo de selenito fue del 62,5% y del 89,1% con el medio ABC, del 77,1% y del 93,8% con agar COMPASS, del 66,7% y el 89,1% con CHROMagar, del 68,8% y del 85,9% con agar SM-ID y del 85,4% y del 98,4% con agar de Hektoen, respectivamente. Sin enriquecimiento, después de 24 horas de inoculación, se detectó entre el 45,8% y el 62,5% de todos los aislados de *Salmonella*, según el medio utilizado. Hektoen fue significativamente más sensible que los cuatro medios cromogénicos, mientras que las sensibilidades de los cuatro medios cromogénicos no fueron muy diferentes entre sí. Con enriquecimiento y un período de incubación de 48 horas, el agar de Hektoen nuevamente tuvo la sensibilidad más alta (98,4%), mientras que las sensibilidades de COMPASS, ABC, CHROMagar y SM-ID fueron del 93,8%, 89,1%, 89,1% y 85,9% respectivamente.

Otros métodos de detección rápida. La prueba de 4-metilumbeliferil caprilato (prueba MUCAP; Biolife, Milán, Italia) es una prueba de fluorescencia para la identificación rápida de cepas de *Salmonella* directamente de placas de agar. Consiste en un éster de ocho átomos de carbono conjugado con metilumbeliferona. Este sustrato interactúa con la C_4 esterasa de las salmonelas y conduce a la liberación de umbeliferona, que es fuertemente fluorescente a 365 nm. Se aplica una gota de reactivo directamente en las colonias sospechosas sobre la superficie de agar y se observa la aparición de la fluorescencia azul de la colonia bajo lámpara de Wood dentro de los 5 minutos. Varios estudios han mostrado que esta prueba proporciona una sensibilidad y una especificidad de casi un 100% para detectar cepas de *Salmonella* y es un auxiliar útil y rápido para la caracterización bioquímica de rutina de esas cepas.^{8,369,431,432} La prueba para salmonelas Sistema de identificación bioquímica Oxoid (Oxoid Biochemical Identification System, OBIS) es una prueba colorimétrica rápida en el sitio para la determinación de actividad de piroglutamilaminopeptidasa (PYRasa) y nitrofenilalanina desaminasa (NPA). Se toma una muestra de una colonia que crece en una placa de agar y se aplica a las áreas de prueba de PYR y NPA sobre la tarjeta. Se agrega una gota de solución buffer en ambas áreas de prueba y, después de 5 minutos, se agrega una gota de solución que desarrolla PYR al área de prueba de PTR y una gota de solución que desarrolla NPA al área de prueba de NPA. Se impregna el área de PYRasa en la tarjeta de prueba con ácido L-piroglutámico

7-amino-4-metilcurmarina (7AMC). El área NPA en la tarjeta de prueba se impregna con nitrofenilalanina. La desaminación del reactivo se reconoce porque se produce un color pardo anaranjado cuando se agrega la solución que desarrolla NPA (hidróxido de sodio 0,25 M). La falta de actividad de PYRasa y NPA en las especies de *Salmonella* se puede utilizar para diferenciarlas de las especies de *Citrobacter*, que tienen actividad de PYRasa^{105,234,322} y de especies de *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*, que tienen actividad de NPA.¹⁹²

Se están introduciendo nuevas técnicas que pueden alterar en gran medida la identificación futura de especies de *Salmonella*, tanto en el laboratorio clínico como en los estudios del campo epidemiológico. Como ejemplo de nuevas aplicaciones, Olsvik y cols.³⁷⁰ rastrearon la transmisión de cepas de *S. Typhimurium* desde ganado vacuno enfermo en cuatro manadas separadas en Noruega hasta trabajadores de granjas, y observaron perfiles idénticos de plásmidos crípticos para los distintos aislados con el uso de técnicas de digestión con endonucleasas de restricción. Como señalan estos autores, las técnicas convencionales de serotipificación y biotipificación a menudo no son suficientemente específicas como para determinar en forma definitiva que dos o más aislados de diferentes fuentes son, de hecho, idénticos. Las técnicas, como el análisis de endonucleasas de restricción o las sondas genéticas, que detectan secuencias de nucleótidos en plásmidos o en DNA o RNA cromosómico harán que el trabajo epidemiológico y diagnóstico en microbiología sea mucho más riguroso en el futuro. Estas técnicas se explican con más detalle en el capítulo 4.

TRIBU CITROBACTEREAE

En *Citrobacterae* se incluye un género —*Citrobacter*— y 11 especies. El género *Citrobacter* y la especie *C. freundii* fueron designados en 1932 por Werkman y Gillion. En 1970 Frederiksen describió una nueva especie a la que denominó *C. koseri*. En 1971, Young y cols. propusieron el nombre *Levinea malonatica* para un grupo similar de microorganismos, y en 1972 Ewing y Davis describieron *C. diversus*. Frederiksen examinó las tres cepas, determinó que eran fenotípicamente similares y propuso restablecer el nombre *C. koseri* como nombre válido para el taxón.¹⁷⁶ En 1993, Brenner y cols., utilizando estudios de relación de DNA, mostraron que los microorganismos identificados como *C. freundii* consistían en un grupo heterogéneo que representaba varias especies genéticas.⁷¹ Este trabajo condujo al establecimiento de 11 especies

genómicas dentro del género *Citrobacter*, como se muestra en el cuadro 6-14.

Las características que sugieren que una cepa aislada puede pertenecer al género *Citrobacter* se proporcionan en el cuadro 6-6. Las características clave que diferencian a *C. freundii* y otros miembros H₂S positivos de las salmonelas son el crecimiento en KCN (las especies de *Salmonella* son negativas), la ausencia de actividad de lisina descarboxilasa (las especies de *Salmonella* son positivas) y la hidrólisis de ONPG (las especies de *Salmonella* son negativas). La diferenciación bioquímica entre las especies de *Citrobacter* se muestra en el cuadro 6-15. Las cepas humanas de todas las especies genómicas salvo *C. koseri* se han obtenido predominantemente de heces.⁵¹ Farmer y cols.,¹⁶⁵ que revisaron cepas remitidas a los CDC, citaron a *C. freundii* como posible causa de diarrea (aunque la mayoría de los aislados fecales no parecen estar asociados con enfermedad) y como causa de casos aislados de infecciones extraintestinales. También citan una posible asociación entre *C. koseri* y brotes de meningitis y abscesos encefálicos en recién nacidos y comunican la recuperación de *C. amalonaticus* de algunos hemocultivos. Janda y cols. en el Microbial Diseases Laboratory en Berkeley, California, informaron que *C. freundii* fue la especie más frecuente identificada de todos los sitios corporales excepto las heces. En las muestras gastrointestinales se ubicó en cuarto lugar por detrás de *C. youngae*, *C. braakii* y *C. werkmanii*.²³⁶ *C. freundii* (complejo) ha sido comunicado como causa de enfermedad gastrointestinal asociada con el queso Brie importado⁵¹ y se informó el aislamiento de una cepa que transporta el antígeno de *E. coli* O157.²⁵ *C. koseri* ha sido aislado principalmente de muestras de orina y del aparato respiratorio.^{224,284} También se señaló con frecuencia creciente *C. koseri* como causa de meningitis esporádica y epidémica en recién nacidos y lactantes pequeños.^{228,273,274,378,488} Se observan abscesos encefálicos en el 75% de los lactantes con meningitis por *C. koseri*, una prevalencia muy superior a la publicada para otras bacterias que producen meningitis.^{201,273} Un tercio de los lactantes con meningitis por *C. koseri* muere y al menos el 75% de los supervivientes tienen un deterioro neurológico grave.²⁰¹ Otras publicaciones corroboran la tendencia de *C. koseri* a producir meningitis y abscesos encefálicos, sobre todo en asociación con el bacilo gramnegativo anaerobio *Prevotella melaninogenica*.^{15,213,286} *C. sedlakii* se aisló en la sangre y el líquido cefalorraquídeo de un lactante prematuro de 5 días con sepsis, meningitis y un absceso encefálico tratado en el University of Illinois Medical Center.¹⁴⁰ El niño fue tratado con ampicilina,

Cuadro 6-14 Especies anteriores y actuales dentro del género *Citrobacter*

DESIGNACIÓN ANTERIOR DE LA ESPECIE	ESPECIE GENÓMICA	ESPECIE ACTUAL
Complejo <i>C. freundii</i>	1	<i>C. freundii</i>
	5	<i>C. youngae</i>
	6	<i>C. braakii</i>
	7	<i>C. werkmanii</i>
	8	<i>C. sedlakii</i>
	9	<i>C. rodentium</i>
	10	<i>C. gillenii</i>
	11	<i>C. murliniae</i>
<i>C. diversus</i>	2	<i>C. koseri</i>
<i>C. amalonaticus</i>	3	<i>C. amalonaticus</i>
<i>C. amalonaticus</i> biogrupo 1	4	<i>C. farmeri</i>

Cuadro 6-15 Diferenciación de especies dentro del género *Citrobacter**

PRUEBA BIOQUÍMICA	CITROBACTER										
	<i>C. koseri</i>	<i>C. werkmanii</i>	<i>C. sedlakii</i>	<i>C. rodentium</i>	<i>C. gillenii</i>	<i>C. novohumilis</i>	<i>C. farmeri</i>	<i>C. braakii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>C. murliniae</i>	<i>C. youngae</i>
Adonitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ornitina	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Melibiosa	-	-	+	-	V (67)	-	+	V (78)	+	V (33)	-
Sacarosa	V (44)	-	-	-	V (33)	V (13)	+	-	+	V (33)	V (19)
Indol	+	-	+	-	-	+	+	V (33)	V (38)	+	V (14)
Dulcitol	V (38)	-	+	-	-	-	-	V (33)	V (13)	+	V (86)
H ₂ S	-	+	-	-	V (67)	V (13)	-	V (60)	V (75)	V (67)	V (67)

* Datos obtenidos de Brenner 131 y cols.¹³
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

piperacilina y cefotaxima. Hacia el día 14 el lactante se encontraba clínicamente estable y el tratamiento se cambió a cefotaxima intravenosa y cotrimoxazol oral. Fue dado de alta después de 8 semanas para completar 2 semanas más de tratamiento con cotrimoxazol oral en el hogar. A los cinco meses y medio una tomografía computarizada del cerebro mostró la resolución de todas las cavidades de los abscesos. Otras cepas de *C. sedlakii* en la University of Illinois han sido recuperadas de orina y un injerto arteriovenoso infectado de la pierna. De 13 *C. braakii* identificados en el University of Illinois Medical Center, 5 se recuperaron de orina, 4 de líquidos peritoneales, 1 de una herida abdominal, 2 de muestras endotraqueales y 1 de una muestra bronquial. Las cepas de *C. farmeri* aisladas en la University of Illinois se obtuvieron a partir de heces, orina, tejido de la pared abdominal y líquidos acuosos. Bruckner y cols. comunicaron un caso de bacteriemia por *C. farmeri* en un niño con síndrome de intestino corto que sufrió un episodio séptico poco después del comienzo de una infusión de nutrición parenteral total (NPT).⁶³ Sólo se han recuperado tres cepas de *C. gillenii* en la University of Illinois de tres fuentes separadas: orina, líquido peritoneal y la punta de un catéter venoso central. La mayoría de las cepas de *C. youngae* han sido aisladas en muestras de orina. *C. rodentium* sólo ha sido aislado de roedores y produce una enfermedad en los ratones de laboratorio conocida como hiperplasia murina colónica transmisible.^{295,449}

La identificación de especies de *Citrobacter* se ve obstaculizada porque las nuevas especies no están incluidas aún en las bases de datos de la mayoría de los sistemas comerciales de identificación. Para ayudar a los laboratorios a determinar las nuevas especies de *Citrobacter*, O'Hara y cols. publicaron una clave dicotómica que utiliza pruebas bioquímicas convencionales.³⁵⁸ El patrón de sensibilidad de las cepas aisladas también ofrece un auxiliar para la identificación. *C. koseri* tiene un patrón de sensibilidad a los antibióticos similar a *Klebsiella* (resistente a ampicilina y ticarcilina), mientras que *C. freundii* tiene un patrón más típico de especies de *Enterobacter* (resistente a ampicilina y a las cefalosporinas de primera generación).

TRIBU KLEBSIELLEAE

La tribu *Klebsiellae* incluye cuatro géneros mayores—*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Serratia*—cada uno de los cuales abarca varias especies que son patógenos manifiestos y oportunistas del hombre. Se ha agregado un quinto nuevo género, *Pantoea*, para adoptarse a la reclasificación de los microorganismos antes llamados *Enterobacter agglomerans* biotipo XIII y denominados ahora *Pantoea agglomerans*.¹⁸⁸ Las características claves que sugieren que una cepa desconocida pertenece a *Klebsiellae* se muestran en el cuadro 6-6. En el cuadro 6-16 se presentan las diferencias bioquímicas entre los principales géneros y especies dentro de la tribu.

Género *Klebsiella*. El género *Klebsiella* recibió ese nombre en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX. El bacilo conocido ahora como *Klebsiella* también fue descrito por Carl Friedländer y durante muchos años el "bacilo de Friedländer" fue bien conocido como causa de una neumonía grave y a menudo fatal. *K. pneumoniae* es la especie tipo del género.

Cambios taxonómicos en el género *Klebsiella*. En 2001, Drancourt y cols.¹³⁷ realizaron un análisis comparativo de las secuencias del rRNA de 16S y los genes *rpoB* (que codifican la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana) de las cepas tipo de nueve especies de *Klebsiella*. Sus hallazgos confirmaron que *Klebsiella* es heterogénea y está compuesta por especies que forman tres agrupamientos filéticos. El grupo I comprende *K. pneumoniae* subespecies *pneumoniae*, *rhinoscleromatis* y *ozaenae* y *K. granulomatis*; el grupo II contiene *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* y *K. terrigena* y el grupo III contiene *K. oxytoca*.¹³⁷ Sobre la base de esta evidencia propusieron que el género *Klebsiella* fuera dividido en dos géneros: *Klebsiella* y *Raoultella* (nombre en honor del bacteriólogo francés Didier Raoult) y que *K. oxytoca* debe quedar como un taxón monofilético. Las especies incluidas en el grupo I se mantienen en el género *Klebsiella*, mientras que las incluidas en el grupo II son transferidas al nuevo género *Raoultella*.¹³⁷ Granier y cols. mostraron además que el taxón *K. oxytoca* está dividido en dos clados, que corresponden a dos

Cuadro 6-16 Diferenciación de los géneros y especies principales dentro de la tribu *Klebsiellae*

PRUEBA BIOQUÍMICA*	<i>KLEBSIELLA</i>		<i>ENTEROBACTER</i>		<i>PANTOEA</i>	<i>HAFNIA</i>	<i>SERRATIA</i>	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>H. alvei</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>
Indol	-	+	-	-	V (20)	-	-	-
Motilidad	-	-	+	+	V (85)	V (85)	+	+
Lisina	+	+	+	-	-	+	+	+
Arginina	-	-	-	+	-	-	-	-
Ornitina	-	-	+	+	-	+	+	+
DNasa (25 °C)	-	-	-	-	-	-	+	V (85)
Gelatinasa (22 °C)	-	-	-	-	-	-	+	+
Fermentación de:								
Lactosa	+	+	+	+	V (40)	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	V (75)	-	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	V (30)	-	+	+
Adonitol	+	+	+	V (25)	-	-	V (40)	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	-	+

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas.

grupos genéticos, denominados oxi-1 y oxi-2.^{302,303} Por último, *Calymmatobacterium granulomatis*, el presunto agente causal de la donovanosis, ha sido reclasificado como *Klebsiella granulomatis* sobre la base de los datos filogenéticos.^{33,261}

Las especies de *Klebsiella* y *Raoultella* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tubo digestivo de los seres humanos y de los animales. Se debe sospechar una especie de *Klebsiella* cuando se recuperan colonias grandes con una consistencia mucóide en las placas de aislamiento primario. En agar de MacConkey, las colonias típicamente se presentan grandes, mucoides y rojas, y el pigmento rojo suele difundirse en el agar circundante, lo que indica fermentación de lactosa y producción de ácido. Sin embargo, no todas las cepas son mucoides y algunas especies de *Enterobacter* pueden simular estrechamente a las especies de *Klebsiella* en las pruebas de cribado. Todas las especies de *Klebsiella* y *Raoultella* son inmóviles y la mayoría no descarboxilan la ornitina (*R. ornithinolytica* es ornitina-positiva), características positivas en la mayoría de las especies de *Enterobacter*. Muchas cepas de *Klebsiella* y *Raoultella* hidrolizan lentamente la urea y producen un color rosa claro en el cultivo en pico de flauta con agar urea de Christensen. Se puede utilizar la producción de indol a partir del triptófano para separar las dos especies principales. *K. pneumoniae* es indol negativa y *K. oxytoca* es indol positiva. Ciertas cepas no producen estas reacciones clásicas, lo que llevó a nombrar varias especies adicionales (cuadro 6-17).

K. pneumoniae se recupera con mayor frecuencia de muestras clínicas y puede producir una forma clásica de neumonía primaria. Se encuentra rara vez en la orofaringe de las personas sanas (tasa de portación del 1-6%);⁴²⁰ sin embargo, se puede presentar una prevalencia de hasta un 20% en los pacientes hospitalizados. Esta colonización puede ser la causa demostra-

ble de las infecciones pulmonares que suelen ocurrir en pacientes con trastornos debilitantes como alcoholismo, diabetes mellitus y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.⁴²⁰ La neumonía tiende a ser destructiva, con necrosis y hemorragia extensas, y conduce a la producción de esputo que puede ser viscoso, mucóide y rojo ladrillo, o fluido y de aspecto "similar a la jalea de grosella". En los casos graves se pueden observar abscesos pulmonares, enfermedad cavitaria crónica, hemorragia interna y hemoptisis. La pleuritis es habitual, lo que explica por qué el dolor pleurítico se observa en un 80% de los pacientes. *K. pneumoniae* también puede causar distintas infecciones extrapulmonares, como enteritis y meningitis (en lactantes), infecciones de las vías urinarias (en niños y adultos) y septicemia.

K. ozaenae y *K. rhinoscleromatis* son aislados infrecuentes considerados actualmente subespecies de *K. pneumoniae*; sin embargo, cada uno de ellos se asocia con un espectro singular de enfermedad. *K. ozaenae* se asocia con rinitis atrófica, un trastorno denominado ozena e infecciones purulentas de las mucosas nasales. Janda y cols.²⁴⁶ también han informado un caso de absceso corneal causado por *K. ozaenae*. Las comunicaciones del aislamiento de *K. ozaenae* de sangre, orina y tejidos blandos sugieren que el espectro de enfermedades causadas por este microorganismo es más amplio de lo que se creía.¹⁹⁷ *K. rhinoscleromatis* produce la enfermedad granulomatosa rinoscleroma, una infección de la mucosa respiratoria, la orofaringe, la nariz y los senos paranasales. Se deben realizar correlaciones clínicas cuando se recuperan estas especies en cultivos para determinar su importancia médica en los casos individuales. Aun cuando estas dos especies ya no son consideradas más verdaderas especies sino, más bien, cepas bioquímicamente inactivas de *K. pneumoniae*,⁴⁸ pensamos que la

Cuadro 6-17 Diferenciación de especies en los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*

PRUEBA BIOQUÍMICA	KLEBSIELLA			RAOULTELLA			
	<i>K. Pneumoniae</i> SUBESPECIE <i>pneumoniae</i>	<i>K. Penumoniae</i> SUBESPECIE <i>ozaenae</i>	<i>K. Pneumoniae</i> SUBESPECIE <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>R. ornithinolytica</i>	<i>R. planticola</i>	<i>R. terrigena</i>
Indol	–	–	–	+	+	V (20)	–
Rojo de metilo	–	+	+	V (20)	+	+	V (60)
Voges-Proskauer	+	–	–	+	V (70)	+	+
Ureasa	+	–	–	+	+	+	–
Lisina	+	V (40)	–	+	+	+	+
Ornitina	–	–	–	–	+	–	V (20)
ONPG	+	V (80)	–	+	+	+	+
Malonato	+	–	+	+	+	+	+
Crecimiento a:							
5 °C	–	–	–	–	+	+	+
10 °C	–	–	–	+	+	+	+
41 °C	+	ND	ND	+	+	+	–

+ : 90% o más de cepas positivas; – : 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ND: resultados no disponibles.
 Datos de Farmer II III, Davis BR, Hickman-Brenner FW y cols.¹⁶⁷

comunicación de los nombres *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* tiene importancia clínica debido a la asociación de estas dos cepas con enfermedades específicas.

Casi el 50% de las cepas de *K. oxytoca* remitidas a los CDC han sido de heces, y la siguiente fuente en frecuencia es la sangre.¹⁶⁵ Las especies que más recientemente han recibido nombre, *R. terrigena*²³⁶ y *R. planticola*,²⁴ reflejan sus fuentes en la naturaleza. *R. terrigena* se asemeja mucho a *K. pneumoniae* y ha sido aislada del suelo y del agua. Las cepas aisladas en seres humanos se han obtenido de las heces de personas sanas³⁹⁸ y del aparato respiratorio;³⁹⁶ sin embargo, no se ha mostrado su capacidad para producir infección humana. *R. planticola* (sinónimo *K. trevisanii*)^{172,187} ha sido aislado primariamente de ambientes botánicos y acuáticos. Las cepas aisladas en seres humanos han sido obtenidas del aparato respiratorio, la orina, el líquido cefalorraquídeo y la sangre,^{177,178} y la mayoría de ellas representan colonización y no infección. Algunos estudios de Francia y Alemania sugieren que hasta el 19% de las especies de *Klebsiella/Raoultella* son en realidad *R. planticola*,^{330,397,399} sin embargo, la aparición de *R. planticola* en los Estados Unidos parece ser menos frecuente.³⁰⁴ Véase en el cuadro 6-17 una lista de las características por medio de las cuales se pueden diferenciar estas especies.

Es probable que la incidencia mayor de infecciones debidas a especies de *Klebsiella* durante la última década refleje tanto un aumento de las infecciones hospitalarias en pacientes debilitados o inmunosuprimidos como una tendencia hacia una mayor resistencia a los antibióticos. En los Estados Unidos, *Klebsiella* representa 3-7% de todas las infecciones bacterianas hospitalarias, lo que la ubica entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en los hospitales.⁴⁰⁰ *Klebsiellae* tienen tendencia a albergar plásmidos resistentes a los antibióticos;

por lo tanto, se pueden prever infecciones por cepas multirresistentes. Casi todas las cepas clínicas son resistentes a ampicilina, carbenicilina y ticarcilina. Es de preocupación particular la aparición reciente de cepas de *Klebsiella* que tienen plásmidos que median la resistencia a agentes β -lactámicos de amplio espectro. Esta forma de resistencia se debe a la producción de enzimas β -lactamasas singulares, denominadas β -lactamasas de amplio espectro,^{240,290} observadas principalmente en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* y que hacen que sean resistentes a la mayoría de los agentes β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación. Una característica singular de las β -lactamasas de amplio espectro es su capacidad para escapar a la detección con la mayoría de las pruebas de sensibilidad de uso común y la preocupación resultante de que los microorganismos que las tienen sean considerados sensibles a los antibióticos a los que, de hecho, son resistentes.^{240,321} Este tema se explica con más detalle en el capítulo 17.

Klebsiella granulomatis (antes *Calymmatobacterium granulomatis*)⁷³ es un bacilo encapsulado gramnegativo con requerimientos nutricionales especiales que se encuentra dentro del citoplasma de los macrófagos. Es el agente etiológico del granuloma inguinal (también conocido como donovanosis), una enfermedad de transmisión sexual que afecta los genitales y los sitios circundantes.⁴²⁴ Se encuentra en focos geográficos específicos, principalmente Nueva Guinea, noroeste de Australia, sudeste de India, Caribe, partes de América del Sur, partes de África central y la región de KwaZulu/Natal de Sudáfrica.²⁶⁴ *K. granulomatis* no puede ser cultivado en medios de agar convencionales, aunque ha crecido con éxito en huevos embrionados y en un sistema de cocultivo de monolitos.²⁶⁴ En la actualidad, el diagnóstico de laboratorio del granuloma inguinal se basa en la observación de los "cuerpos de Donovan" en prepa-

rados de tejido o muestras de biopsia examinadas con tinciones de Giemsa y de Wright. Para aumentar la especificidad del diagnóstico, se han utilizado tinciones de Dieterle, Warthin-Starry²⁸⁴ y Giemsa rápida (Diff Quick).²⁸² Se ha comunicado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de donovanosis en muestras genitales.^{22,24} La azitromicina ha aparecido como fármaco de elección y se debe utilizar cuando se confirma o sospecha el diagnóstico.³¹¹

Género Enterobacter. Como muchas cepas del género *Enterobacter* producen gran cantidad de gas, durante muchos años la especie tipo fue denominada *Aerobacter aerogenes*. La designación del género fue cambiada por *Enterobacter* por Hornaeche y Edwards en 1960.^{279a}

Hay 16 especies incluidas en el género *Enterobacter*. Un desarrollo reciente ha sido la eliminación de uno de los biotipos de *E. agglomerans* y su ubicación en el género *Pantoea*.¹⁸⁸ Como género, *Enterobacter* tiene las características generales de *Klebsiellaceae*, pero puede ser diferenciado de la mayoría de las especies de *Klebsiella* porque son inmóviles y ornitina positivos. En el cuadro 6-18 se presentan las características bioquímicas que permiten diferenciar las especies de importancia médica.

E. aerogenes y *E. cloacae* son las especies halladas más a menudo en las muestras clínicas. Se distribuyen ampliamente en el agua, las aguas cloacales, el suelo y las verduras. Forman

parte de la flora entérica comensal y se cree que no ocasionan diarrea, aunque se ha aislado una cepa de *E. cloacae* productora de una toxina similar a Shiga de las heces de un lactante con síndrome urémico-hemolítico.³⁷⁹ También se asocian con distintas infecciones oportunistas que afectan las vías urinarias y respiratorias y las heridas cutáneas; en ocasiones, producen septicemia y meningitis.³⁷⁷

E. sakazakii, conocido como *E. cloacae* de pigmento amarillo,¹⁶³ ha sido hallado en varios casos de meningitis y sepsis neonatal.^{76,315,253,272,336,480} Se comunicaron tasas de mortalidad de hasta un 75%,^{279,341} lo que indica que puede ser altamente virulento. Algunas publicaciones recientes han ligado la infección por *E. sakazakii* en recién nacidos con fórmulas de leche en polvo contaminadas.⁵⁹⁻⁴⁸³ El pigmento amarillo brillante (particularmente intenso si los cultivos se incuban a 25 °C) y la naturaleza "resistente" de las colonias son los primeros indicios de la presencia de este microorganismo (*Pantoea agglomerans* también produce un pigmento amarillo, en general menos intenso y a menudo sólo después de la incubación tardía a temperatura ambiente). El patrón de descarboxilasa de *E. sakazakii* (prueba de lisina negativa, arginina positiva y ornitina positiva) ayuda a diferenciarlo de *E. aerogenes* (lisina positiva, arginina negativa y ornitina positiva) y de *P. agglomerans* (lisina, arginina y ornitina negativa); además, *E. sakazakii* no fermenta el sorbitol, al contrario de *E. cloacae*, que sí lo hace.

Cuadro 6-18 Diferenciación de especies de importancia clínica en el género *Enterobacter**

PRUEBA	<i>E. AEROGENES</i>	<i>E. AMNIGENUS</i> BIOGRUPO 1	<i>E. AMNIGENUS</i> BIOGRUPO 2	<i>E. ARSURIAE</i>	<i>E. CANCERIGENUS</i>	<i>E. CLOACAE</i>	<i>E. COWANI</i>	<i>E. GERGOVIAE</i>	<i>E. HORNACHEI</i>	<i>E. INTERMEDIUS</i>	<i>E. KOBEL</i>	<i>E. SAKAZAKII</i>
Rojo de metilo	-	-	V (65)	+	-	-	ND	-	V (57)	+	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Arginina	-	-	V (35)	V (21)	+	+	-	-	V (78)	-	+	+
Ornitina	+	V (55)	+	+	+	+	-	+	V (91)	V (89)	+	+
Ureasa	-	-	-	V (60)	-	V (65)	-	+	V (87)	-	-	-
Motilidad	+	+	+	-	+	+	+	+	V (52)	V (89)	+	+
Fermentación de:												
Lactosa	+	V (70)	V (35)	V (75)	-	+	+	V (55)	-	+	+	+
Sacrosa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	V (65)	V (25)	+
Adonitol	+	-	-	-	-	V (25)	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Rafinosa	+	+	-	V (70)	-	+	+	+	-	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Pigmento amarillo	-	-	-	-	-	-	V (66)	-	-	-	-	+

+; 90% o más de cepas positivas; -; 90% o más de cepas negativas; V; 11-89% de cepas positivas; ND; no disponible.

* El cuadro incluye sólo las especies de *Enterobacter* que han sido aisladas de muestras clínicas humanas. Las cepas que dan pruebas de triple descarboxilasa negativas pueden ser especies de *Pantoea*, y las cepas de con pruebas de lactosa negativas como sacrosa negativas pueden ser *Hafnia alvei* (véase cuadro 6-16).

E. gergoviae produce infecciones de las vías urinarias y se han aislado otras cepas en el aparato respiratorio y la sangre.³⁶ Desde el punto de vista bioquímico es más cercano a *E. aerogenes* (prueba de lisina positiva, arginina negativa y ornitina positiva), pero es fuertemente ureasa positiva. Puede ser diferenciado, además, por las reacciones negativas en adonitol, inositol y sorbitol, mientras que *E. aerogenes* muestra pruebas positivas con las tres reacciones.

Se ha notificado que *E. cancerogenus* (antes llamado *Erwinia cancerogena*, *Enterobacter taylorae* y grupo entérico 19 de los CDC)^{106,443} causa distintas infecciones clínicas, que incluyen osteomielitis después de una fractura abierta,³⁹² infección de heridas,⁴¹⁵ sobre todo después de un traumatismo grave o lesiones por aplastamiento,¹ infección de las vías urinarias,^{418,428} y bacteriemia y neumonía.⁴²⁸ Las características bioquímicas claves son sus reacciones lisina negativa, arginina positiva y ornitina positiva y sus reacciones negativas a adonitol, inositol, sorbitol, rafinosa y melibiosa. Las pruebas de lactosa son negativas pero las de ONPG, positivas, y hemos observado que las colonias que crecen en agar de MacConkey desarrollan centros violetas después de una incubación prolongada.

E. asburiae (antes llamado grupo entérico 17 de los CDC o *Citrobacter* atípico) es bioquímicamente similar a *E. cloacae*; sin embargo, es singular entre las especies de *Enterobacter* por ser inmóvil y Voges-Proskauer negativo. Se lo encontró en distintas fuentes humanas, como sangre, orina, heridas, tracto respiratorio y heces.³³ Se informó un caso de neumonía extrahospitalaria causada por *E. asburiae*.⁴⁶² Hemos observado una variación considerable en la capacidad de los sistemas comerciales para identificar en forma correcta esta especie.

E. amnigenus es fundamentalmente un microorganismo del agua que ha sido aislado en muestras humanas.²³⁸ Se informó en Francia sobre un caso de septicemia postransfusional causada por *E. amnigenus*.²⁴¹

E. hormaechei es una nueva especie de *Enterobacter* que recibió ese nombre en 1989 por Estenio Hormaeche, un microbiólogo uruguayo, quien (con P. R. Edwards) propuso y definió el género *Enterobacter*.¹⁶¹ Antes conocido como grupo entérico 75, desde el punto de vista bioquímico es más cercano a *E. taylorae* (ahora *E. cancerogenus*), salvo en que es urea positivo, sacarosa positivo y esculina negativo. Se han notificado cepas aisladas en sangre, esputo, heridas, oído, vesícula biliar y heces. En marzo de 1993, los investigadores de los CDC identificaron un brote hospitalario de septicemia por *E. hormaechei* en una unidad de cuidados intensivos neonatales. Cinco lactantes tuvieron hemocultivos positivos y otro lactante tuvo una traqueítis por ese microorganismo. En otros cuatro lactantes se identificó colonización. No se informó de ninguna muerte. Los cultivos ambientales mostraron que el microorganismo estaba presente en tres estufas de incubación y en el pomo de una puerta.^{79,499} Se comunicó un brote de infecciones del torrente sanguíneo por *E. hormaechei* en tres unidades de cuidados intensivos neonatales en Río de Janeiro. La revisión de las historias clínicas para los procedimientos previos puso de manifiesto la nutrición parenteral como único procedimiento en común.¹⁷⁸ Se ha visto un caso de bacteriemia recurrente causado por *E. hormaechei* en el University of Illinois Medical Center en un paciente de 2 años con un neuroblastoma que afectaba un ganglio linfático supraclavicular izquierdo, la glándula suprarrenal y un ganglio linfático periumbilical.

En 1981, se definió el grupo entérico 69 de los CDC para un grupo de cepas con pigmento amarillo semejantes desde el punto de vista bioquímico a *E. cloacae*. En 1996, se describió *Enterobacter kobei* como nueva especie de enterobacterias

semejantes a *Enterobacter cloacae*³³⁶ y similar al grupo entérico 69, pero que eran negativas en las pruebas de VP, fermentación de adonitol y producción de pigmento amarillo. Los estudios de hibridación de DNA realizados en los CDC y en el National Institute of Health, Tokio, llegaron a la conclusión de que las especies del grupo entérico 69 son variantes bioquímicas de *E. kobei* con pigmento amarillo.^{336,359} La mayoría de las cepas de *E. kobei* fueron aisladas de muestras clínicas que incluyeron sangre, esputo, fúeces y orina.^{336,454}

Enterobacter cowanii es una nueva especie propuesta para un grupo de microorganismos denominados Grupo NIH 42 (se refiere al National Institute of Health, Tokio).²¹⁵ Las cepas de *E. cowanii* son negativas para lisina y ornitina descarboxilasas y arginina dihidrolasa; por lo tanto, desde el punto de vista fenotípico se asemejan más a *Pantoea agglomerans*. Las pruebas útiles para la diferenciación de *P. agglomerans* son la utilización negativa del malonato y la fermentación de dulcitol y sorbitol (ambas negativas para *P. agglomerans*). De las nueve cepas estudiadas, ocho fueron aisladas de muestras clínicas: orina (cuatro), esputo (dos), sangre (una) y pus (una), pero su importancia clínica se desconoce.²¹⁵

Otras cuatro especies (*E. intermedius*, *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis* y *E. pyrinus*) se encuentran en el medioambiente y como patógenos de las plantas y sólo pocas veces han sido halladas en muestras clínicas humanas. No se sabía que *E. intermedius* (antes *E. intermedium* y Grupo H1)⁴⁴⁹ se presentara en seres humanos hasta 1987 cuando Prats y cols. comunicaron cuatro cepas de *E. intermedius* que habían sido aisladas de una herida en un pie, sangre, heces y bilis.⁴⁸⁸ Más recientemente, O'Hara y cols. notificaron el aislamiento de *E. intermedius* de la vesícula biliar de un paciente con colecistitis que también dio *Streptococcus* grupo D y *Staphylococcus* coagulasa negativo.³⁶³

Las especies de *Enterobacter*, junto con algunos otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*C. freundii*, especies de *Serratia*, *Morganella morganii* y especies de *Providencia*), portan un gen para la β -lactamasa codificada cromosómicamente que puede ser inducido por ciertos antibióticos, aminoácidos o líquidos corporales.²⁹⁰ Al contrario de las β -lactamasas mediadas por plásmidos, estas enzimas no son expresadas normalmente. Sólo bajo influencia de un inductor o luego de una mutación el gen se activa y la enzima se expresa. Por lo tanto, es preocupante que los microorganismos que albergan genes para β -lactamasas inducibles puedan mostrar una falsa sensibilidad si son evaluados en un estado no inducido. Recientemente, se han descrito métodos para la detección de resistencia debido a β -lactamasas inducibles.³³² Este tema se explica mejor en el capítulo 17.

Género *Pantoea*. A comienzos de la década de 1970, *P. agglomerans* (luego denominado *Enterobacter agglomerans*) fue responsable de un brote nacional de septicemia causado por líquidos intravenosos contaminados.³⁰³ El nuevo género *Pantoea* fue creado en 1989 y la especie tipo fue *P. agglomerans*.¹³⁶ Este taxón incluye las cepas tipo anteriores de *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* y *Erwinia mellei*. *Pantoea* deriva de una palabra griega que significa "de todos los tipos de fuentes", que describe así a estas bacterias que provienen de fuentes geográficas y ecológicas diversas. Se ha aislado una segunda especie, *P. dispersa*, de las superficies de plantas, semillas, seres humanos y del medioambiente. Ambas especies muestran pruebas de triple descarboxilasa negativas (lisina negativa, arginina negativa y ornitina negativa), pero pueden ser separadas por la salicilina, la cual es positiva para *P. agglomerans* y negativa para *P. dispersa*.³³⁸ Se des-

cribieron otras cinco especies que se encuentran en el suelo y las plantas (véase cuadro 6-5).

Género *Hafnia*. *H. alvei*, antes *Enterobacter hafnia*, es la única especie del género *Hafnia*. Las características bioquímicas son similares a las de las especies de *Enterobacter* salvo en que *H. alvei* no produce ácidos a partir de los siguientes hidratos de carbono: lactosa, sacarosa, melibiosa, rafinosa, adonitol, sorbitol, ducitol e inositol (véase cuadro 6-16). *H. alvei* puede ser distinguido de algunas especies de *Serratia* porque no produce lipasa ni desoxirribonucleasa. También hemos observado que, al contrario de otras especies de *Enterobacteriaceae*, este microorganismo despiden un fuerte olor a heces humanas. No está bien definida la importancia clínica de *H. alvei*. El microorganismo ha sido recuperado de las heces humanas en ausencia de síntomas. Se han comunicado casos aislados de infección en personas con *H. alvei* en heridas, abscesos, esputo, orina, sangre y otros sitios. En uno de nuestros laboratorios (University of Illinois) se aisló *H. alvei* en cultivo puro de una herida de tórax en un paciente luego de la cirugía torácica. Existen pruebas como para sugerir que *H. alvei* puede ser una causa nueva de gastroenteritis bacteriana aguda.^{10,812,813,817,823,868}

Sin embargo, Janda y cols. han mostrado ulteriormente que las cepas prototipo de *Hafnia alvei* que generan diarrea, de las cuales se comunicó que contienen el gen *eae* de *E. coli* enteropatógena, son de hecho una categoría de cepas pertenecientes al género *Escherichia* productoras de colitis que fueron mal identificadas como *Hafnia alvei* por el sistema API 20E.^{233,243} Estas cepas fueron designadas como la nueva especie *Escherichia albertii* explicada antes.²³³

Género *Serratia*. Las especies de *Serratia* son singulares entre las enterobacterias por producir tres enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNasa. La resistencia a la colistina y la cefalotina es otra característica que las distingue. En la actualidad existen 10 especies reconocidas, 7 de las cuales fueron recuperadas de muestras clínicas humanas. En el cuadro 6-19 se muestra la diferenciación bioquímica de especies de *Serratia* de importancia clínica.

S. marcescens es el miembro más importante del género *Serratia* y a menudo se asocia con distintas infecciones humanas, sobre todo neumonía y septicemia en pacientes con procesos malignos reticuloendoteliales que están recibiendo agentes quimioterápicos. En una época, el microorganismo se utilizaba como comensal inofensivo para rastrear la contaminación ambiental, sobre todo porque la pigmentación roja característica de algunas cepas era fácil de distinguir en los medios de cultivo. Sin embargo, en la actualidad el microorganismo es reconocido como un patógeno importante con propiedades invasivas y una tendencia a resistir a muchos antibióticos de uso frecuente. *S. marcescens* puede ser un oportunista hospitalario importante, como lo demuestra un caso reciente de meningitis infantil luego del uso de una solución desinfectante de cloruro de benzalconio contaminada.⁴¹⁷ En la actualidad, se sabe que las especies denominadas *S. liquefaciens* no constituyen una especie aislada sino un conjunto de varios grupos de hibridación del DNA, que incluyen especies denominadas *S. proteamaculans* y *S. grimesii*. Se las encuentra sobre las superficies de las plantas y pertenecen al complejo "*Serratia liquefaciens-proteamaculans-grimesii*". Algunas cepas de estas especies producen sustancias químicas que promueven el crecimiento de las plantas, tienen propiedades antimicóticas, estimulan el establecimiento de simbioses que fijan nitrógeno y actúan como patógenos de los insectos.¹⁶ Dado que las especies que conforman este grupo de hibridación no pueden ser separadas mediante las pruebas bioquímicas actuales, se sugiere

comunicar a los miembros de este grupo como "grupo de *Serratia liquefaciens*". Este grupo se diferencia de *S. marcescens* por su capacidad para fermentar L-arabinosa.

S. rubidea, como su nombre lo indica, produce colonias que tienen pigmento rojo pero pocas veces son aisladas de muestras clínicas humanas. Ursua y cols. informaron sobre un caso de *S. rubidea* aislado de la bilis y la sangre de un paciente con un carcinoma de las vías biliares que se sometió a procedimientos invasivos.⁴⁸² *S. odorifera* produce un olor a suciedad y humedad, similar al de las papas sin pelar. Se describen dos biogrupos. El biogrupo 1 da pruebas de ornitina positiva, sacarosa positiva y rafinosa positiva y se aísla predominantemente del esputo; sin embargo, se informó que produjo sepsis grave en pacientes ancianos e inmunodeprimidos,^{112,318} y sepsis asociada con catéteres en un adolescente con talasemia mayor que había sido esplenectomizado.¹⁹⁵ El biogrupo 2 muestra estas tres pruebas negativas y fue aislado en sangre y líquido cefalorraquídeo.¹⁸³ Las cepas de *S. plymuthica* pueden tener pigmento rojo y han sido aisladas en muestras de suelo, agua y esputo humano. Aunque por lo general no se lo considera causa de infecciones humanas graves, algunas comunicaciones recientes han mostrado que puede ser un patógeno importante que produce osteomielitis crónica,²¹⁵ infecciones de heridas^{78,116} y bacteriemia adquirida en la comunidad⁴¹⁸ y hospitalaria^{78,116,236} y ha sido aislado del líquido peritoneal de un paciente con colecistitis.⁷⁸ *S. ficaria* tiene un hábitat natural en los higos y la avispa de los higos.³⁹³ El aislamiento de esta especie de muestras humanas es excepcional y suele acompañarse por el antecedente de la ingestión de higos.^{12,21,117} *S. entomophila* es un patógeno de los insectos y no se ha comunicado ningún aislado humano. "*S.*" *fonticola* no es realmente una especie de *Serratia* y es probable que sea reclasificado. Es un microorganismo del agua aislado pocas veces en muestras clínicas humanas, sobre todo de heridas.^{44,105,393} *S. fonticola* fue aislado en la sangre de un paciente con una neoplasia digestiva en el University of Illinois Medical Center.

TRIBU PROTEEAE

Proteeae comprende tres géneros: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*. En el cuadro 6-6 se presentan las características que sugieren que un microorganismo pertenece a esta tribu. O'Hara y cols. han revisado la clasificación, la identificación y la importancia clínica de *Proteeae*.³⁸⁴

Género *Proteus*. Los estudios de relación del DNA han aclarado la clasificación de los microorganismos dentro de *Proteeae*. En la actualidad, el género *Proteus* comprende cinco especies con nombre: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri* y *P. hauseri*, y tres especies genómicas sin nombre que antes eran identificadas como miembros del biogrupo 3 de *P. vulgaris*.⁵² Las cepas de *P. vulgaris* han sido colocadas tradicionalmente en los tres biogrupos siguientes:

Proteus biogrupo 1: prueba de indol negativa, salicilina negativa, esculina negativa; resistente al cloranfenicol.

Proteus biogrupo 2: indol positiva, salicilina positiva, esculina positiva.

Proteus biogrupo 3: indol positiva, salicilina negativa y esculina negativa.

Proteus biogrupo 1 es una especie genética única conocida en la actualidad como *P. penneri*.²¹⁹ *Proteus* biogrupo 2 es una especie genética única y mantendrá el nombre de *P. vulgaris*. *Proteus* biogrupo 3 consiste en cuatro especies genéticas sepa-

Cuadro 6-19 Diferenciación de especies de importancia clínica en el género *Serratia*^a

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>S.</i> <i>marcescens</i>	<i>S.</i> <i>liquefaciens</i>	<i>S.</i> <i>rubidaea</i>	<i>S.</i> <i>plymthica</i>	<i>S.</i> <i>ficaria</i>	<i>S.</i> <i>fonticola</i>	BIOGRUPO <i>S. odorifera</i>	
							1	2
DNasa (25 °C)	+	V (85)	+	+	+	-	+	+
Lipasa (aceite de maíz)	+	V (85)	+	V (70)	V (77)	-	V (35)	V (65)
Gelatinasa (22 °C)	+	+	+	V (60)	+	-	+	+
Lisina (de Moeller)	+	+	V (55)	-	-	+	+	+
Ominina (de Moeller)	+	+	-	-	-	+	+	-
Olor a putrefacción	-	-	V	-	+	-	+	+
Pigmento rojo, amarillo o naranja	V	-	V	V	-	-	-	-
Fermentación de:								
L-arabinosa	-	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol	-	-	V (83)	-	+	+	-	-
D-sorbitol	+	+	-	V (65)	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	V (21)	+	-
Rafinosa	-	V (85)	+	+	V (70)	+	+	-
Utilización de malonato	-	-	+	-	-	+	-	-

^a+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas.
^bDatos obtenidos de la referencia⁽¹⁾ y otras fuentes.
 El cuadro incluye sólo las especies de *Serratia* que han sido aisladas de muestras clínicas humanas.

radar que son designadas grupos DNA (variedades genómicas) 3, 4, 5 y 6. El grupo DNA 3 puede ser distinguido de *Proteus* grupos DNA 4, 5 y 6 porque muestra pruebas negativas de tartrato de Jordan, lipasa y DNasa (cuadro 6-20). Como el grupo DNA 3 puede ser separado fenotípicamente de las otras especies genómicas de *Proteus*, se lo denominó oficialmente *Proteus hauseri* en honor a Gustav Hauser, el microbiólogo alemán, quien propuso el género *Proteus* en 1885.⁽³⁾ *Proteus* de especies genómicas 4, 5 y 6 se mantienen sin nombre hasta que se logre una mejor diferenciación fenotípica. En el cuadro 6-20 se indican las diferencias bioquímicas de las especies de *Proteus* y los grupos de DNA.

El género *Proteus* se encuentra en el suelo, el agua y los materiales con contaminación fecal. Las especies de *Proteus* muestran el rasgo característico de la motilidad ascendente, que se observa en agar no inhibidor (p. ej., placa de agar sangre) como una propagación ondulante del microorganismo a través de la totalidad de la superficie del agar (véase lámina en color 6-1D). Siempre que se observe este movimiento, se deben sospechar especies de *Proteus*. *P. mirabilis* es la especie aislada con mayor frecuencia en los seres humanos, sobre todo como agente causal tanto de infecciones urinarias como de heridas. *P. vulgaris* se recupera más comúnmente de sitios infectados en huéspedes inmunosuprimidos, sobre todo los que

Cuadro 6-20 Diferenciación de las especies dentro de los miembros del género *Proteus*^a

PRUEBA	<i>P.</i> <i>mirabilis</i>	<i>P.</i> <i>myxofaciens</i>	<i>P.</i> <i>penneri</i>	<i>P.</i> <i>vulgaris</i>	<i>P.</i> <i>hauseri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> BIOGRUPO 3		
						GRUPO DNA 4	GRUPO DNA 5	GRUPO DNA 6
Ominina	+	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	+	+	+	+	+
Esculina	-	-	-	+	-	-	-	V (9)
Sulfocilina	-	-	-	+	-	-	-	V (9)
Lipasa	+	+	V (35)	V (14)	-	+	+	V (90)
Tartrato	V (87)	+	V (89)	V (14)	-	+	+	+
Ramiflorosa	-	-	-	-	-	+	V (17)	-
DNasa 25 °C	V (50)	V (50)	V (12)	+	-	+	+	V (55)
Acetato	V (20)	-	V (12)	V (14)	-	-	V (12)	V (18)

^aDatos obtenidos de la referencia⁽¹⁾.
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; los números entre paréntesis son los porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

reciben regímenes prolongados de antibióticos. Como se señala en el cuadro 6-20, *P. vulgaris* da una prueba de indol positiva, mientras que *P. mirabilis* da una prueba de indol negativa. Por lo tanto, la realización de una prueba de indol rápida en una colonia con movimiento característico, puede dar una identificación presuntiva rápida de *P. mirabilis* o *P. vulgaris*. Las nuevas especies *P. penneri*²¹⁹ y *P. myxofaciens* también son indol negativas pero pocas veces se encuentran en laboratorios clínicos (el último es un patógeno de las larvas de lagartos y no ha sido aislado en muestras humanas). Por lo tanto, a los fines prácticos, el aislamiento de una especie de *Proteus* indol negativa puede identificarse presuntivamente como *P. mirabilis*. Casi todas las cepas de *P. mirabilis* son sensibles a ampicilina y cefalosporinas, mientras que *P. vulgaris* es resistente; por consiguiente, la mayoría de los pacientes con infección clínica, de los cuales se aísla una especie de *Proteus* indol negativa, pueden ser tratados con una de las penicilinas o cefalosporinas de amplio espectro.

P. penneri se asemeja estrechamente a *P. vulgaris* pero difiere de él por las pruebas de indol negativa, salicilina negativa y esculina negativa y por no producir sulfuro de hidrógeno en TSI. Cuando se sospecha *P. penneri*, se debe realizar una prueba de sensibilidad al cloranfenicol a los fines de la identificación. *P. penneri* es resistente al cloranfenicol, mientras que otras especies de *Proteus* indol negativas son sensibles (véase cuadro 6-20).²¹⁹ Las infecciones humanas por *P. penneri* documentadas han estado limitadas principalmente a las vías urinarias y a las heridas de abdomen, ingle, cuello y tobillo.^{219,278} En una comunicación, se describió un paciente con leucemia que sufrió una bacteriemia por *P. penneri* con un absceso subcutáneo simultáneo del muslo, lo que demostró el potencial invasivo de esta bacteria.¹³³ Se aconseja a los microbiólogos sospechar de cualquier colonia de *P. vulgaris* que sea indol negativa y sulfuro de hidrógeno negativa porque posiblemente pueda ser de *P. penneri*.

Género Morganella. Sobre la base de los estudios genéticos realizados por Brenner y cols. en 1978, el microorganismo antes designado *Proteus morganii* fue reasignado al nuevo género *Morganella* como *M. morganii*.⁴⁸ Los estudios de Jensen y cols. mostraron que *M. morganii* puede ser separado, además, en tres grupos y siete biogrupos por relación de DNA.²⁹⁰ El grupo 1 por relación de DNA contiene los biogrupos 1 a D. El grupo 2

por relación de DNA contiene los biogrupos E y F y dos tercios del biogrupo G (denominado biogrupo G-2). El grupo 3 por relación de DNA contiene al tercio restante del biogrupo G (denominado biogrupo G-1). Como G-1 y G-2 son fenotípicamente indistinguibles, Jensen y cols. propusieron dividir *M. morganii* sólo en dos subespecies sobre la base de la fermentación de la trehalosa.²⁹⁰ *M. morganii* que son incapaces de fermentar la trehalosa son designados *M. morganii* subespecie *morganii* y los que pueden utilizar trehalosa son designados *M. morganii* subespecie *sibonii*.

M. morganii es una causa tanto de infecciones de las vías urinarias como de las heridas y ha sido implicado como causa de diarrea. Las infecciones graves comunicadas como causadas por *M. morganii* incluyen un caso de meningitis en un paciente con SIDA³⁰⁶ y un caso de meningitis y absceso encefálico en un lactante de 8 días.⁴⁴⁷ Como se muestra en el cuadro 6-6, el patrón de prueba de citrato de Simmons negativa, sulfuro de hidrógeno negativa y ornitina descarboxilasa positiva es característico del género. En el cuadro 6-21 se ofrece la diferenciación bioquímica de las subespecies y los biogrupos.

Género Providencia. Se reconocen actualmente cinco especies de *Providencia*: *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* y las especies recién descritas *P. rustigianii*²²⁸ y *P. heimbachae*.³¹⁴ Todas las especies del género *Providencia* desaminan fenilalanina, pero sólo *P. rettgeri* hidroliza siempre la urea. En el cuadro 6-22 se muestran las diferencias bioquímicas de las especies.

Salvo por producir infecciones de las vías urinarias, para las cuales Pender ha citado varios brotes hospitalarios,³⁴¹ las infecciones por especies de *Providencia* son infrecuentes y están limitadas a comunicaciones de casos esporádicos. Todas las especies pueden ser aisladas de las heces; sin embargo, sólo *P. alcalifaciens* puede asociarse con enfermedad diarreica, habitualmente en los niños.²⁴⁷ Hickman-Brenner y cols.²²⁹ designaron *P. rustigianii* a lo que antes se conocía como *P. alcalifaciens* biogrupo 3. Este microorganismo también se aisló en las heces; sin embargo, su papel en la enfermedad diarreica sigue siendo cuestionable. Se ha comunicado una nueva especie, *P. heimbachae*, en las heces de pingüinos y en un feto abortado de vaca.³¹⁴ Existe sólo una notificación de infección humana por *P. heimbachae*, obtenido de las heces de una mujer de 23 años con diarrea idiopática.³⁶⁰

Cuadro 6-21 Diferenciación de especies dentro del género *Morganella**

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>M. morganii</i> SUBESPECIE <i>morganii</i> BIOGRUPOS				<i>M. morganii</i> SUBESPECIE <i>sibonii</i> BIOGRUPOS		
	A	B	C	D	E	F	G
Lisina	-	+	-	+	+	d+	-
Ornitina	+	+	-	-	+	-	+
Trehalosa	-	-	-	-	+	+	+
Tetraciclina (% de sensibilidad)	100*	100	14	100	0	0	21
Motilidad	+	-	d+	-	+	+	+

*Datos obtenidos de la referencia²⁹⁰.

*Cepas con una zona ≥ 28 mm alrededor de la tetraciclina fueron consideradas sensibles (concentración inhibitoria mínima [CIM], ≤ 2 µg/mL) y aquellas con una zona de ≤ 13 mm de diámetro fueron consideradas resistentes a tetraciclinas (CIM ≥ 32 µg/mL).

+; 90% o más de cepas positivas; -; 90% o más de cepas negativas; V; 11-89% de cepas positivas; d+; reacción tardía, 50-89% positiva dentro de las 48 horas.

Cuadro 6-22 Diferenciación de especies dentro del género *Providencia*

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>P. heimbachae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. rettgeri</i>
Hidrólisis de urea	-	-	-	V (30)	+
Utilización de citrato	+	-	-	+	+
Fermentación de:					
Inositol	-	-	V (46)	+	+
Adonitol	+	-	+	-	+
Arabitol	-	-	+	-	+
Trehalosa	-	-	-	+	-
Galactosa	-	+	+	+	+

+; 90% o más de cepas positivas; -; 90% o más de cepas negativas.
 Datos obtenidos de la referencia¹⁰⁰ y otras fuentes.

TRIBU YERSINIEAE

Tres especies de *Pasteurella*, que incluyen el agente causal de la peste humana, *P. pestis*, fueron asignados antes a un nuevo género, *Yersinia*, en la octava edición del *Manual de Bergey* y colocados en las enterobacterias. El nombre para el género *Yersinia* proviene del bacteriólogo francés Alexander Yersin, quien en 1984 identificó por primera vez el microorganismo denominado ahora *Y. pestis*. En el cuadro 6-6 se presentan las características claves de *Yersiniaceae*.

Aunque las especies de *Yersinia* califican desde el punto de vista bioquímico para la inclusión en las enterobacterias, las células parecen pequeñas y cocobacilares en los frotis teñidos con Gram y pueden ser pequeñas y puntiformes en el agar de MacConkey, sobre todo para ciertas cepas de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*. El crecimiento óptimo ocurre entre 25 y 32 °C. Las colonias tienden a ser puntiformes luego de 24 horas de incubación en agar sangre ovina. Si se continúa la incubación a temperatura ambiente, después de 48 horas pueden observarse colonias blancogrisáceas convexas que miden 1 a 2 mm de diámetro.

Género *Yersinia*. *Yersinia* es el único género en *Yersiniaceae*. Se incluyeron tres especies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*, cuando el género fue transferido a las enterobacterias. En 1980, se propusieron tres especies nuevas para cepas que antes eran subgrupos de *Y. enterocolitica*:^{34,49,57,481} *Y. frederiksenii* es el nombre dado al biogrupo con prueba de ramnosa positiva;⁴⁸¹ *Y. intermedia* es la designación de esas cepas atípicas que fermentan ramnosa, rafinosa y melibiosa,⁴⁸ y *Y. kristensenii* es el nombre para el biogrupo previo con pruebas de *Y. enterocolitica* sacarosa negativa y trehalosa positiva.³⁴ En la actualidad, sólo se ha mostrado indudablemente que el género *Yersinia* incluye 11 especies; sin embargo, sólo tres (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*) son patógenos humanos. Una especie, *Y. ruckeri*, un patógeno de los peces del que no se sabe que produzca infección humana, probablemente será cambiado a un nuevo género.¹³⁹ En el cuadro 6-23 se incluyen las características diferenciales de estas distintas especies.

Peste – *Y. pestis*. La peste es una enfermedad infecciosa de la antigüedad que persiste en los tiempos modernos. *Y. pestis*, que sufre un ciclo vital obligado pulga-roedor-pulga, produce la peste bubónica, una enfermedad zoonótica rápida y sumamente fatal responsable al menos de tres pandemias que ocurrieron en los siglos V-VI, VIII-XIV y XIX-XXI (recuadro 6-13).¹⁰⁹

Epidemiología. *Y. pestis* es endémica en varios roedores, entre ellos ratas, ardillas terrestres, perros de las praderas, ratones y conejos. Se presentan dos formas epidémicas de la enfermedad: la peste urbana, que se mantiene en la población de ratas urbanas y la peste selvática, que es endémica en 17 estados del oeste (fig. 6-7) y es transmitida por perros de las praderas, ratones, conejos y ratas. El microorganismo es transmitido de un roedor a otro o del roedor al hombre por las pulgas. Los casos humanos se han concentrado en dos regiones principales de los Estados Unidos: 1) un área del sudoeste que incluye Nuevo México, noreste de Arizona, sur de Colorado y sur de Utah, y 2) una región de la costa del Pacífico localizada en California, Oregón y oeste de Nevada (fig. 6-7).⁸⁶ Durante 1988-2002, se comunicaron 112 casos humanos de peste en 11 estados del oeste. La mayoría (97) sufrieron exposición en cuatro estados (Nuevo México, Colorado, Arizona y California).¹⁰¹ Cerca del 80% de estas exposiciones ocurrieron en ambientes peridomésticos, sobre todo los que proporcionan abundante alimento y albergue para roedores infestados por pulgas y susceptibles a la peste. Las infecciones domésticas ocurren cuando las personas, los animales domésticos (en especial los gatos) y los roedores peridomésticos llevan pulgas a la casa y exponen a más personas. Los gatos domésticos a los que se les permite vagar libremente en áreas donde ocurre la peste en los roedores tienen un riesgo elevado de infección y, por lo tanto, aumentan el riesgo de la transmisión peridoméstica a los seres humanos. Los abscesos bucales se desarrollan en los gatos infectados, por medio de los cuales transmiten la peste directamente a los individuos a través de los lamidos, los arañazos o las mordidas.⁴⁶⁴ Entre 1977 y 1998, se comunicaron 23 casos humanos de peste transmitida por gatos en los estados del Oeste y cinco de los que se enfermaron fallecieron.¹⁰³

Los viajeros pueden contraer la peste en un área y enfermarse en otra área donde la peste no es endémica (peste peripatética). Si bien es rara, es más probable que la peste peripatética tenga un desenlace fatal debido a demoras terapéuticas o a diagnósticos equivocados en áreas donde los profesionales de la salud pueden estar menos familiarizados con la enfermedad.¹⁰¹ En el estado actual de una mayor conciencia de un posible acto de terrorismo, los casos peripatéticos también podrían confundirse con los que surgen por la liberación intencional de las bacterias de la peste. (Véase recuadro 6-14).

Síndromes clínicos. Se reconocen tres formas clínicas de peste: bubónica, septicémica y neumónica. Las formas septicémica y neumónica suelen ser secundarias a la forma bubónica

Cuadro 6-23 Diferenciación de especies dentro del género *Yersinia*

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. ruckeri</i>
Indol	-	-	V (50)	+	+	V (30)	-	-	-	-
Omitina	-	-	+	+	+	+	V (40)	V (80)	V (80)	V (25)
Motilidad 25-28 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Fermentación de:										
Sacarosa	-	-	+	+	+	-	V (20)	+	+	+
Ramnosa	-	V (70)	-	+	+	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	V (75)	+	+	+	-	+	+	V (25)
Sorbitol	V (50)	-	+	+	+	+	V (60)	+	+	+
Melibiosa	V (50)	V (70)	-	-	V (80)	-	-	-	-	V (50)

Datos obtenidos de las referencias^{11,26} y otras fuentes. Todas las pruebas se realizaron a 25-28 °C.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ND: resultados no disponibles.

la cual es la más frecuente en los Estados Unidos (véase recuadro 6-13). La peste bubónica se caracteriza por tumefacción de los ganglios linfáticos cervicales, axilares e inguinales, según la ubicación de la puerta de entrada de las bacterias. La diseminación hematogena de las bacterias a otros órganos y tejidos puede producir coagulación intravascular y shock endotóxico, lo que causa un cambio de color oscuro en las extremidades (lámina en color 6-5A; recuadro de correlación clínica 6-5).

Diagnóstico de laboratorio. La confirmación de laboratorio de todas las formas de peste se realiza mediante métodos microbiológicos o mediante la demostración serológica de los títulos de antígenos o anticuerpos. Nuestros colegas del Departamento de Salud de Colorado han observado que los hemocultivos son positivos en un 80% de los pacientes con peste bubónica y en el 100% de los pacientes con peste septicémica. Las tinciones de Gram (lámina en color 6-5B) de aspirados de bubones muestran bacilos gramnegativos en cerca de dos tercios de los casos y las tinciones de Wright-Giemsa (lámina en color 6-5C) de frotis de sangre periférica a menudo muestran la tinción bipolar característica de las yersinias. Las colonias tienen crecimiento lento en medios comunes y se dice que tienen el aspecto del cobre repujado cuando se las observa con el estereoscopio (lámina en color 6-5D). La reacción en agar TSI en 24 horas es similar a la observada con especies de *Pasteurella* (producción de ácidos débiles en la porción inclinada, con pocos cambios o ninguno en el extremo). Se ha creado una prueba diagnóstica rápida que utiliza una prueba simple con tiras reactivas y anticuerpos monoclonales para detectar el antígeno F1, una proteína específica de *Y. pestis*. La prueba produce resultados confiables en 15 minutos y podría ayudar a controlar la enfermedad en los países en vías de desarrollo y tal vez acelerar la detección y el tratamiento de la infección durante una ataque bioterrorista.¹⁰⁷

Infecciones causadas por *Y. pseudotuberculosis*. *Y. pseudotuberculosis* también es endémica en una amplia variedad de animales, que incluyen aves de corral y es responsable de linfadenitis mesentérica, sobre todo en niños en los cuales se manifiesta una enfermedad clínica que simula una apendicitis.⁴⁷⁴ La forma septicémica de infección ocurre pocas veces y

se describió principalmente en pacientes con un trastorno subyacente, como cirrosis hepática, hemocromatosis o diabetes, con una mortalidad de hasta un 75% a pesar del tratamiento antibiótico.²⁹¹ Se han informado raros casos de infección de las vías urinarias y prostatitis crónica.^{123,238} Se desconocen los vehículos y las fuentes de infección. En virtud de su similitud con *Y. enterocolitica*, se presumió que es un posible patógeno transmitido por los alimentos, pero la evidencia está limitada a algunos brotes sugestivos y dos brotes más grandes, uno en Canadá ligado a leche pasteurizada³⁴⁷ y uno en Finlandia debido a lechuga romana rastreada hasta una granja que utilizaba agua no tratada para el riego por aspersión de los campos.³⁴⁸

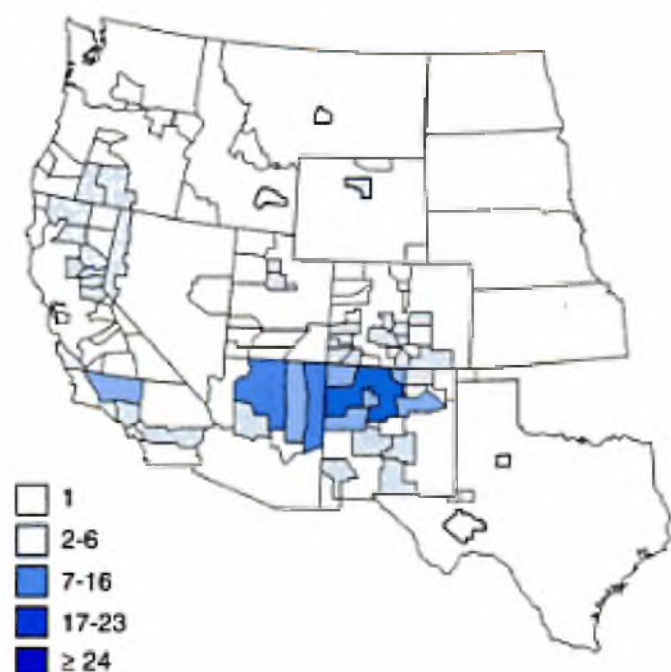


Figura 8-7 Casos de peste, por condado; oeste de los Estados Unidos, 1970-2002.

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention. MMWR 2003;52:725-728.

CUADRO DE CORRELACIONES CLÍNICAS 6-5
Peste humana

Cuando se introducen los bacilos de la peste en un huésped humano, los microorganismos se replican en el sitio inicial de infección, que puede ser el sitio de la mordedura de la pulga, el torrente sanguíneo o el pulmón y como resultado pueden aparecer tres formas clínicas de peste humana:

Bubónica: período de incubación de 7 días o menos después de la picadura de una pulga infectada. Las bacterias se propagan a los ganglios linfáticos regionales, habitualmente en la ingle (más frecuente), la axila o el cuello. Un signo incipiente de infección de los ganglios linfáticos es la aparición de tumefacciones grandes y dolorosas denominadas bubones. A menudo existe el inicio súbito de fiebre, escalofríos, debilidad y cefalea. En horas, los pacientes pueden notar dolor intenso en la región de los bubones. Los pacientes sufren prostración y sopor, y pueden estar agitados, sobre todo con la manipulación de los bubones. Es la forma más leve de peste; sin embargo, la tasa de mortalidad en los casos no tratados es de un 75%.

Neumónica: esta forma suele ser secundaria al proceso bubónico, aunque también puede ser el resultado de la exposición directa a gotitas respiratorias de otro paciente neumónico o de gatos infectados.^{181,182} La incubación es más corta (2 a 3 días); los pacientes pueden tener al principio fiebre y malestar general y luego de un día aparecen los signos pulmonares. En estos pacientes, se observa tos, dolor torácico y hemoptisis, con un esputo casi siempre purulento que contiene bacilos de la peste (láminas en color 6-5B, 6-5C). La peste neumónica es seguida rápidamente por sepsis y muerte a menos que se inicie el tratamiento antimicrobiano dentro del primer día. La tasa de mortalidad excede el 90% si no es tratada. Las personas con presunta peste neumónica deben ser colocadas en aislamiento respiratorio y se debe comunicar de inmediato a las autoridades de salud pública para iniciar un diagnóstico rápido, evaluaciones ambientales y medidas de control.

Septicémica: infección directa del torrente sanguíneo por la picadura de una pulga o propagación del bacilo de la peste desde los ganglios linfáticos hasta el torrente sanguíneo, que puede producir peste septicémica. En esta forma, el 100% de los pacientes se vuelven septicémicos, con hemocultivos positivos. Se desarrolla fiebre alta, delirio, convulsiones en los niños, shock séptico y coagulación intravascular diseminada (CID). Debido a la aparición de manchas hemorrágicas negras (lámina en color 6-5A) se le dio a la peste el nombre "muerte negra".

Diagnóstico: se debe sospechar la peste en los pacientes febriles que han estado expuestos a roedores u otros mamíferos en áreas endémicas conocidas (fig. 6-7). El diagnóstico diferencial incluye síndrome de Reye, tularemia, neumonía bacteriana y abdomen quirúrgico agudo. Una evolución febril en un paciente prostrado con un bubón debe sugerir peste o tularemia; se puede hacer fácilmente el diagnóstico bacteriológico con un extendido y cultivo del aspirado de un bubón.

Tratamiento: terapia primaria: estreptomicina; utilizar alternativamente gentamicina, tetraciclinas o cloranfenicol.¹⁸³

Modificado de Strouten.⁴⁶⁰

Recuadro 6-13 *Reseña histórica de la peste*

Las tres pandemias mayores ocurrieron con intervalos de 600 años, cada una de ellas al final de una época histórica importante: la peste justiniana a finales de la Antigüedad, la muerte negra a finales de la Edad Media y la pandemia moderna al término de la era actual.

Primera pandemia. La peste justiniana (541-544), nombre en honor al emperador romano del siglo vi, afectó a los países mediterráneos desde 532 hasta 595 y produjo más de 100 millones de muertes. Comenzó en Egipto y se propagó a través de Medio Oriente y Europa Mediterránea. Después, las epidemias 2ª a 11ª (558-654) ocurrieron en ciclos de 8-12 años, hasta afectar por último a todo el "mundo conocido".

Segunda pandemia. La muerte negra (1347-1351) se originó en el área del Mar Negro, se propagó a Sicilia y finalmente afectó toda la región de Europa hasta Gran Bretaña, Escandinavia y Rusia Occidental. Un total de 17-28 millones de europeos fallecieron por la enfermedad, lo que representaba el 30-40% de la población europea. Las epidemias continuaron en ciclos de 2-5 años desde 1361 hasta 1480 y en ciclos menos frecuentes en el siglo xviii. La segunda pandemia abarcó nuevamente a todo el "mundo conocido".

Tercera pandemia. La pandemia moderna comenzó en 1855 en Yunnan, una provincia del sudoeste de Asia. Hong Kong fue afectada en mayo de 1894; Bombay en 1896; Madagascar en 1896; Egipto, Portugal, Japón, Paraguay y el este de África en 1899; y Manila, Glasgow, Sydney y San Francisco en 1900. Los brotes en la India afectaron a más de 10 millones de víctimas entre 1896 y 1918, y causaron la mayoría de las muertes que ocurrieron durante esta pandemia. Luego aparecieron epidemias locales en todo el mundo hasta la década de 1950, cuando la pandemia terminó.

La peste en los Estados Unidos. La peste en Hong Kong aparecida en 1894 se propagó rápidamente y alcanzó el puerto de San Francisco traída por los ocupantes de un bote en 1900. Casi al mismo tiempo apareció en Brasil, Nueva Orleans y Nueva York. La reticencia de los funcionarios de salud de California a admitir que existía la peste en Chinatown condujo a la iniciación de la infección selvática. Esta infección (fundamentalmente por la ardilla de tierra) se propagó por gran parte del oeste de los Estados Unidos (17 estados) y la mayoría de los casos ocurrieron en Arizona, California, Colorado, Nuevo México y Oregón. Entre 1947 y 1996, hubo 390 casos de peste en los Estados Unidos, que condujeron a 60 (15,4%) muertes. La forma más frecuente fue la peste bubónica (327 [84%] casos que condujeron a 44 [14%] muertes), seguida por la peste septicémica primaria (49 [13%] casos y 11 [22%] muertes) y la peste neumónica primaria (7 [2%] casos y 4 [57%] muertes). Siete casos y una muerte no fueron clasificados.⁶³

los seres humanos es la vía digestiva oral y la infección ocurre en el ileon terminal, que desde el punto de vista anatómico está adyacente al apéndice. El microorganismo se adhiere al ileon, lo penetra y produce ileítis terminal, linfadenitis y enterocolitis aguda, con manifestaciones secundarias de eritema nudoso, poliartritis⁴⁸⁵ y, menos a menudo, septicemia^{122,175} y endocarditis.¹⁹¹ La septicemia por *Y. enterocolitica* se asocia casi exclusivamente con pacientes que tienen una sobrecarga de hierro o aquellos tratados con el agente quelante del hierro desferoxamina.⁴⁶ Los pacientes con sobrecarga de hierro y β -talasemia tienen un riesgo muy aumentado de sufrir una yersiniosis grave aun cuando su carga corporal de hierro (como lo indica el nivel de ferritina en suero) esté sólo moderadamente elevada y no estén recibiendo tratamiento quelante del hierro.⁶ Existen seis biovariedades (1A, 1B, 2, 3, 4 y 5) y más de 50 serogrupos de *Y. enterocolitica*; sin embargo, sólo cinco, designadas 0:1,2 a,3; 0:3; 0:5,27; 0:8 y 0:9, suelen considerarse patógenas para los

Las principales pruebas bioquímicas que diferencian a *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* son ornitina descarboxilasa, sacarosa y sorbitol. *Y. pseudotuberculosis* es negativo para las tres, mientras que *Y. enterocolitica* es positivo (cuadro 6-23).

Infecciones causadas por *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* está ampliamente distribuida en reservorios acuáticos y animales, y los cerdos sirven como reservorio principal para las cepas patógenas humanas.⁴⁶ Es la especie más frecuente de *Yersinia* aislada en muestras clínicas. La puerta de entrada en

Recuadro 6-14 Epidemiología, diagnóstico, tratamiento y prevención y comunicación de la peste (*Yersinia pestis*)

Epidemiología

- La peste suele transmitirse a los seres humanos por la picadura de una pulga de roedores infectada.
- El período de incubación es de 1-7 días para la peste bubónica y de 1-4 días para la peste neumónica.
- La tasa de mortalidad de casos para la peste bubónica no tratada es $\geq 50\%$.
- Las mascotas domésticas (gatos y perros) pueden portar pulgas infectadas.
- Los riesgos incluyen la caza, las trampas, la propiedad de gatos y la residencia rural en áreas donde la peste es endémica.
- La transmisión persona a persona puede ocurrir después del contacto con una lesión supurada (peste bubónica) o a través de microgotas respiratorias (peste neumónica).
- La peste de adquisición natural comienza de manera típica como peste bubónica; la liberación intencional (p. ej., el terrorismo) se manifestaría principalmente como peste neumónica.

Hallazgos clínicos

- Los signos y los síntomas incluyen fiebre, escalofríos, malestar general, odinofagia y cefalea.
- Comúnmente se desarrolla una linfadenitis (bubón); los ganglios linfáticos inguinales están afectados en el 90% de los casos.
- La infección puede progresar hasta el shock (peste septicémica) y la neumonía (peste neumónica).

Pruebas de laboratorio

- Los microorganismos gramnegativos ovoides en "imperdible" con tracción bipolar son sugestivos de infección por peste.
- Las pruebas directas de anticuerpos fluorescentes o la detección de antígenos por ensayo inmunosorbente ligado a enzimas son pruebas específicas.
- Las pruebas confirmatorias incluyen el cultivo o un cambio de cuatro veces o mayor en el título de anticuerpos.

Tratamiento recomendado

- Tratamiento primario: estreptomicina; como alternativa, utilizar gentamicina, tetraciclina o cloranfenicol.
- La mortalidad por peste bubónica se reduce mucho con un tratamiento apropiado.
- Es probable que los pacientes con peste neumónica primaria no sobrevivan si no reciben un tratamiento adecuado dentro de las 18 horas del comienzo de los síntomas respiratorios.

Prevención y comunicación

- Educar al público sobre los síntomas de la peste, su modo de transmisión y los métodos de prevención.
- Utilizar repelentes de insectos.
- Edificios a prueba de roedores.
- Evitar manipular roedores o acampar cerca de sus madrigueras.
- Tratar a los perros y gatos con insecticidas en las áreas rurales donde la peste es endémica.
- Comunicar los casos de peste y los animales enfermos o muertos a las autoridades sanitarias.

Tomado de la referencia 100.

seres humanos.³⁷ El biogrupo 1A carece de los determinantes de virulencia de los aislados invasivos y se lo considera no patógeno.⁴⁶ Los biogrupos restantes son de origen humano y pueden ser divididos en el biogrupo 1B, que se encuentra sobre

todo en los Estados Unidos y los biogrupos 2-5, hallados en Europa y en otros sitios. Neubauer y cols. propusieron la división de *Y. enterocolitica* en dos subespecies: *Y. enterocolitica* subespecie *enterocolitica* para el biogrupo B y *Y. enterocolitica* subespecie *palearctica* para las biovariedades europeas.³⁴

Asociación de *Y. enterocolitica* con reacciones por transfusión. *Y. enterocolitica* fue recuperada de una unidad de sangre de donante remitida al Laboratorio de Microbiología del University of Illinois Hospital para cultivo luego de una reacción transfusional. Se presentaron escalofríos y un síndrome similar al shock en el receptor de una unidad de sangre contaminada después de una transfusión de unos 50 mL. También se informaron casos similares en otros sitios, lo que ilustra la capacidad de este microorganismo para crecer con temperaturas frías.^{34,84,92,239,461,465,478} Entre noviembre de 1985 y noviembre de 1996, los CDC comunicaron 21 casos de sepsis por transfusiones de eritrocitos contaminados con *Y. enterocolitica*.⁹² La investigación de estos casos llevó a la conclusión de que la contaminación de la sangre fue el resultado de una bacteriemia asintomática por *Y. enterocolitica* en los donantes de sangre en el momento de la donación. Arduino y cols.¹⁴ demostraron que *Y. enterocolitica*, cuando se inocula en unidades de concentrados de eritrocitos y se almacena a 4 °C puede proliferar y producir endotoxina después de una fase de retraso de 2 a 3 semanas. Está claro a partir de estas comunicaciones que *Y. enterocolitica* debe buscarse siempre que se sospeche una bacteriemia o una endotoxemia asociada con la transfusión. Para más detalles, remitimos al lector al artículo de revisión de Wagner y cols.⁴⁸⁰

Asociación de *Y. enterocolitica* con la preparación casera de menudos de cerdo. En los países donde *Y. enterocolitica* se ha convertido en una causa importante de diarrea; 0:3 es el serotipo predominante, y los cerdos parecen constituir el principal reservorio para la infección.⁴⁷⁰ Una revisión de las cepas clínicas de *Y. enterocolitica* remitidas al laboratorio de referencia para *Yersinia* de los CDC desde 1970 hasta 1980 y desde 1986 hasta 1988 mostró un cambio en el serotipo predominante de *Y. enterocolitica* en los Estados Unidos desde 0:8 hasta 0:3. Este cambio coincide con un brote de gastroenteritis causada por *Y. enterocolitica* serotipo 0:3 en Atlanta desde noviembre de 1988 hasta enero de 1989. El brote involucró a 15 pacientes (todos norteamericanos negros), de los cuales 14 eran lactantes (edad mediana, 3 meses). En todos ellos se desarrolló una enfermedad diarreica febril, que se asoció firmemente con la preparación casera de menudos de cerdo (intestino grueso). Aunque ninguno de los lactantes tuvo contacto directo con los menudos crudos, casi en todos los casos las personas que cuidaban a los niños presentaron antecedentes de haber limpiado esos menudos.²⁸⁰ Se cultivó *Y. enterocolitica* de recipientes cerrados de menudos de cerdo, de los contactos domésticos del caso y de los recipientes de los menudos adquiridos en los supermercados locales. En 10 de las 12 familias expuestas, los menudos fueron preparados para la comida del Día de Acción de Gracias, Navidad o Año Nuevo. Una encuesta realizada a una cadena de almacenes en Atlanta mostró que la venta de menudos de cerdo está limitada en gran parte al período de octubre a enero y alcanza un pico en noviembre. Los datos provenientes de otras encuestas apoyan la asociación entre la preparación de menudos de cerdo durante el período de vacaciones desde el Día de Acción de Gracias hasta Navidad y los casos de *Y. enterocolitica* y sugieren que se justifica el cribado de rutina de *Y. enterocolitica* en algunos hospitales, sobre todo en las comunidades de raza negra, y especialmente en los niños menores de un año.^{4,102,281,320} Hay información sobre

la preparación segura de menudos de cerdo en <http://www.ph.dhr.state.ga.us/epi/news/oct02/103102.shtml>.¹⁰²

Recuperación de *Y. enterocolitica* de muestras clínicas. La mayoría de las cepas de *Y. enterocolitica* crecen en agares entéricos selectivos y se presentan como pequeñas colonias lactosa negativas en agar de MacConkey y agar SS en 48 horas. En algunos laboratorios, las placas de agar de MacConkey inoculadas con muestras de heces de las cuales se sospecha que albergan especies de *Yersinia* son incubadas de rutina a temperatura ambiente. *Y. enterocolitica*, en particular, puede aislarse mejor de las muestras de heces incubadas a 25 °C. El enriquecimiento por frío de las muestras muy contaminadas, como las heces, incubando los cultivos a 4 °C durante una a 3 semanas en solución salina con buffer de fosfato antes de subcultivarlos en medios entéricos, también aumenta la recuperación de *Y. enterocolitica*.³⁷⁴ Weissfeld y Sonnenwirth¹⁰⁰ comunicaron que el pretratamiento de las heces con hidróxido de potasio al 0,5% en una relación 1:2 durante 2 minutos, seguido de la siembra en agar entérico conducía a la recuperación del número máximo de aislados de *Yersinia*. La superioridad del agar cefsulodina-irgasán-novobiocina (CIN) para la recuperación de *Y. enterocolitica* de muestras de heces que contienen 10⁷ unidades formadoras de colonias o menos también ha sido informada por Head y cols.²¹⁵ El uso de métodos de enriquecimiento por frío y medios de cultivo especializados, como agar CIN, para la recuperación de *Yersinia* no suele ser necesario porque, en casos de enterocolitis, los microorganismos no se encuentran con frecuencia en concentraciones relativamente altas. No se recomienda el uso de agar EMB porque *Y. enterocolitica* es sacarosa positiva y aparece como un coliforme en este medio. Puede hallarse un problema similar con el uso de TSI, que también contiene sacarosa.

Identificación de *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* es más bioquímicamente reactiva a temperatura ambiente que a 37 °C. Nuestra experiencia en el University of Illinois Hospital ha sido que los aislados de *Y. enterocolitica* no suelen dar una identificación aceptable cuando son establecidos en el sistema Vitek o el API 20E a una temperatura de incubación de 37 °C. Sin embargo, bandas de API 20E incubadas a temperatura ambiente proporcionan una identificación aceptable. Este dato ha sido confirmado en publicaciones recientes.^{13,46} Neubauer y cols. compararon las pruebas API 20E, API Rapid 32 IDE y de base en PCR y observaron que API 20E proporcionaba la máxima sensibilidad tanto en el nivel de género como de especie.³⁴⁵ Un estudio posterior del mismo grupo observó que la tarjeta Vitek GNI identificaba las yersinias con una exactitud del 96,3% a nivel de género y una exactitud de 57,4% a nivel de especie.²¹⁷ Si bien no se consiguen fácilmente antisueros que se pueden utilizar realmente para cepas de serotipo de *Y. enterocolitica*, Farmer y cols. describieron cuatro pruebas simples que se pueden utilizar para la detección de serotipos patógenos. Estas pruebas son la prueba de la pirasinamidasa, fermentación de salicilina-hidrólisis de esculina, fermentación de D-xilosa y el agar rojo Congo-oxalato de magnesio (CR-MOX) utilizado para determinar la captación de colorante rojo Congo y el crecimiento calciodependiente a 36 °C.¹⁰⁴

Sensibilidad de *Y. enterocolitica* a los antibióticos. *Y. enterocolitica* serogrupos O:3 y O:9 pueden producir dos β -lactamasas mediadas por cromosomas, lo que conduce a resistencia a ampicilina, cefalotina y carbenicilina. Las cepas serotipo O:8 son sensibles a ampicilina y variables a carbenicilina y cefalosporinas. Las pruebas in vitro no son confiables y la administración de cefalosporinas de amplio espectro combinadas con un aminoglucósido parece eficaz para la mayoría de las

infecciones extraintestinales, incluida la septicemia.¹⁰⁹ Las fluoroquinolonas, solas o con aminoglucósidos o las cefalosporinas de amplio espectro, también parecen eficaces.^{179,439} Trimetoprima-sulfametoxazol muestra eficacia in vitro pero tiene poco efecto sobre el curso clínico (duración) de la gastroenteritis por *Y. enterocolitica*.⁴²⁷³

Otras especies de *Yersinia*. *Y. frederiksenii* se aísla más comúnmente de agua dulce, alimentos y suelo no irrigado y fue recuperada pocas veces de muestras humanas. Este microorganismo puede recuperarse de muestras de heces utilizando agares de MacConkey o SS incubados a 25 °C durante 48 horas y pocas veces se necesitan técnicas de enriquecimiento por frío. Se cree que forma parte de la flora comensal y no produce diarrea. Farmer y cols.¹⁰⁵ citan algunas cepas aisladas en humanos, remitidas a los CDC, obtenidas de muestras de heridas y respiratorias.

Y. intermedia también puede recuperarse mediante enriquecimiento por frío de muestras fecales humanas, pero probablemente no está relacionado con enfermedad intestinal. Bottone⁴⁵ revisó la literatura médica hasta 1976 y observó 21 casos de infecciones extraintestinales por estas especies atípicas raras positivas. De estos casos, ocho fueron de conjuntivitis y tres, infecciones de las vías urinarias. Bottone agregó otros tres casos, que representaban infecciones de las vías urinarias, de las conjuntivas y abscesos.

Farmer y cols.¹⁰⁵ citan seis muestras recibidas en los CDC de las cuales se aisló *Y. kristensenii*: cuatro de heces, una de sangre y una de orina. No se ha determinado aún su papel patógeno. Se describieron otras cuatro especies de *Yersinia* todas bioquímicamente similares a *Y. enterocolitica*. Todas son cepas humanas muy raras. *Y. rohdei* fue aislado de heces de perros, agua y heces humanas.³¹ *Y. aldovae* (antes grupo X2 similar a *Y. enterocolitica*) se halló en agua superficial, agua potable y peces.³¹ *Y. mollaretii* (antes *Y. enterocolitica* biogrupo 3A) fue aislado de heces humanas, agua potable, carne y verduras crudas.⁴⁹⁶ *Y. bercovieri* (antes *Y. enterocolitica* biogrupo 3B) fue comunicado en heces humanas, agua, suelo y verduras.⁴⁹⁶

TRIBU ERWINIEAE

Erwinieae son primariamente patógenos de las plantas y sólo saprófitos en los seres humanos. Las especies del género *Erwinia* pueden dividirse en tres grupos filogenéticos. El grupo I representa las erwinias verdaderas y comprende *E. amylovora*, *E. mallotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* y *E. tracheiphila*. Las especies del grupo II han sido transferidas al género *Pectobacterium* como *P. carotovorum* subespecie *atrosepticum*, *P. carotovorum* subespecie *betavascularum*, *P. carotovorum* subespecie *carotovorum*, *P. carotovorum* subespecie *odoriferum*, *P. carotovorum* subespecie *wasabiae*, *P. cacticidum*, *P. chrysanthemi* y *P. cypripedii*. Los miembros del grupo III han sido clasificados en un género nuevo *Brenneria* como *B. alni*, *B. nigrifluens*, *B. paradisiaca*, *B. quercina*, *B. rubrifaciens* y *B. salicis*.²¹³ Las especies de *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Brenneria* producen enfermedades que marchitan y pudren las plantas, los cultivos de alimentos y los árboles o que forman parte de la flora epífita. Existe una comunicación de una infección de las vías urinarias en una mujer de 88 años causada por *Erwinia persicinus*, que había sido aislada antes de distintas frutas y verduras.³⁰² Recientemente, se determinó que una nueva especie fitopatógena aislada de árboles de *Erythrina* enfermos era suficientemente diferente de *Erwinia*, *Brenneria* y *Pectobacterium* como para justificar su ubicación en un género nuevo y ha sido designada *Samsonia erythrinae*.⁴⁶⁶

Otros géneros nuevos de Enterobacteriaceae

El cuadro 6-24 es una lista de las especies descritas más recientemente y menos frecuentes de enterobacterias. Las designaciones de los nuevos géneros y especies han evolucionado de estudios de hibridación del DNA y caracterizaciones bioquímicas realizadas en cepas atípicas remitidas a los CDC y otros laboratorios de referencia para identificación y clasificación. Muchos de los nombres de estos nuevos géneros se aplicaron a cepas bacterianas que, en un momento, fueron designadas a grupos entéricos atípicos en los CDC. Varios grupos entéricos quedan sin nombre pero probablemente logren estado de género en el futuro cuando alcancen una cantidad suficiente de cepas.

CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIACEAE MÁS NUEVAS

Las características claves de identificación de varios de los géneros más nuevos se enumeran en el cuadro 6-25. El aprendizaje de los géneros más nuevos no es demasiado difícil si se recuerda que la mayoría de estas bacterias representan cepas atípicas estrechamente relacionadas con grupos bien establecidos. Por ejemplo, los géneros estrechamente relacionados *Buttiauxella*¹⁷¹ y *Kluyvera*¹⁶⁷ se presentan fenotípicamente como "E. coli citrato positivo"; en el cuadro 6-25 se incluyen las características específicas por las cuales pueden ser diferenciados. Las bacterias pertenecientes a *Cedecea*^{170,206} se asemejan a *Serratia* porque son lipasas positivas y son resistentes a cefalotina y colistina; sin embargo, al contrario de *Serratia*, no hidrolizan la gelatina ni el DNA. *Ewingella*,²⁰⁵ *Rahnella*²²⁷ y *Tatumella*,²²⁵ inicialmente serán agrupadas con *Pantoea agglomerans* porque son lisina negativas, ornitina negativas y arginina descarboxilasa negativas. Los géneros *Yokenella*²¹⁷ y *Obesumbacterium*¹⁶⁷ son similares a *Hafnia alvei*; *Moellerella*²²² puede ser considerado *Providencia* fenilalanina negativo, lactosa positivo y *Leminorella*²²³ puede ser pensado como especies de *Proteus* fenilalanina y ureasa negativas. Mediante el uso de esta orientación, se facilita algo la identificación.

Los patrones de reacción de estos nuevos géneros y especies han sido incorporados en los archivos de códigos numéricos de la mayoría de los sistemas de identificación computarizados. Por lo tanto, sus nombres pueden aparecer en las comunicaciones generadas por ordenador de muchos sistemas comerciales. En estos casos, puede ser necesario controlar visualmente las reacciones individuales para determinar su exactitud y evaluar las características adicionales utilizando el cuadro 6-25 y los cuadros ampliados publicados por los CDC y reproducidos aquí en el cuadro 6-7. En general, una cuidadosa correlación de la actividad bioquímica con los patrones de crecimiento y la aparición de colonias en medios de agar es suficiente para su correcta identificación. No se puede exagerar el hecho de que los estudiantes y los microbiólogos deben mantener una orientación fundamental sobre la morfología, la fisiología y la bioquímica de las bacterias para realizar identificaciones precisas.

IMPORTANCIA CLÍNICA DE ENTEROBACTERIACEAE MÁS NUEVAS

La nueva clasificación, los cambios aparentemente intermitentes en la taxonomía de las bacterias y el agregado frecuente de nuevos géneros y especies podrían ser desalentadores para los estudiantes de microbiología y también para los instructores. Sin embargo, Farmer y cols. llevaron a cabo un estu-

dio de las puntuaciones de los biogrupos no clasificados remitidos para su identificación a los CDC y han ordenado el desorden en un informe primordial que resume todos los géneros viejos y nuevos de enterobacterias conocidos hasta enero de 1985.¹⁶⁶ Como señalan estos investigadores, hasta el 95% de todas las enterobacterias aisladas en laboratorios clínicos son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*; más del 99% de las cepas pertenecen sólo a 23 especies, lo que deja menos del 1% como incidencia de aislamiento de distintas especies recién designadas. Por lo tanto, las bacterias enumeradas en el cuadro 6-24 pocas veces se encuentran en la mayoría de los laboratorios clínicos; sin embargo, como afirmó también el doctor Farmer, existen al menos tres razones de por qué estas nuevas especies de enterobacterias son importantes para los microbiólogos clínicos: 1) algunas especies producen infecciones humanas graves, 2) otras aparecen en muestras clínicas, pero su papel causal en la enfermedad es incierto y 3) muchas son bioquímicamente similares y, por lo tanto, pueden ocasionar problemas en la identificación. La importancia clínica de las especies más nuevas que han sido aisladas en muestras clínicas humanas se resume del siguiente modo.

El género *Buttiauxella* contiene ahora siete especies (véase cuadro 6-24) que se presentan en forma frecuente y abundante en los intestinos de caracoles, babosas y otros moluscos.²²² Algunas cepas han sido aisladas en muestras de suelo y de agua bebible no contaminados, aguas superficiales, aguas cloacales, suelo y heces, pero no han sido aisladas de muestras clínicas estériles primarias.²²² Se informaron dos cepas clínicas de microorganismos similares a *B. gaviniae* de muestras de orina y de una herida en la pierna en Bélgica. Las cepas fueron bioquímicamente indistinguibles de *B. gaviniae*, pero la secuenciación del gen 16S RNA no fue decisiva.¹³⁰

Cedecea ha sido aislado en muestras respiratorias,²² sangre,^{170,204,206} un absceso escrotal,²² una úlcera cutánea²²¹ y tejido pulmonar.¹⁷⁰ Sin embargo, en la mayoría de los casos no se probó un papel etiológico para *Cedecea* en estas infecciones.

Ewingella americana se describió en 1983 y recibió ese nombre en honor del bacteriólogo estadounidense William Ewing.²⁰⁵ Las cepas originales provenían de muestras clínicas humanas, que incluyeron esputo, sangre, faringe, heridas de dedos del pie y pulgares, orina y heces.^{165,205} *E. americana* ha sido implicado en bacteriemia,^{215,261} bacteriemia relacionada con catéteres,³⁰¹ un brote de bacteriemia hospitalaria³⁰² y un brote de pseudobacteriemia asociada con tubos no estériles para la recolección de sangre.³¹¹⁻³¹³ También se asoció con colonización de heridas,³¹ conjuntivitis²¹⁶ y peritonitis en un paciente sometido a diálisis peritoneal.³⁵⁴

El género *Kluyvera* contiene en la actualidad cuatro especies (véase cuadro 6-24).³³³ Las cepas originales de especies de *Kluyvera* provinieron de muestras clínicas y del medioambiente. Las fuentes humanas más frecuentes han sido esputo, seguido por orina, heces, faringe y sangre.¹⁶⁷ Las fuentes ambientales observadas han sido aguas cloacales, suelo, alimentos de cocinas, agua, leche y la piletta de un hospital.¹⁶⁷ Sólo existen algunas comunicaciones de infecciones graves por especies de *Kluyvera* que involucraron las vías urinarias,⁴⁷⁹ la vesícula biliar,⁴⁷⁵ el tubo digestivo^{1,160} y el tejido blando del antebrazo luego de un corte con un cubo de basura.²⁰⁶ Además, se comunicaron casos de bacteriemia relacionada con catéteres³⁰⁷ y mediastinitis y bacteriemia luego de cirugía a corazón abierto.⁴⁴⁸

La importancia clínica de *Leclercia adecarboxylata* es incierta, pero se informaron cepas aisladas en sangre, esputo, orina, heces y heridas de humanos.^{129,292,310,371,423,473} En el

Cuadro 6-24 Nuevos géneros y especies en la familia Enterobacteriaceae

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
<i>Arsenophonus nasoniae</i>	Especie nueva	No aislado en seres humanos. Causa del rasgo asesino solar en la avispa parasitaria, <i>Nasonia vitripennis</i>
<i>Budvicia aquatica</i>	"Grupo HG"	H ₂ S (+). Se encuentra frecuentemente en el agua potable y de superficie. Fue aislado en heces humanas, pero no se asocia con enfermedad humana
<i>Butiauxella agrestis</i>	"Grupo F"	Más cercano desde el punto de vista bioquímico a <i>Kluyvera</i> . Las reacciones claves son IMViC (-,+,-,+), LAO (-,-,+), sacarosa (-). Aislado en agua. No se comunican cepas aisladas en humanos
<i>Butiauxella breunneri</i>	Especie nueva	Aislado en moluscos, agua, suelo y seres humanos
<i>Butiauxella ferruginea</i>	"Grupo F"	Aislado en agua y suelo
	Grupo entérico 63	
<i>Butiauxella gaviniae</i>	"Grupo F"	Aislado en moluscos
	Grupo entérico 64	
<i>Butiauxella izardii</i>	Especie nueva	Aislado en moluscos
<i>Butiauxella moackiae</i>	Grupo entérico 59	Similar a <i>Pantoea agglomerans</i> excepto en que es arginina positivo. Aislado en moluscos, esputo y heridas humanas, y alimentos
<i>Butiauxella warmboldiae</i>	Especie nueva	Aislado en caracoles
<i>Cedecea davisae</i>	"Grupo entérico 15-subgrupo Davis"	<i>Cedecea</i> se asemeja a <i>Serratia</i> porque son lipasa (+) y resistentes a colistina y cefalotina, pero al contrario de <i>Serratia</i> son gelatina y DNasa (-). <i>C. davisae</i> es la especie más frecuente
		El esputo es la fuente más frecuente
<i>Cedecea lapagei</i>		Aislado en muestras del aparato respiratorio humano
<i>Cedecea neteri</i>	"Cedecea especie 4"	Aislado en hemocultivos de pacientes con cardiopatía valvular
	"Especie de <i>Cedecea</i> cepa 002"	Aislado en esputo y sangre cardíaca en la necropsia
<i>Cedecea especie 3</i>	"Especie de <i>Cedecea</i> cepa 001"	
<i>Cedecea especie 5</i>	"Especie de <i>Cedecea</i> cepa 012"	
<i>Cedecea especie 6</i>		Herida de los dedos del pie
<i>Ewingella americana</i>	Grupo entérico 40	IMViC (-,+,-,+), LAO (-,-,-). Las cepas pueden haber sido clasificadas antes como <i>Enterobacter agglomerans</i> pero difieren por ser arabinosa (-). Aislado de esputo, heridas y hemocultivos
<i>Kluyvera ascorbata</i>	Grupo entérico 8	Se asemeja a <i>E. coli</i> excepto en que es malonato, esculina y citrato (+). Pigmento violeta oscuro en medios que no contienen asngre. La fuente más frecuente es el esputo seguido por orina, heces y sangre
<i>Kluyvera cochleae</i>	Especie nueva	Aislado en moluscos
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Grupo entérico 8	Similar a <i>K. ascorbata</i> excepto en que crece y fermenta la glucosa a 5 °C
<i>Kluyvera georgiana</i>	Grupo entérico 8	Aislado en esputo y faringe humana
	Especie de <i>Kluyvera</i> grupo 3	
<i>Lectercia adecarboxylata</i>	Grupo entérico 41	IMViC (+,+,-,-), LAO (-,-,-). Pigmentación amarilla.
	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	Se asemeja a <i>E. coli</i> en agar de MacConkey y EMB
	<i>Enterobacter agglomerans</i> HG XI	Se ha aislado en una variedad de muestras clínicas, alimentos, agua y en el medio ambiente
<i>Leminorella grimonii</i>	Grupo entérico 57	H ₂ S(+), TDA (-), LAO (-,-,-).
		IMViC (-,+,-,+). Aislado en heces y orina humanas
<i>Leminorella richardii</i>	Grupo entérico 57	Igual que <i>L. grimonii</i> excepto por IMViC (-,-,-,-).
<i>Leminorella especie 3</i>	Grupo entérico 57	
<i>Moellerella wisconsinensis</i>	Grupo entérico 46	Se parece a <i>E. coli</i> en un medio entérico
		IMViC (-,+,-,+), LAO (-,-,-), lactosa y sacarosa (+). Aislado originariamente en coprocultivos en Wisconsin
<i>Obesumbacterium proteus</i> biogrupo 2	<i>Flavobacterium proteus</i>	No se han comunicado cepas aisladas en humanos. Contaminante frecuente de las cervecerías. Crece lentamente cuando es incubado a 36 °C, lo que dificulta su identificación

Cuadro 6-24 Nuevos géneros y especies en la familia Enterobacteriaceae (Cont.)

NUEVA DESIGNACIÓN	DESIGNACIÓN PREVIA	COMENTARIOS
<i>Photorhabdus luminescens</i> subespecie <i>luminescens</i> <i>Photorhabdus luminescens</i> subespecie <i>akhurstii</i> <i>Photorhabdus luminescens</i> subespecie <i>laumondii</i> <i>Photorhabdus temperata</i> subespecie <i>temperata</i> <i>Photorhabdus asymbiotica</i>	<i>Xenorhabdus luminescens</i> Nueva subespecie Nueva subespecie Nueva especie y subespecie Nueva subespecie	Bioluminescente y bioquímicamente inactivo. Crecimiento óptimo a 25 °C. Todos los aislamientos humanos pertenecen a <i>P. asymbiotica</i> . Las colonias tienen color amarillo, producen una reacción hemolítica inusual y son negativas para la reducción del nitrato. Se han aislado en heridas y sangre humanas
<i>Plagia fontium</i>		H ₂ S (+), bioquímicamente similar a <i>Badvicia</i> . La mayoría de las cepas provienen de agua potable de Checoslovaquia
<i>Rahnella aquarilis</i> <i>Rahnella</i> especie 2 <i>Rahnella</i> especie 3	Grupo H2	LAO (-,-,-), inmóvil a 36 °C, pero móvil a 25 °C, PAD (débilmente +), sin pigmento amarillo. Puede haber sido identificado como <i>E. agglomerans</i> en el pasado. Se ha aislado en agua, alimentos y distintas fuentes humanas
<i>Tatumella pytyeas</i>	Grupo EF-9	Colonias puntiformes, de crecimiento lento, relativamente inertes. Móviles a 25 °C, pero inmóviles a 35 °C. Los flagelos son polares, laterales o subsolares más que peritricos. Se forman grandes zonas de inhibición alrededor de los discos que contienen penicilina (10 U). PAD muy lenta (débilmente +). Aislado en muestras clínicas humanas particularmente de esputo
<i>Tubulsiella guamensis</i>	Grupo entérico 90	H ₂ S (+) y bioquímicamente similar a <i>Salmonella</i> . IMViC (-,+,-,+), lisina (+), arginina (50%+) ornitina (+). Se ha aislado en el suelo y en heces humanas. Sin pruebas de que produzca diarrea
<i>Xenorhabdus beddingii</i> <i>Xenorhabdus bovienii</i> <i>Xenorhabdus japonicus</i> <i>Xenorhabdus nematophilus</i> <i>Xenorhabdus poinarii</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> subespecie <i>beddingii</i> <i>Xenorhabdus nematophilus</i> subespecie <i>bovienii</i> <i>Achromobacter nematophilus</i> <i>Xenorhabdus nematophilus</i> subespecie <i>poinarii</i>	Se aisló sólo en nematodos
<i>Yokenella regenthorpei</i>	<i>Koserella tubulsi</i> Grupo entérico 45 NIH japonés biogrupo 9 <i>Hafnia</i> atípico <i>Hafnia</i> especie 3	Bioquímicamente similar a <i>Hafnia alvei</i> . Difiere por ser colistina resistente y VP (-). Aislado en sangre, heridas, faringe, esputo, heces y agua
Grupo entérico 58 Grupo entérico 60 Grupo entérico 68 Grupo entérico 137		Se aisló clínicamente en heridas y heces Bioquímicamente inactivo. Recuperado de orina y esputo DNasa (+) pero por otra parte bioquímicamente diferente de <i>Serratia</i> . Se aisló clínicamente en orina Estrechamente relacionado con <i>Citrobacter farmeri</i> y <i>Citrobacter amalematicus</i> . Aislado en esputo, orina y heridas ²²
IMViC: indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato; LAO: lisina, arginina, ornitina; MRH: motilidad, indol, ornitina; PAD: fenilalanina desaminasa; HG: grupo de hibridación; +: > 90% de cepas positivas; -: > 90% de cepas negativas; V: variable.		

University of Illinois Hospital, *L. adecarboxylata* se halló en la endotrquea de un recién nacido y en una muestra cistoscópica de orina de un paciente con insuficiencia renal. En ambos casos, el microorganismo fue aislado junto con otras especies de patógenos; no se pudo establecer un papel etiológico. Se

recuperó *L. adecarboxylata* en cultivo puro de la sangre de un tercer paciente con insuficiencia renal crónica que recibía hemodiálisis.

Leminorella fue aislado de heces y orina.²³³ Blekher y cols.³⁹ revisaron los registros médicos de 14 pacientes de los cuales se

Cuadro 6-16 Diferenciación de los géneros y especies principales dentro de la tribu *Klebsiellae* (cont.)

GÉNERO	CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO	ESPECIES Y CARACTERÍSTICAS DIFERENCIADORAS			
		<i>L. ADECARBOXYLATA</i>	<i>E. COLI</i>	<i>P. AGGLOMERANS</i>	
<i>Leclethia</i> Tanawa y cols. ⁶⁷ (<i>Escherichia adacarboxylata</i> , grupo cutáneo 41)	Indol + MR/VP +/- Citrato - Lisina - Arginina - Ornitina -	- + + +	+ - - -	- - V +	
<i>Lezinovella</i> Hickman-Brenner ²³ (grupo entérico 57)	H ₂ S + Fenilalanina - Manosa - Arabinosa + Xilosa + L/A/O +/-	Rojo de metilo Citrato Dulcitol Fenilalanina Ureasa Arabinosa	- - - - - +	+ -N (15-65) - + + -	
<i>Moellerella</i> Hickman-Brenner ²² (grupo entérico 46)	Indol - MR/VP +/- Citrato + Lisina - Arginina - Ornitina - Fenilalanina - Colistina R	Fenilalanina Lactosa Sacarosa ONPG Tirocina	+ - V (15-50) - +		
<i>Obesumbacterium</i> Pries ⁶⁷	Indol - MR/VP V (15)/- Citrato - Lisina + Ornitina + Motilidad -		<i>O. PROTEUS 2</i> - - -	<i>HAFNIA ALVEI</i> + V (13) +	<i>H. ALVEI 1</i> V (55) V (55) -

(Continúa)

Cuadro 6-16 Diferenciación de los géneros y especies principales dentro de la tribo *Klebsiellae* (cont.)

GÉNERO	CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO	ESPECIES Y CARACTERÍSTICAS DIFERENCIADORAS
		<i>R. AQUATILIS</i> <i>P. AGGLOMERANS</i>
<i>Rahnella</i> Izard y cols. ²³⁷ (Grupo H2 ⁺)	Indol - MR/VP ++ Citrato + Urea - Fenilalanina + débil L/A/O -/- Motilidad - (36 °C)/+ (25 °C)	Motilidad (36 °C) - Fenilalanina + Pigmento amarillo - + + + + +
		<i>R. PTYSEOS</i> <i>P. AGGLOMERANS</i>
<i>Tatumella</i> Hollis ²³⁸ (Biogrupo EF-9)	Indol - MR/VP -/- (+ Coblenz) L/A/O -/- Fenilalanina + débil Sacrosa + Gelatina -	Manitol - Fenilalanina + Motilidad (36 °C) - Penicilina S + + + R
		<i>T. GUAMENSIS</i> <i>SALMONELLA</i> SUBGRUPO 4 <i>SALMONELLA</i> SUBGRUPO 5
<i>Traubsiella</i> McWerther y cols. ²¹⁴ (Grupo entérico 90)	H ₂ S + Indol V (40) MR/VP +/- Citrato + Lisina + Arginina V (50) Omitina + KCN +	Dulcitol - Lactosa - ONPG + Malonato - Crecimiento KCN + Fermentación de inucato + D-sorbitol + - - - - + - + + + V (85) +
		<i>Y. REGENSBURGEI</i> <i>H. ALVEI</i>
<i>Yokenella</i> Kosawa y cols. ²³⁹ (<i>Koserella trabulsii</i>) (Grupo entérico 45)	Indol - MR/VP +/- Citrato + Lisina + Omitina + Celobiosa + Melibiosa +	VP - Citrato + Melibiosa + Resistente a colistina + + + + - -

aislaron especies de *Leminorella* y clasificaron el 43% de los casos como patógenos definitivos, el 29% como patógenos probables y el 21% como patógenos posibles. Los síndromes clínicos fueron infecciones de las vías urinarias (seis pacientes), infección del sitio quirúrgico (tres) y bacteriemia primaria, peritonitis, infección del aparato respiratorio e infección de los tejidos blandos, cada una en un paciente. En un caso de bacteriuria asintomática, la cepa no tuvo importancia clínica.³⁹ Las especies de *Leminorella* se presentan como colonias lactosa negativas sobre medios de siembra primaria y dan un pico de flauta alcalino y una reacción ácida débil con H₂S en el extremo de TSI después de 48 horas. Al igual que las especies de *Proteus*, las especies de *Leminorella* son H₂S positivas, D-manosa negativas y tirosina positivas, pero al contrario de *Proteus*, son urea y fenilalanina negativas y L-arabinosa positivas.

Moellerella wisconsensis fue hallada originariamente en muestras de heces humanas, sobre todo en el estado de Wisconsin.²²² También se aisló de agua y animales y de muestras clínicas distintas de heces, como de vesícula biliar^{153,503} y de un aspirado bronquial.⁴⁹¹ Sin embargo, la mayoría de las cepas han sido aisladas de heces humanas y existen pruebas de que se asocian con diarrea humana.²⁴⁴ En agar de MacConkey, las colonias aparecen rojas brillantes con bilis precipitada a su alrededor; por lo tanto, son indistinguibles de las colonias de *E. coli*.²²² Stock y cols. comunicaron que *M. wisconsensis* es naturalmente sensible a doxiciclina, minociclina, todos los aminoglucósidos, muchos betalactámicos, todas las fluoroquinolonas, los inhibidores de las vías del folato, cloranfenicol y nitrofurantoina.⁴⁶³

Las especies de *Photorhabdus* son las únicas bacterias bioluminiscentes terrestres (la bioluminiscencia bacteriana se observa sobre todo en las especies marinas). La clasificación dentro del género es compleja, se reconocen en la actualidad tres especies: *P. luminescens* (antes, *Xenorhabdus luminescens*), *P. temperata* y *P. asymbiotica*,^{41,174} y varias subespecies (cuadro 6-24). Las especies de *Photorhabdus* habitan el intestino de algunos nematodos patógenos de los insectos, donde establecen una relación simbiótica. Las especies de nematodos de este tipo pueden invadir las larvas de los insectos susceptibles y liberar especies de *Photorhabdus*. Las bacterias proliferan y matan las larvas del insecto.¹⁹⁰ Los nematodos patógenos de los insectos que albergan especies de *Photorhabdus* se utilizan como biopesticidas en algunos países, incluidos los Estados Unidos y Australia. En estos últimos se comunicaron 12 infecciones humanas por especies de *Photorhabdus*, que producen más a menudo infecciones de la piel y los tejidos blandos y pocas veces bacteriemia.^{108,190,342} Las colonias se forman sobre BAP después de 24-48 horas tanto a 35 °C como a temperatura ambiente, con una tendencia a "elevarse".¹⁹⁰ La característica definitoria es la presencia de luminescencia débil, que se puede ver a simple vista en condiciones de oscuridad total. Gerrard y cols. señalaron que es fundamental permitir que los ojos del observador se adapten a la oscuridad durante 10 minutos.¹⁹⁰ En la actualidad, las especies de *Photorhabdus* no aparecen en las bases de datos para MicroScan Rapid ni en paneles para toda la noche o en las tarjetas de Vitek GNI +, lo cual conduce a identificaciones equivocadas cuando se utilizan estos sistemas.¹⁹⁰

El género *Rahnella* consiste en tres especies estrechamente relacionadas: *R. aquatilis* y dos especies genómicas que no pueden ser diferenciadas fenotípicamente de *R. aquatilis* y, por lo tanto, reciben los nombres vernaculares de *Rahnella* especie genómica 2 y *Rahnella* especie genómica 3.³⁵ El hábitat natu-

ral de *Rahnella aquatilis*, como su nombre lo indica, es el agua, y la mayoría de cepas aisladas en la colección original de los CDC fueron encontradas en ese medio, excepto dos en seres humanos (una en una quemadura y la otra en el líquido de lavado bronquial de un paciente con HIV).²¹² De las pocas publicaciones de casos de *R. aquatilis*, la mayoría describe infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Además de las cepas de los CDC, otros han comunicado el aislamiento de este microorganismo en esputo (en un paciente con leucemia linfocítica crónica y enfisema),¹¹⁴ en las vías urinarias (en un paciente con trasplante renal),⁹ en una herida quirúrgica posiblemente debida a una fuente hospitalaria³⁰⁵ y en sangre de pacientes inmunodeprimidos^{66,68,182,199,229} e inmunocompetentes.¹⁰⁶ *R. aquatilis* también fue aislado en verduras (fundamentalmente zanahorias) adquiridas en supermercados²⁰⁹ y ha sido identificado como agente causal de un olor ahumado/fenólico (debido a la formación de guayacol) en leche chocolada refrigerada y echada a perder.²⁵¹

De las cepas originales de *Tatumella pyseos* estudiadas por los CDC, 30 se aislaron en esputo, 6 en cultivos faríngeos, 3 en sangre y 1 de cada una en un aspirado traqueal, un tubo de alimentación, faringe, heces y orina.²²⁵ Se informó de un caso de *T. pyseos* obtenida del hemocultivo de un recién nacido con una presunta sepsis.⁴⁶⁸ Existen tres diferencias notables entre *T. pyseos* y otros miembros de las enterobacterias: 1) las cepas producen una zona grande de inhibición alrededor de la penicilina; 2) tiene una tendencia a morir en algunos medios de laboratorio, como agar sangre, dentro de los 7 días y 3) habitualmente sólo se observa un flagelo (polar, subsolar o lateral) por célula.²²⁵

Trabulsiella guamensis, antes conocida como grupo entérico 90, es H₂S positiva y se asemeja bioquímicamente a *Salmonella* subgrupos 4 y 5.¹¹⁴ Se han aislado cepas en polvo de aspiradora, suelo y heces humanas; sin embargo, no existe ninguna prueba de que produzca diarrea. Su principal interés para el microbiólogo clínico puede ser su posible identificación equivocada como una cepa de *Salmonella* (véase cuadro 6-25).

Yokenella regensburgei fue identificada originariamente como NIH biogrupo 9 por los National Institutes of Health en Japón¹⁷⁷ y más tarde se observó que eran idénticas a "*Koserella trabulsi*" (grupo entérico 45) nombrado así por los trabajadores de los CDC.^{221,275} Como el nombre *Y. regensburgei* tiene prioridad sobre "*K. trabulsi*" en virtud de la publicación anterior, el uso del último nombre se ha suspendido. En las comunicaciones originales, *Y. regensburgei* había sido aislada en el tubo digestivo de insectos y agua de pozo, y en muestras clínicas humanas, que incluyeron heridas de los miembros, vías aéreas superiores, orina, heces y líquido de la rodilla.^{221,277} Más recientemente, Abbott y Janda han comunicado el aislamiento de *Y. regensburgei* de la sangre de un paciente con una bacteriemia transitoria y en una herida de la rodilla de un paciente con diagnóstico de sepsis de rodilla.² El microorganismo se asemeja más estrechamente a *H. alvei*, del cual debe ser diferenciado (véase cuadro 6-25).

Métodos de cribado para la identificación rápida

Escherichia coli, la bacteria aislada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos, a menudo es identificada en forma presuntiva si una colonia seca, oxidasa negativa y fermentadora de lactosa en agar de MacConkey da una reacción de indol positiva (cuando es evaluada en una colonia que crece en medios no inhibidores, como agar sangre), sobre todo si el

microorganismo ha sido aislado en cultivo puro.²⁶ La prueba de indol también se utiliza en muchos laboratorios para una determinación rápida de especies de *Proteus* en movimiento a partir de placas de aislamiento primario.²⁷ Qadri y cols. describieron una prueba de ureasa rápida (2 minutos),⁴⁰⁸ la cual podría utilizarse para separar los posibles patógenos de las heces que requieren otras pruebas bioquímicas del grupo *Proteus-Providencia-Morganella* no patógeno. Taylor y Achanzar informaron el uso de la prueba de catalasa (con H₂O₂ al 3%) como auxiliar en la identificación de enterobacterias.⁴⁷² Estos autores observaron reacciones enérgicas de catalasa con *Serratia*, *Proteus* y *Providencia*; reacciones moderadas con *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y algunas *Escherichia*, y reacciones débiles con *Shigella* y la mayoría de *Escherichia*. Comunicaron el uso de la prueba rápida de catalasa para el cribado de colonias sospechosas en medios entéricos que imitan los patógenos fecales. Las colonias de *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* o *Pseudomonas* son eliminadas con rapidez por las reacciones enérgicas de catalasa, al contrario de las salmonelas, que dan reacciones débiles a moderadas o las shigelas, que son negativas y, por lo tanto, están marcadas para otras investigaciones. Chester y Moskowitz¹¹¹ han comunicado sobre la actividad de catalasa de muchos de los miembros más nuevos de las enterobacterias y recomiendan además el uso de la actividad de catalasa como prueba complementaria rápida. Mulezyk y Szewczuk³³² sugirieron que la prueba para la L-pirrolidonil peptidasa (PYR) tiene gran valor para diferenciar entre las cepas complejas de *Salmonella* y *Citrobacter freundii*. Otros autores también señalaron el valor del uso de la prueba de PYR para separar cepas de *Salmonella* y *E. coli* (ambas negativas para especies de *Citrobacter* (PYR+)).^{108,284} York y cols.³¹² propusieron un algoritmo para la identificación rápida de *E. coli*

sobre la base de pruebas realizadas en el lugar para oxidasa, indol y PYR y la observación de fermentación de lactosa en agar de MacConkey o EMB y la presencia o ausencia de β -hemólisis en BAP (fig. 6-8). Su algoritmo permitió la identificación de la mayoría de las cepas de *E. coli* sospechosas con una exactitud mayor del 99% y una reducción del 75% en el costo de los reactivos y el tiempo de los técnicos, así como una disminución en el tiempo hasta la comunicación. Sin duda, cualquiera de estos enfoques tiene validez en una era de restricción de costos y ante el deseo de recibir enseguida los resultados de las pruebas.

Equipos comerciales para pruebas de cribado

Varias compañías han comercializado equipos de detección para la identificación de *E. coli*: E.COLI SCREEN, MUG Disk y BactiCard *E. coli* (Remel, Lenexa, KS); Lyfo-Kwik OMI (MicroBioLogics, St. Cloud, MN) y ColiScreen (Hardy Diagnostic, Santa Maria CA). Estos sistemas de prueba se basan en el hallazgo de que la mayoría de las cepas de *E. coli* son rápidamente indol positivas, ONG positivas y MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronida) positiva.^{147,285} La hidrólisis de MUG libera 4-metilumbeliferona, que es altamente fluorescente cuando se visualiza bajo luz UV de onda larga. Un uso interesante de la prueba MUG es evaluar los aislados de *E. coli* para la detección de cepas serotipo O157:H7, que son las cepas similares a Shiga que producen toxina asociadas con colitis hemorrágica. Este serotipo específico es tanto sorbitol negativo como MUG negativo.

También se cuenta con el sistema RapID SS/u (Remel), que consiste en un grupo de 12 pruebas cromogénicas de sustrato único seleccionadas para identificar rápidamente las bacterias

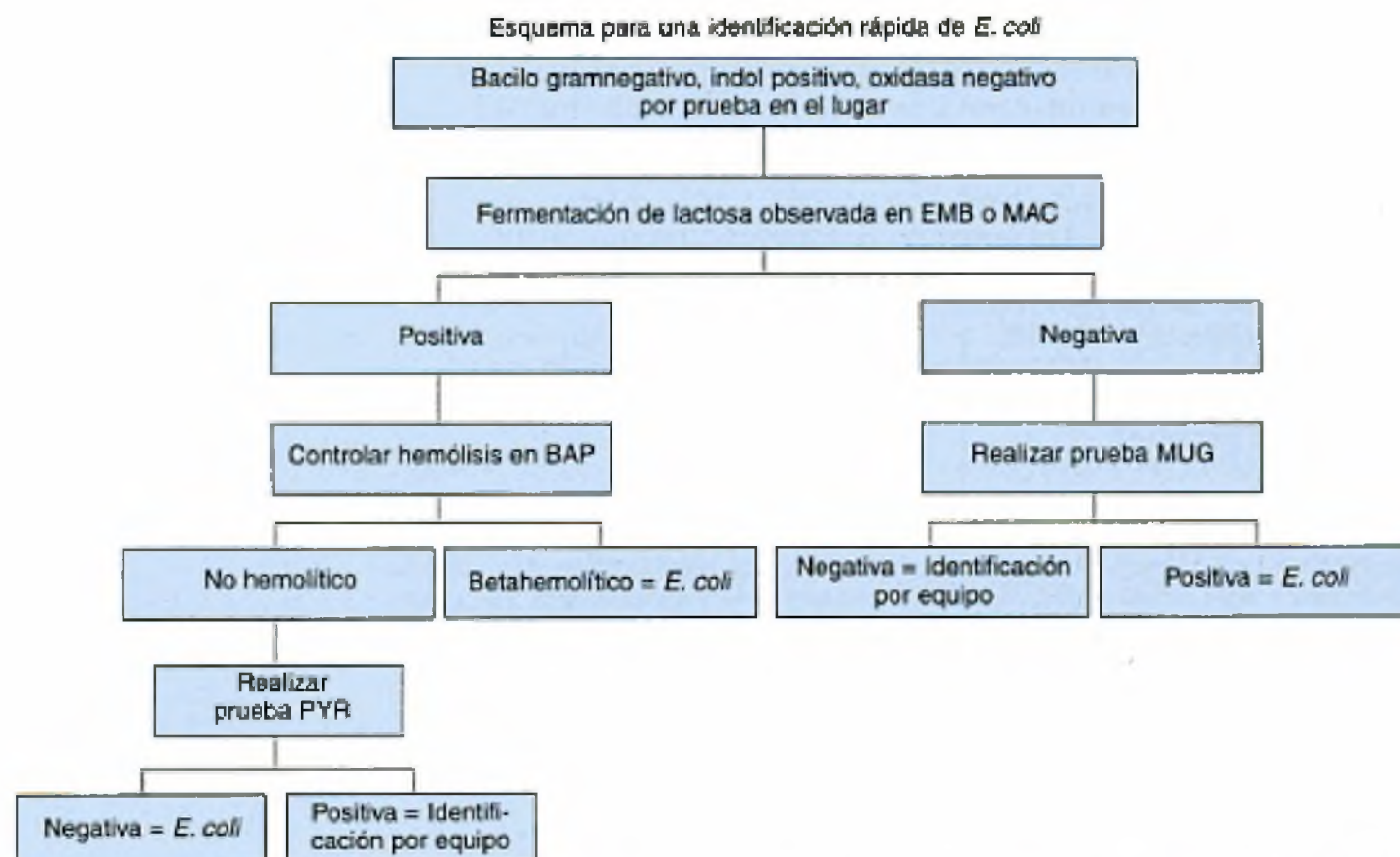


Figura 6-8 Esquema de identificación para la separación de *E. coli* de otros bacilos indol positivos, oxidasa negativos. BAP: placa de agar sangre; EMB: eosina-azul de metileno; MAC: agar de MacConkey; MUG: 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronida; PYR: L-pirrolidonil- β -naftilamida; ID: identificación. (Modificado de York MK et al. J Clin Microbiol 2000;38:3394-3398).³¹²

halladas con mayor frecuencia en las infecciones del tracto urinario (*E. coli*, especies de *Proteus*, especies de *Klebsiella*, especies de *Serratia*, especies de *Enterobacter*, especies de *Pseudomonas*, estafilococos coagulasa negativos, enterococos y otros). Las respuestas están disponibles entre 30 minutos y 2 horas, según el sistema utilizado y la actividad bioquímica de la cepa por evaluar. Otro sistema denominado OMP y NGP Wee-Tabs (KEY Scientific Products, Round Rock, TX) consiste en dos tabletas de sustrato que en conjunto proporcionan ocho pruebas enzimáticas las cuales, combinadas con ureasa, identifican cerca del 95% de las enterobacterias. Las tabletas son rehidratadas en una suspensión bacteriana y los resultados están disponibles en 2 a 4 horas. Hardy Diagnostics (Santa Maria, CA) ofrece EnteroScreen4, un sistema único de detección en tubo para el cribado de especies de *Salmonella* y *Shigella* en heces. Este sistema detecta lisina desaminasa, lisina descarboxilasa, H_2S y urea en una configuración en un tubo de una sola inoculación.

Medios de agar cromogénicos

El agar cromogénico contiene sustancias artificiales (cromógenos) que cuando son hidrolizadas por enzimas microbianas específicas producen compuestos coloreados (fig. 6-6). En las láminas en color 6-5E a H se ilustra el aspecto de distintos tipos de colonias. Kilian y Bülow fueron los primeros en utilizar medio cromogénico selectivo para la identificación directa de *E. coli* en cultivo primario de orina.²⁶⁶ En la actualidad, se comercializan varios medios cromogénicos que permiten la identificación directa de *E. coli*, *P. mirabilis* y especies de *Enterococcus*: CPS ID2 (bioMérieux, Hazelwood, MO),^{17,71,110,217,309,347a,419,438,504a} CHROMagar Orientation (BD Diagnostics, Sparks, MD; Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA),^{17,71,139,217,231,317,366,434,438} Rainbow UTI (Biolog, Hayward, CA)^{417,441} y Chromogenic UTI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).^{17,71,110} En las evaluaciones de las múltiples fórmulas de estos medios, las tasas de detección y las tasas de identificación son muy similares.^{17,71,110} En un estudio el uso de agar cromogénico permitió una reducción > 50% en el tiempo de inoculación y una reducción > 20% en el tiempo de investigación.¹³⁹ Para extender la identificación a otras especies, se pueden combinar las características de las colonias en agar cromogénico con pruebas confirmatorias de uso fácil en el lugar que pueden ser realizadas en segundos en tiras de papel o directamente en el medio de agar.³⁶⁶ Sin embargo, una advertencia es que los inóculos tomados de placas de agar cromogénico pueden no ser apropiados para las pruebas de sensibilidad con ciertos sistemas de examen automáticos. Reisner y Austin mostraron que las pruebas de sensibilidad directamente del medio CPS ID2 condujo a bajas tasas de error para todos los antibióticos evaluados utilizando el sistema Vitek Legacy (bioMérieux, Hazelwood, MO).⁴¹⁹ Los laboratorios que utilizan medios cromogénicos deben controlar con el fabricante de instrumentos para determinar la compatibilidad del uso de inóculos del agar cromogénico para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en el sistema que se utiliza en su laboratorio.

Sistemas de identificación clásicos

Los sistemas para la identificación y la denominación de los microorganismos son computarizados o manuales. Antes de explicar la derivación y las aplicaciones de los sistemas de codi-

ficación numérica, revisamos dos esquemas manuales de identificación bacteriana que se siguen utilizando: 1) la matriz de cuadrículas o en tablero de damas y 2) los diagramas de flujo ramificados o dicotómicos.

Matriz en tablero de damas

El cuadro 6-7 es un cuadro de identificación amplio formulado por Farmer y cols. utilizado en los CDC para identificar todas las especies con nombre, los biogrupos y los grupos entéricos sin nombre de las enterobacterias. Este cuadro es un ejemplo clásico de la matriz en tablero de damas y demuestra sus ventajas y desventajas. La matriz es grande y tiene 48 características bioquímicas para 30 géneros, 129 especies, biogrupos y grupos entéricos sin nombre. Los números en los cuadrados que se intersecan representan el porcentaje de cepas que son positivas o reactivas contra las distintas pruebas bioquímicas (enumeradas en las columnas verticales). En general, una reacción se considera positiva si el 90% o más de las cepas son reactivas, negativas si el 10% o menos de las cepas no producen un resultado y variable si el 11-89% de las reacciones son positivas. La capacidad para determinar tanto las reacciones positivas como negativas para las distintas características a medir en este tipo de sistema de identificación conduce a un alto grado de exactitud diagnóstica. La principal desventaja de la matriz en tablero de damas es el tedio que involucra el apareamiento punto a punto de las distintas reacciones contra los derivados de los medios de prueba y la construcción de patrones que se aparean mejor con un género, una especie o un biogrupo específico.

Diagramas de flujo

Los diagramas de flujo fueron ideados para reducir el tedio de leer matrices en tablero de damas y facilitar la probable identificación bacteriana rastreando una serie de puntos de ramificación positivos y negativos en un algoritmo dicotómico (figs. 6-8 y 6-9). Con el advenimiento de los instrumentos automáticos y de los sistemas de identificación empaquetados que se basan en análisis computarizados de las distintas reacciones de las características por medir, ahora los diagramas de flujo se utilizan menos en los laboratorios clínicos. Un problema con el diagrama de flujo ha sido la posible imprecisión si la reacción en un punto de ramificación dado es aberrante (atípica para la especie), mal interpretada o el resultado de las reacciones de un cultivo mixto. Muchos diagramas de flujo se construyen para repetir los nombres de algunas especies en varias uniones para adaptarse a las reacciones que pueden ser menos del 100% o que se encuentran en una categoría variable (fig. 6-9). Sin embargo, esta protección construida no siempre se aplica a las reacciones que son mal interpretadas, mediante un sistema de detección de un instrumento automático o mediante el ojo humano.

En muchos laboratorios de microbiología se está utilizando una modificación de este enfoque para el cribado preliminar de las especies bacterianas halladas comúnmente que se asocian con síndromes de enfermedades infecciosas específicas. York y cols.⁵¹² presentaron un esquema simple para la identificación rápida de *E. coli* en agar EMB o agar de MacConkey (fig. 6-8). Para validar este esquema, cinco laboratorios recogieron secuencialmente 1 064 cepas frescas y clínicamente importantes con criterios centrales de microorganismos indol positivos, oxidasa negativos que no se propagaban en BAP. De las 1 064 cepas evaluadas, 1 000 fueron *E. coli* y 64, no *E. coli*. Utili-

Cuadro 6-26 Conversión binaria de las reacciones de un microorganismo desconocido en una banda de API 20-E

CARACTERÍSTICA	REACCIÓN	CONVERSIÓN BINARIA
ONPG	+	1
Arginina	-	0
Lisina	+	1
Omitina	-	0
Citrato	+	1
Sulfuro de hidrógeno	-	0
Ureasa	-	0
Triptófano desaminasa	-	0
Indol	-	0
Voges-Proskauer	+	1
Gelatina	+	1
Glucosa	+	1
Manitol	+	1
Inositol	+	1
Sorbitol	+	1
Ramnosa	-	0
Sacarosa	+	1
Melibiosa	+	1
Arnaldina	+	1
Arabinosa	-	0
Oxidasa	-	0

base de datos apropiada, por la cual el programa compara el perfil desconocido con el de cualquier taxón en la base de datos. Para alcanzar un veredicto de identificación, BioBASE calcula las puntuaciones de identificación, las puntuaciones modales y los índices de similitud de cada taxón y los compara con los datos de ingreso del desconocido. Luego se analizan los microorganismos de puntuaciones más altas y se ponderan para tomar una decisión sobre la identificación, que varían desde inaceptables hasta excelentes. Miller y Alachi evaluaron este programa, informan que es bueno para el usuario, rápido y preciso, y afirman que tendría valor para todo laboratorio que utilice sustancias bioquímicas convencionales.¹²⁴

Sistemas de codificación numérica

La identificación de las enterobacterias y muchas otras familias y grupos de bacterias ha sido facilitada por el uso de sistemas de identificación automáticos y en paquetes, que la realiza mediante códigos numéricos computarizados. Un código numérico es un sistema por el cual las distintas características de identificación de las bacterias son traducidas en una secuencia de números que representan una o más especies bacterianas. El hecho de que la identificación de los microorganismos se base sobre una serie de reacciones bioquímicas positivas y negativas facilita la programación computarizada porque la lógica de los ordenadores también se construye sobre una secuencia de entradas positivas y negativas, utilizando un sistema numérico binario. En la lógica binaria existen sólo dos números: "0" (inactividad) y "1" (actividad). Como se puede conjeturar rápidamente, las características de identificación de los microorganismos pueden ser traducidas con facilidad en números binarios asignando un "1" a todas las reacciones positivas y un "0" a todas las reacciones negativas. Este enfoque

puede ilustrarse utilizando la secuencia de características en la banda API 20E (bioMérieux) como punto de referencia y conversión de las reacciones positivas y negativas en números binarios (cuadro 6-26). Si se leen los números binarios que se muestran en el cuadro 6-26 de arriba hacia abajo y se reorganizan horizontalmente, se obtiene el siguiente número binario de 21 dígitos:

101010000111111011100

Aunque los ordenadores están contruidos para recibir 1/0 bits de datos a partir de los cuales calcular resultados significativos, la mente humana no puede manipular con eficiencia la lógica binaria; por lo tanto, los códigos binarios deben ser convertidos en sistemas matemáticos más simples para poderlos utilizar. La conversión del sistema de dos dígitos (binario) en un sistema de ocho dígitos (octal) sirve a este propósito. Para comprender la conversión de los números binarios en octales, visualice una serie de tres bombillas de luz. Al encender o apagar diferentes luces, es posible lograr un total de ocho combinaciones, cada una de las cuales puede ser representada por uno de ocho números que varían del 0 al 7. Si se apagan todas las luces (-), la combinación - - - es equivalente al octal 0. Si sólo se enciende (+) el bulbo de la izquierda, la combinación + - - es equivalente al octal 1. El octal 2 está representado por el patrón binario - + - y el octal 3 por el patrón + + -. En el cuadro 6-27 se muestran los equivalentes en octales de las ocho combinaciones de un número binario de tres dígitos.

Para ilustrar cómo se pueden convertir los números binarios mayores de tres dígitos en sus equivalentes de octales, utilice el número binario que obtuvo de las reacciones de API 20E:

101010000111111011100

Dividida de derecha a izquierda (los números binarios se leen de ese modo) en subgrupos de tres:

101 010 000 111 111 011 100

Ahora convierta cada subgrupo de tres dígitos en su equivalente en octales utilizando la fórmula del cuadro 6-27.

101 010 000 111 111 011 100

5 2 0 7 7 6 1

Es mucho más fácil recordar el número 5207761 y más sencillo su ingreso en el ordenador que el número binario 101010000111111011100.

Cuadro 6-27 Conversión oral del código binario

BINARIO	FÓRMULA DE CONVERSIÓN	OCTAL
- - -	0 + 0 + 0 =	0
+ - -	1 + 0 + 0 =	1
- + -	0 + 2 + 0 =	2
+ + -	1 + 2 + 0 =	3
- - +	0 + 0 + 4 =	4
+ - +	1 + 0 + 4 =	5
- + +	0 + 2 + 4 =	6
+ + +	1 + 2 + 4 =	7

Una forma más sencilla para recordar cómo convertir cada triplete binario en su equivalente en octal correspondiente es asignar los siguientes valores (nuevamente la lectura de derecha a izquierda): un valor de 4 a una reacción positiva para la primera prueba en cada triplete, un valor de 2 a una reacción positiva para la segunda prueba en cada triplete, un valor de 1 a una reacción positiva para la tercera prueba en cada triplete y un valor de 0 a cualquier reacción negativa (véase cuadro 6-27).

Estos derivados de octales se conocen como **números biotípicos**, es decir, un representante numérico de una serie de características fenotípicas expresadas por una especie bacteriana particular y exclusivas de ella. Es importante que todos los que utilizan los números biotípicos, sobre todo quienes enseñan a los estudiantes, comprendan que cada número en el sistema de octales representa tres características bioquímicas y que el propio número representa un patrón de reacciones positivas y negativas. Existe el gran peligro de que los microbiólogos modernos consideren los números biotípicos como cifras mágicas que pueden leerse de gráficos o colocarse en ordenadores para obtener una identificación automática de microorganismos, lo que hace perder de vista no sólo las reacciones bioquímicas que representan, sino también los principios bioquímicos sobre los cuales se basa la disciplina de la microbiología.

Lectura de los códigos de octales en registradores de códigos numéricos

Todos los fabricantes que comercializan equipos de identificación publican registradores de códigos numéricos en los cuales se comparan cientos de números biotípicos con una o más especies bacterianas que son singulares para ese número. Por ejemplo, para el número biotípico 5207761, derivado del conjunto de reacciones API 20E utilizadas en el ejemplo anterior, se enumeran las siguientes especies en el Índice de perfiles del API 20E: *Serratia marcescens*: identificación aceptable; *S. marcescens*, 1/243 y *S. rubidaea*, 1/2.859.

El mensaje en el Índice de Perfil de API para el número biotípico 5207761 para *S. marcescens* "Identificación aceptable" indica que se puede comunicar *S. marcescens*. Esta evaluación se basa sobre un cálculo computarizado de la probabilidad porcentual de que *S. marcescens* sea la identificación correcta comparada con todos los otros microorganismos ingresados en la base de datos.

Frecuencia de aparición estimada

Las cifras de frecuencia enumeradas con cada nombre de una especie individual (en el ejemplo anterior, 1/243 para *S. marcescens*) indican la cantidad de cepas seleccionadas en forma aleatoria que tendrían un número biotípico similar a la cepa por estudiar. En otras palabras, si se evalúan aleatoriamente 243 *S. marcescens*, existe una posibilidad de 1 en 243 de que se encuentre este patrón bioquímico exacto. Mientras que si se evalúan 2.859 *S. rubidaea* seleccionadas al azar, existe una posibilidad de 1 en 2.859 de encontrar una cepa de este biotipo exacto. Esta cifra no indica directamente la probabilidad porcentual de que una de estas especies sea la correcta, de modo que el usuario no puede determinar a partir de este estadístico el grado de viabilidad de una de las elecciones.

Cálculo de probabilidad

La identificación de un microorganismo desconocido con un número biotípico dado se basa sobre el cálculo de la probabili-

dad porcentual entre el número biotípico desconocido y cada taxón almacenado en la memoria del ordenador. Los registradores de códigos que enumeran cifras porcentuales de probabilidad son más útiles para tomar decisiones cotidianas en el laboratorio. Se puede comunicar cualquier identificación con una probabilidad del 90% o mayor, las que están cerca del 90% pueden ser identificadas fácilmente con una o dos pruebas adicionales y es probable que aquellas con porcentajes de probabilidad muy bajos se descarten. El uso de mensajes como "identificación excelente", "identificación aceptable" y "identificación muy buena" en el sistema API implica que existe una probabilidad porcentual del 90% o mayor. Sin embargo, cuando el mensaje describe una identificación como "cuestionable" o "dudosa" y no se da la probabilidad porcentual, el usuario no puede hacer ninguna evaluación referente a la probabilidad de que un desconocido represente cierta especie. Para los estudiantes y los microbiólogos que están intentando comprender este concepto por primera vez, en el cuadro 6-28 se ilustra un ejemplo que ayuda a calcular la probabilidad porcentual y la frecuencia de aparición.

Resolución de las discrepancias

Debemos señalar que todas las respuestas derivadas de los sistemas de identificación computarizados, ya sea que representen o no el 90% o más de confianza, deben interpretarse junto con otra información disponible sobre el microorganismo desconocido —la morfología de las colonias, las reacciones en distintos medios de aislamiento, la morfología celular en la tinción de Gram, los resultados de las reacciones bioquímicas presuntivas, los patrones de sensibilidad a los antibióticos y el contexto clínico.

Cuando ocurren discrepancias, puede ser necesario visualizar los tubos, las cámaras de reacción o las microcúpulas donde han ocurrido las reacciones. En muchos casos, la interpretación visual de ciertas reacciones puede diferir de la detectada por los instrumentos. Cuando es recalculado, el nuevo número biotípico puede indicar una identificación bacteriana alternativa que es mucho más acorde con las observaciones preliminares y complementarias.

Además, cualquier especie dada puede tener varios números biotípicos porque una o más reacciones individuales pueden ser variables. En consecuencia, designar a las especies bacterianas por el número biotípico puede tener valor epidemiológico para reconocer la aparición de grupos de aislados similares en un contexto de práctica dado. Por ejemplo, la recuperación de muchos *E. coli* de un medioambiente determinado o de una serie de cultivos puede tener un valor limitado; sin embargo, saber que todos los microorganismos tienen el mismo número biotípico puede ser invaluable. Así, es posible rastrear a los agentes que producen brotes hospitalarios o epidemias comunitarias hasta una fuente común. El análisis de los biotipos también puede conducir a un mejor conocimiento de la relación entre la virulencia de las variantes bacterianas y la presencia o ausencia de ciertas características bioquímicas.

Sistemas de identificación en equipos comerciales de determinaciones múltiples

El concepto de combinar una serie de medios o sustratos diferenciales en un solo sistema, seleccionado para ayudar a identificar miembros de un grupo de bacterias, es un desarrollo lógico. De hecho, la disponibilidad de sistemas de identifica-

Cuadro 8-28 Cálculo de la frecuencia de aparición y la probabilidad porcentual

La identificación de un perfil desconocido se basa sobre el cálculo de probabilidad entre el perfil desconocido y cada especie de microorganismo almacenado en la memoria del ordenador. Para evaluar su conocimiento de la frecuencia de aparición y la probabilidad porcentual, resuelva el siguiente ejemplo. Para facilitar la explicación de los cálculos, este ejemplo se basa sólo sobre cuatro pruebas bioquímicas y tres especies.

Paso 1. Un microorganismo desconocido da el siguiente perfil:

	IND	MR	VP	CIT
Desconocido	+	-	+	-

Paso 2. Reacciones bioquímicas desconocidas de tres especies de *Enterobacteriaceae* para las cuatro pruebas (se muestran como porcentaje de las reacciones positivas).

	IND	MR	VP	CIT
<i>Serratia marcescens</i>	1	20	98	98
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	70	50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95

Paso 3. Frecuencias de aparición de reacciones observadas (+ - + -) para cada especie.

Observación: cuando el resultado de una prueba del desconocido es positivo (IND y VP en este ejemplo), la probabilidad de la reacción positiva de la prueba enumerada en la base de datos se utiliza para el cálculo. Cuando el resultado de la prueba del desconocido es negativa (MR y CIT), la probabilidad de la reacción negativa es 1 menos la probabilidad de reacciones positivas.

	IND	MR	VP	CIT
<i>Serratia marcescens</i>	0,01	0,80	0,98	0,02
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,20	0,50	0,70	0,50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,99	0,80	0,95	0,05

Paso 4. Cálculo de frecuencias de aparición del perfil observado (+ - + -) para cada especie. La frecuencia de aparición se calcula multiplicando juntas todas las frecuencias de aparición de las reacciones.

<i>Serratia marcescens</i>	$= 0,1 \times 0,80 \times 0,98 \times 0,02 =$	0,0001568
<i>Enterobacter agglomerans</i>	$= 0,20 \times 0,50 \times 0,70 \times 0,50 =$	0,0350000
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$= 0,99 \times 0,80 \times 0,95 \times 0,05 =$	0,0376200
		0,0727768

Paso 5. Porcentajes de identificación. Cada frecuencia se divide por la suma de todas las frecuencias, luego se multiplica por 100 para dar el porcentaje de identificación. La suma de los porcentajes de identificación es igual a 100.

<i>Serratia marcescens</i>	$\%ID = (0,001568/0,0727768) \times 100 =$	0,21%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	$\%ID = (0,0350000/0,0727768) \times 100 =$	48,1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$\%ID = (0,0376200/0,0727768) \times 100 =$	51,7%

Paso 6. Orden de probabilidad

1. <i>Klebsiella oxytoca</i>	$\%ID = 51,7$
2. <i>Enterobacter agglomerans</i>	$\%ID = 48,1$
3. <i>Serratia marcescens</i>	$\%ID = 0,21$

¿Cuál es la probabilidad de que *Klebsiella oxytoca* sea la respuesta correcta entre las tres especies en la base de datos?

(Respuesta: del paso 5, la respuesta es 51,7%; sin embargo, existe una probabilidad del 48,1% de que el microorganismo desconocido sea *Enterobacter agglomerans*; por lo tanto, se deben establecer pruebas adicionales para identificarlo correctamente).

¿Con qué frecuencia *Klebsiella oxytoca* da este perfil particular de reacciones?

(Respuesta: del paso 4, el 3,8% de las veces; en otras palabras, no muy a menudo).

ción comerciales evolucionó naturalmente, casi como una necesidad práctica. Los microorganismos de los que se sabe que producen enfermedades infecciosas no sólo son muchos, sino que a menudo tienen también requerimientos nutricionales especiales y necesitan numerosas pruebas bioquímicas para su identificación. Mantener la diversidad de los medios convencionales requeridos está más allá de la capacidad de mu-

chos laboratorios. La construcción compacta (que requiere poco espacio de almacenamiento), las reacciones químicas fácilmente visibles, un tiempo de conservación prolongado y un control de calidad estandarizado provisto por los fabricantes de estos equipos hacen muy conveniente su uso en los laboratorios de microbiología. Son especialmente útiles en los laboratorios de bajo volumen, donde es posible que no cuenten con

el tiempo ni con la experiencia técnica como para hacer muchas de estas identificaciones y donde es más difícil mantener el control de calidad.

Aspectos generales de los sistemas comerciales disponibles

Actualmente se ha vuelto casi una práctica estándar de muchos laboratorios clínicos utilizar uno o más sistemas comerciales de determinaciones múltiples disponibles para la identificación de ciertos grupos de microorganismos. Numerosas pruebas en laboratorios diagnósticos y de investigación han demostrado una concordancia del 95% o mayor entre la mayoría de estos sistemas de identificación y los métodos convencionales para la identificación de microorganismos. Por lo tanto, estos sistemas tuvieron una amplia aceptación en los laboratorios clínicos por las siguientes razones.

1. Su precisión ha probado ser comparable con la de los sistemas de identificación convencionales. Smith y cols. realizaron evaluaciones de varios sistemas en los CDC.⁴⁵² En todas las evaluaciones, se utilizaron dos criterios para medir el rendimiento de un producto: 1) una comparación de cada prueba en el producto con su análoga convencional y 2) la exactitud de la identificación que se hizo utilizando el producto.
2. Varios de los sistemas tienen un tiempo de conservación prolongado —6 meses a 1 año— de modo que se reduce la caducidad de los medios.
3. Los sistemas requieren sólo un mínimo de espacio para su almacenamiento e incubación.
4. Algunos de los sistemas son fáciles de utilizar o más fáciles que los métodos convencionales. La inoculación es simple, las reacciones son casi siempre claras dentro de las 24 horas y la disponibilidad de los registradores de archivos computarizados torna fácil y precisa la identificación.

Optar por uno de los sistemas de identificación de determinaciones múltiples es en gran parte una cuestión de preferencia personal. La facilidad de la inoculación, la capacidad para seleccionar sólo las características por medir, la manipulación requerida para agregar reactivos después de la incubación y la disponibilidad de gráficos de interpretación o de bases de datos computarizadas son los elementos principales que deben considerar los posibles usuarios antes de seleccionar un sistema. Si se presta una atención estricta a las instrucciones provistas por el fabricante, se puede alcanzar el mismo grado de precisión y confiabilidad de rendimiento, sólo con diferencias menores en la sensibilidad de las pruebas individuales.

Sistemas de identificación específicos

API 20E

El sistema de identificación API (bioMérieux) se ha convertido en el método de referencia con el cual se compara la precisión de los otros sistemas. Las 21 características que se pueden determinar con él lo convierten en uno de los conjuntos de pruebas más grandes de los equipos de determinaciones múltiples. El sistema identifica un alto porcentaje de especies bacterianas dentro de las 24 horas, sin necesidad de determinar otras características fisiológicas (lámina en color 6-6A). Este sistema se encuentra entre los más utilizados en los laboratorios clínicos y tiene una base de datos grande que incluye cepas comunes y atípicas. El Índice de Perfil API, que puede utilizarse en forma manual o con ayuda computarizada, proporciona la probabilidad en frecuencia de varias cepas que debe considerarse

para cada número biotípico. Por lo tanto, se aumenta al máximo la precisión de la identificación de los miembros de las enterobacterias. Castillo y Bruckner observaron que el sistema API 20E identificó correctamente el 97,7% de 339 aislados clínicos y de stock.⁷⁶ El sistema es algo difícil de inocular; no obstante, es un problema que se supera rápidamente con la práctica. Después de la inoculación, las bandas deben manejarse con cuidado para que no se derramen las suspensiones bacterianas y contaminen el ambiente circundante. Se requiere práctica para interpretar las reacciones limítrofes convencionales, que pueden afectar el número biotípico y la identificación final. En ocasiones, es posible que los números biotípicos no aparezcan en el registro de perfiles; sin embargo, el fabricante mantiene un número telefónico para consulta. El diseño del sistema, los procedimientos operativos, los sustratos incluidos y los estudios de evaluación se muestran en el cuadro 6-29 (lámina en color 6-6A).

SISTEMA ID BBL CRYSTAL ENTERIC/NONFERMENTER

El sistema de identificación BBL Crystal E/NF (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) es un método de identificación miniaturizado que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos modificados. Está destinado a la identificación de bacterias gramnegativas aerobias clínicamente importantes que pertenecen a la familia de las enterobacterias y algunos de los bacilos gramnegativos fermentadores de la glucosa y no fermentadores de origen humano aislados con mayor frecuencia. El equipo E/NF comprende: 1) las tapas BBL Crystal E/NF, 2) bases BBL Crystal y 3) tubos de líquido para inóculo BBL Crystal Enteric/Stool (véase lámina en color 6-6B). La tapa BBL Crystal contiene 30 sustratos deshidratados sobre los extremos de puntas de plástico. La base BBL Crystal tiene 30 celdas para reacción. El inóculo de prueba está preparado con el líquido de inóculo BBL Crystal Enteric/Stool ID y se utiliza para llenar las 30 celdas en la base BBL Crystal. Cuando se alinea la tapa con la base y se produce un resalto por la ubicación correcta, el inóculo de prueba rehidrata los sustratos desecados e inicia las reacciones de las pruebas. Las pruebas utilizadas en el sistema Crystal incluyen fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de distintos sustratos, que comprenden sustratos ligados a cromógenos.

Luego de la inoculación, los paneles se incuban de arriba hacia abajo en una estufa de incubación sin CO₂ con una humedad del 40-60% durante 18 a 20 horas a 35 a 37 °C. Después de la incubación, los paneles se leen de arriba hacia abajo utilizando la caja de luz BBL Crystal. Se examinan las celdas para observar cambios de color y se genera un número de perfil de 10 dígitos. El número de perfil y los resultados de la prueba fuera de línea para indol y oxidasa se ingresan en un ordenador en el que se ha instalado el libro de códigos electrónicos para el sistema ID BBL Crystal para obtener la identificación.

En un estudio externo que comprendió tres laboratorios clínicos, la reproducibilidad de los 30 sustratos individuales de E/NF varió del 96,3% al 100%. El rendimiento del E/NF fue evaluado tanto en cepas de muestras clínicas frescas como en comprobaciones con cepas de prueba. De los 299 aislados frescos evaluados por los métodos de identificación actuales de los laboratorios, el sistema ID BBL Crystal comunicó correctamente el 96,7%, incluidos 16 casos en los cuales se comunicaron dos o tres microorganismos y para resolverlo se requirieron pruebas complementarias. De 291 cepas de prueba previamente identificadas confirmadas mediante los métodos de identificación actuales de los laboratorios, el sistema ID BBL Crystal

Cuadro 6-29 Construcción, uso y evaluación del sistema de identificación API 20E

DISEÑO FUNCIONAL	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	SUSTRATOS INCLUIDOS	ESTUDIOS DE EVALUACIÓN
El sistema consiste en una banda de plástico con 20 cúpulas miniaturizadas que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación de plástico con una tapa que se cierra herméticamente (véase lámina en color 6-6A). Cada cúpula tiene un agujero pequeño en la parte superior a través del cual se puede inocular la suspensión bacteriana con una pipeta. La acción bacteriana sobre los sustratos produce cambios de color que son interpretados visualmente.	Se agregan 5 mL de agua corriente a una bandeja de incubación para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. Se coloca una banda API 20E en la bandeja de incubación. Se prepara una suspensión bacteriana del microorganismo de prueba suspendiendo las células de una colonia bien aislada en 5 mL de solución salina al 0.85% estéril. Se compara la turbidez de la suspensión con un estándar 0.5 de McFarland, salvo para las identificaciones de enterobacterias del mismo día, cuando se compara la suspensión con un estándar. Mediante el uso de una pipeta de Pasteur, se llena cada cúpula con la suspensión bacteriana a través del agujero de inoculación. Se recubren las cúpulas de las tres descarboxilasas y de ureasa con vaselina estéril. Se incuba la unidad a 35 °C durante 5 horas (identificación en el mismo día) o durante 24-48 horas antes de leer los resultados.	ONPG Arginina dihidrolasa Lisina descarboxilasa Ornitina descarboxilasa Citrato Sulfuro de hidrógeno Ureasa Tryptófano desaminasa (agregar FeCl ₃ al 10%) Indol Voges-Proskauer (agregar KOH y α -naftol) Gelatina Glucosa Mannitol Inositol Sorbitol Ramnoso Sacarosa Melibiosa Amigdalina Arabinosa	Aldridge y Hodgrs, International Clinical Laboratories, Nashville, TN: se identifica el 90.5% de los cultivos y el 96.6% de las cepas clínicas aisladas. Exactitud global del 92% (J Clin Microbiol 1981;13:120-125). Grooch y Hill, University of Utah, 415 cultivos, identificación del mismo día 90.2% (J Clin Microbiol 1982;15:885,890).

comunicó correctamente el 96,9%, que incluyó ocho casos en los cuales se comunicaron dos o tres microorganismos y para resolverlo se requirieron pruebas complementarias (prospecto del envase de BBL Crystal, mayo de 1994). En dos evaluaciones independientes del sistema Crystal con microorganismos fermentativos principalmente de la familia enterobacterias, se comunicó una identificación correcta sin pruebas complementarias en el 91,6%⁴³⁷ y en el 92,9%⁴⁴⁰ respectivamente. En un estudio llevado a cabo por los CDC en el que se utilizó un stock de 626 cepas de prueba, el sistema Crystal identificó el 71,1% que mejoró hasta el 87,9% (88,8% para los entéricos; 84,3% para los no entéricos) después de incluir las pruebas adicionales sugeridas por el programa del software.⁴⁶³

SISTEMA RapID onE

El sistema RapID onE (Remel) es un micrométodo cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de enterobacterias de importancia clínica y otras bacterias seleccionadas gramnegativas oxidasa negativas aisladas en muestras clínicas humanas. El sistema comprende 1) paneles RapID onE y 2) reactivo RapID onE. Cada panel RapID onE tiene 18 cavidades de reacción formadas en la periferia de una bandeja descartable de plástico. Las cavidades de reacción contienen reactivos deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo (véase lámina en color 6-6C). Se utiliza una suspensión del microorganismo en líquido de inoculación RapID (2 mL) como inóculo de prueba, el cual se rehidrata e inicia las reacciones. Los paneles inoculados se colocan en las bandejas de incubación de madera aglomerada provistas en el paquete e incubadas a 35 a 37 °C en una incubadora sin CO₂ durante 4 horas.

Los paneles RapID onE contienen 18 cavidades de reacción que proporcionan 19 puntuaciones de pruebas. Las pruebas

marcadas PRO, GGT y PYR (cavidades 15, 16 y 17) requieren el reactivo RapID onE y son designadas con una caja dibujada alrededor de las pruebas. La prueba 18 es bifuncional y contiene dos pruebas separadas en la misma cavidad. Esta prueba es puntuada antes del agregado del reactivo y proporciona el resultado de la primera prueba, que es adonitol; luego se agregan dos gotas del reactivo INOVA Spot Indole a la cavidad 18 y la misma cavidad se puntúa nuevamente después del agregado del reactivo para proporcionar el resultado de la segunda prueba, que es indol. Los resultados de las 19 pruebas más oxidasa son puntuados en las cajas apropiadas del formulario de informe y se genera un código de perfil de siete dígitos. El microorganismo se obtiene encontrando el código de perfiles en el Compendio de códigos RapID onE.

En un estudio llevado a cabo en el University of Illinois Medical Center, 302 de 344 (87,8%) bacilos gramnegativos oxidasa negativos evaluados fueron identificados correctamente a nivel de las especies, con otros 24 (7%) microorganismos identificados correctamente a nivel de género o grupo. Seis microorganismos dieron una identificación inaceptable o ninguna, ocho dieron identificaciones cuestionables y cuatro (1,1%) dieron identificaciones incorrectas.⁴⁴³ Kitch y cols. comunicaron hallazgos similares con una tasa global de identificación a nivel de especie o de género del 95,8%, con una tasa de identificaciones equivocadas del 1,3%.³⁷¹

ENTEROTUBE II

De todos los sistemas, Enterotube II (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) es el de inoculación más fácil. El sistema ocupa poco espacio y el riesgo de contaminación es mínimo. En general, es fácil interpretar las reacciones de color; existe un problema menor para diferenciar la elevación del revestimiento de cera en el compartimento de glucosa (un indicador de producción de gas) de la retracción

artificial de los medios durante el almacenamiento. También puede haber una interpretación falsa negativa si una pequeña pérdida en el plástico permite el escape de gas a medida que se forma. Se deben agregar reactivos de indol y de Voges-Proskauer con una aguja y una jeringa a través del delgado lomo de plástico. Si no se hace con cuidado, el reactivo agregado puede escapar a otros compartimentos y alterar las reacciones. Por eso se recomienda interpretar las reacciones en los otros compartimentos antes de agregar los reactivos. Otra desventaja del Enterotube II, comparado con los sistemas que utilizan sustratos secos, es que la incorporación de medios de agar convencionales acorta el tiempo de preservación. El fabricante proporciona un sistema conveniente de codificación computarizada e identificación que enumera las posibles identificaciones bacterianas para los números biotípicos de cinco dígitos derivados de la interpretación de los cambios de color. En el cuadro 15-2 de la segunda edición de este libro se enumeran los detalles del diseño funcional, los procedimientos operativos y los sustratos utilizados.

Micro-ID

Micro-ID (Remel) es el sistema ideal para los laboratorios donde se desea la identificación de bacterias en 4 a 6 horas. La inoculación del sistema es relativamente fácil y las unidades ocupan poco espacio durante la incubación o el almacenamiento. Sólo es necesario agregar un reactivo (hidróxido de potasio al 20%) a una de las cámaras antes de interpretar los resultados. Las reacciones son definidas y se pueden comparar con una guía de colores. El fabricante aporta un registro de perfiles que enumera la identificación de los probables microorganismos para la identificación de los números biotípicos de cinco dígitos y se pueden hacer comparaciones con el ordenador para buscar el mejor ajuste. La precisión es igual a la de otros sistemas empaquetados o la excede. En el cuadro 15-2 de la segunda edición de este libro se enumeran los detalles de construcción y los procedimientos operativos.

MICROPLACA Biolog GN2

La microplaca Biolog GN2 (Biolog, Hayward CA) consiste en una placa de microtítulos con 96 celdas que evalúa la capacidad de un microorganismo para utilizar (oxidar) una o más de 95 fuentes diferentes de carbono en presencia de un indicador redox (colorante de tetrazolio). Una celda no contiene carbono y sirve como control negativo o celda de referencia. Se prellenar y desecan en las 96 celdas de la placa todos los nutrientes y las sustancias bioquímicas necesarios. Se utiliza violeta de tetrazolio para predetectar colorimétricamente el aumento de la respiración que ocurre en una celda cuando se está oxidando una fuente de carbono (véase lámina en color 6-6D). Cualquiera que sea su estructura, casi todo sustrato químico que sea oxidado por la celda conduce a la formación de NADH, lo que lleva a un flujo de electrones a lo largo de una vía de transporte de electrones. Los colorantes redox, como el tetrazolio, golpean con suavidad los electrones de este flujo y convierten el tetrazolio en formazán altamente coloreado. Por lo tanto, cuando se presenta a una célula una sustancia química que pueda oxidar, su respiración aumenta y el colorante incoloro se reduce en forma irreversible a un formazán, lo que deriva en un color violeta. Si se administra a la célula una sustancia química que no puede oxidar, no ocurre ninguna explosión respiratoria y no se forma ningún color. La prueba arroja un patrón de celdas violetas que constituye una "huella metabólica" de las

capacidades del microorganismo inoculado. Bochner ha publicado una descripción y los aspectos generales del sistema.⁴⁰ Miller y Rhoden, en los CDC, han publicado una evaluación preliminar sobre el Biolog en la cual comunican que el sistema fue satisfactorio con muchos géneros, pero que se observaron problemas con algunas cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*.³⁵ Holmes y cols.²²⁶ estudiaron 789 cepas, incluidos 55 taxones gramnegativos encontrados en el laboratorio clínico y comunicaron resultados mucho mejores cuando se leyeron las placas en forma manual, más que cuando se las leyó con un lector automático. Las placas leídas manualmente dieron los siguientes rendimientos: fermentadores oxidasa positivos, cinco taxones, 64 cepas, 92% de resultados correctos, 3% no identificados y 5% de resultados incorrectos; no fermentadores bioquímicamente activos, ocho taxones, 122 cepas, 88% de resultados correctos, 6% no identificados y 6% incorrectos; enterobacterias, 35 taxones, 511 cepas, 77% de resultados correctos, 8% no identificados y 15% incorrectos; no fermentadores no reactivos, siete taxones, 92 cepas, 38% de resultados correctos, 24% no identificados y 38% de resultados incorrectos. Estos autores informaron problemas con la identificación de cepas encapsuladas de algunos taxones de *Enterobacter* y *Klebsiella*, así como las cepas bioquímicamente menos activas de *Moraxella* y *Neisseria*.²²⁶ En la actualidad, el sistema Biolog se encuentra disponible en una plataforma completamente automática y se describe en la próxima sección sobre instrumentos automáticos.

SISTEMA MicroScan

El sistema MicroScan (Dade Behring, West Sacramento, CA) consiste en bandejas de plástico de tamaño estándar para microtítulos con 96 celdas en las cuales se incluyen hasta 32 sustratos reactivos para la identificación de las enterobacterias y otras especies bacterianas (existen paneles para grampositivos, gramnegativos y de las vías urinarias). Algunas bandejas, denominadas bandejas Combo, también incluyen microdiluciones de caldo de varios antibióticos en algunos de los microtubos para realizar pruebas de sensibilidad.¹³¹ Los paneles de MicroScan vienen en un estado congelado o contienen sustratos deshidratados que vuelven más conveniente el transporte y permiten el almacenamiento a temperatura ambiente y un tiempo de conservación más prolongado. Schieven y cols.⁴⁴² observaron que las bandejas con paneles de microdilución congelados y deshidratados proporcionaron resultados comparables en la identificación de microorganismos y de la sensibilidad a los antibióticos (tasas de discrepancia de sólo 1,3% y 4,2%, respectivamente).

Los microtubos se inoculan con una suspensión importante del microorganismo por identificar y se incuban a 35 °C durante 15 a 18 horas. Los paneles pueden interpretarse visualmente (véase lámina en color 6-6E), después de lo cual los resultados bioquímicos son convertidos en un número biotípico de siete u ocho dígitos que puede ser traducido en una identificación con un libro de códigos que proporciona el fabricante. Como alternativa, se puede utilizar un lector automático de bandejas para detectar el crecimiento bacteriano o cambios de color por diferencias en la transmisión de la luz. Las diferencias en los pulsos electrónicos son analizadas automáticamente mediante un microordenador que compara los patrones de reacción con un programa interno para determinar la probabilidad de identificaciones. Rhoden y cols.⁴⁴² observaron que AutoScan-4, un lector automático en el sistema MicroScan, identificó correctamente el 95,4% de los miembros de las enterobacterias (las lec-

turas falsas negativas ocasionales para reacciones de sulfuro de hidrógeno y arginina dihidrolasa fueron los únicos problemas que condujeron a una identificación errónea). Una desventaja citada por los autores es que el instrumento señala a veces "biotipo muy raro", lo cual hace que el usuario no tenga bien en claro cuál era el biotipo indicado.

SISTEMA SENSITITRE

El sistema Sensititre (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) puede adquirirse como un sistema de identificación entérico manual o en forma de un sistema de autoidentificación. La placa manual contiene medios para realizar 23 pruebas bioquímicas estándares, más un control, que están desecados en las celdas de una bandeja de microtítulos de 96 celdas y tamaño estándar. Cada bandeja contiene cuatro conjuntos duplicados de celdas bioquímicas, que permiten la identificación simultánea de cuatro microorganismos por bandeja. El sistema contiene pruebas bioquímicas convencionales y es inoculado y leído en forma manual. Stanek y cols.⁴⁵⁷ informaron que la concordancia entre Sensititre y API 20E para 1 415 aislados de enterobacterias fue del 94,6% a nivel de especies.

Sistemas de identificación semiautomáticos y automáticos MicroScan Walkaway

El Walkaway (Dade MicroScan, West Sacramento CA) es un instrumento completamente automático que incuba cualquier combinación de hasta 96 paneles convencionales o Rapid MicroScan en forma simultánea, agrega automáticamente reactivos a paneles convencionales, lee e interpreta los resultados de los paneles e imprime los resultados, todo sin intervención del operador (lámina en color 6-6F). Existen paneles de fluorescencia rápida además de los paneles MicroScan convencionales para utilizar con el instrumento Walkaway. Los paneles rápidos utilizan compuestos marcados fluorescentes y necesitan sólo una incubación de 2 horas para la identificación bacteriana. Cada sustrato fluorescente consiste en un fluoróforo, ya sea metilumbeliferona (MEU) o 7-amino-4-metilcumarina (AMC) unida a un compuesto de fosfato, azúcar o aminoácido. Se producen dos tipos de reacciones: fluorogénicas y fluorométricas. En las reacciones fluorogénicas, si se presenta una enzima específica en la suspensión bacteriana, escinde el compuesto fluorescente, liberando el fluoróforo, el cual luego da fluorescencia. Por ejemplo:



Las reacciones fluorométricas detectan cambios en el pH como ocurre con la fermentación de hidratos de carbono. La producción de ácido resultante produce una caída en el pH y una disminución en la fluorescencia. Además, se utilizan ocho reacciones de velocidad fluorogénica. Estas reacciones miden la velocidad de liberación del fluoróforo y se utilizan para diferenciar especies fenotípicamente similares. Los resultados de las reacciones ID son convertidos en biocódigos de 15 dígitos para su interpretación por el ordenador. El sistema óptico colorimétrico Walkaway tiene 97 fotómetros iluminados con una fuente única de tungsteno-halógeno a través de 97 fibras ópticas. La luz proveniente de la fuente atraviesa los filtros de

interferencia sobre una rueda de colores y es enfocada sobre las fibras ópticas, 96 de las cuales reflejan la configuración de un panel de 96 celdas. El fotómetro 97° proporciona una lectura basal con la cual se determinan las proporciones de las señales del fotómetro. Durante cada ciclo de lectura, la rueda de colores que rota proporciona lecturas en seis longitudes de onda diferentes a través del espectro visible. Para las reacciones bioquímicas, el ordenador selecciona la lectura en la longitud de onda que mejor discrimina la reacción que ocurre en cada celda. Clayland y cols. han publicado una revisión de la tecnología del Walkaway.¹¹⁸ Varios estudios han mostrado que Walkaway proporciona una identificación precisa de los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.^{261,396,398,421,513}

El panel de identificación rápida en 2 horas fluorogénico de MicroScan ha sido actualizado para aumentar significativamente la precisión de la identificación y ampliar la cantidad de taxones en la base de datos. El panel actualizado (Panel rápido para identificación de gramnegativos 3, RNID3) consiste en 36 pruebas recientemente formuladas y una base de datos nueva compuesta por 119 taxones, que cubre un total de 150 especies, que incluyen 12 especies nuevas adicionales. Achondo y cols. comunicaron que el sistema nuevo tiene una precisión del 98,4% (92,5% de resultados correctos para las especies, 1,6% de resultados correctos para el género y 4,3% de resultados correctos para las especies con pruebas adicionales) y 99,3% de las cepas aisladas clínicamente significativas (97,4% de las especies correctas, 1,0% de los géneros correctos y 0,9% de las especies correctas mediante pruebas adicionales).⁵ La precisión y el rendimiento del panel RNID3 fueron examinados en una evaluación multicéntrica en la cual se evaluó un total de 405 aislados que comprendían 54 especies; 96,8% de estas especies fueron identificados correctamente. En el mismo estudio, se examinaron 465 aislados para la reproductibilidad intralaboratorio e interlaboratorio y dieron una concordancia del 99,8%.³⁹⁶

Sistema Vitek

El sistema Vitek (Legacy) (bioMérieux) fue introducido inicialmente para realizar pruebas automáticas de sensibilidad a los antibióticos, con modificaciones ulteriores para mejorar la precisión.³⁵⁷ En 1982, se introdujo la *Enterobacteriaceae*-plus Biochemical Card (EMB +), que proporciona la identificación automática de las enterobacterias dentro de las 8 horas de la incubación.^{29,510} En 1996 se mejoró la tarjeta de identificación para gramnegativos. La nueva versión, denominada Tarjeta GNI+, agregó 20 especies a la base de datos, mejoró el rendimiento y aumentó la velocidad de identificación.^{47,365} Moss y cols. comunicaron que GNI+ identifica los microorganismos fermentadores de la glucosa en 2 a 8 horas y los microorganismos no fermentadores de glucosa en 4 a 12 horas y el 40,1% de los microorganismos evaluados son identificados en 3 horas.³⁵¹ Hansen y cols. evaluaron la precisión de las tarjetas Vitek GNI+ utilizando la inoculación directa desde frascos de hemocultivos positivos empleando una suspensión elaborada mediante la centrifugación diferencial de caldo de hemocultivo positivo. El método directo condujo a un 75% de identificaciones correctas, un 9% de identificaciones erróneas y un 17% de falta de identificación. Todos los aislados mal identificados fueron *E. coli*, de los cuales se comunicó que el 80% eran *Salmonella* ser. *Arizonae*.²¹⁰ El sistema Vitek Legacy tiene un amplio uso en los laboratorios de microbiología clínica y por lo general ha sido aceptado como un enfoque confiable para la rápida identificación de los bacilos gramnegativos hallados comúnmente.^{364,390,421} La construcción y los procedimientos

operativos de las versiones anteriores del sistema Vitek, ideadas al principio para realizar pruebas automatizadas de sensibilidad a los antibióticos, se describieron con cierto detalle en la segunda edición de este libro (cuadro 10-5).

VITEK 2 (bioMérieux) es un sistema modular integrado que consiste en una unidad de llenado-selladora, un lector-incubador, un módulo de control computarizado, una terminal de datos y una impresora de múltiples copias (véase lámina en color 6-6G). Además, incorpora varias mejoras técnicas que automatizan muchos procedimientos que se realizan manualmente con el sistema VITEK legacy. El sistema detecta la proliferación bacteriana y los cambios metabólicos en las microceldas de las tarjetas delgadas de plástico utilizando una tecnología basada en la fluorescencia (a fines de 2004 se introdujo un instrumento de base colorimétrica). La tarjeta de identificación para los bacilos gramnegativos (tarjeta ID-GNB) para el VITEK 2 es una tarjeta de plástico con 64 celdas que contiene 41 pruebas bioquímicas fluorescentes, que incluyen 18 pruebas enzimáticas para aminopeptidasas y -oxidasas. Los sustratos utilizados para la detección de las aminopeptidasas suelen estar acoplados con la 7-amino-metilmecorina (7AMC); los sustratos para la detección de -oxidasas suelen estar acoplados con 4-metilumbeliferona (4MU). Además, existen 18 pruebas de fermentación, dos pruebas de descarboxilasa y otras tres pruebas. Hay dos celdas de control negativas y las celdas restantes están vacías. Los resultados son interpretados por la base de datos de ID-GNB después de un período de incubación de 3 horas. En un estudio de Funke y cols., se mostró que el sistema VITEK identificaba correctamente el 84,7% de las especies seleccionadas que representaban 70 taxones diferentes de enterobacterias y bacterias no entéricas dentro de las 3 horas.¹⁸¹ Ling y cols., en un estudio mucho más pequeño que representó a 31 taxones diferentes de las enterobacterias más recuperadas y especies de no fermentadores, obtuvo un 95% de identificaciones correctas a nivel de especies con el VITEK 2.¹⁸² Estos mismos investigadores evaluaron el VITEK 2 para una identificación rápida de bacilos gramnegativos a partir de frascos de hemocultivos positivos y comunicaron que 97 (82,2%) de las cepas eran identificadas correctamente a nivel de las especies y 21 (17,8%) no fueron identificadas. No hubo identificaciones erróneas.¹⁸³ En otros dos estudios, O'Hara y Miller¹⁸⁷ comunicaron una precisión del 93% para la identificación de cultivos de stock entéricos y Gavin y cols.¹⁸⁶ informaron una precisión del 95,3% (*Enterobacteriaceae*, 95,9%; no *Enterobacteriaceae*, 92,5%) con el VITEK 2.

Sistema de autoidentificación para gramnegativos Sensititre

El sistema de incubación y lectura automática Sensititre (ARIS) (TREK Diagnostic Systems) es un sistema automático que utiliza la tecnología de fluorescencia para detectar la proliferación bacteriana y la actividad enzimática. El sistema consiste en 32 pruebas bioquímicas recién formuladas, que incluyen medios bioquímicos clásicos seleccionados reformulados para que proporcionen una señal de fluorescencia, junto con pruebas de fluorescencia creadas recientemente. Cada medio de prueba bioquímico junto con un indicador apropiado de fluorescencia está desecado en las celdas individuales de la placa Sensititre. Cada placa está diseñada para evaluar tres microorganismos separados. Como son placas desecadas, pueden almacenarse a temperatura ambiente. Todas las pruebas de autoidentificación se leen en el autolector Sensititre para detectar la presencia o ausencia de fluorescencia. Los resultados se transmiten a un ordenador para su análisis e identificación. Los

resultados pueden leerse después de 5 horas de incubación. Si no se puede obtener un nivel satisfactorio de identificación a las 5 horas, la placa puede ser simplemente reincubada y leída después de una incubación durante toda la noche. Debido al uso de la tecnología de fluorescencia, estas placas no pueden leerse manualmente y sólo se pueden leer en un autolector Sensititre correctamente estandarizado. Los datos internos de la compañía para 1 084 aislados de enterobacterias muestran una concordancia global a las 5 horas del 92,4% y a las 18 horas del 93,4% cuando se comparan con los métodos estándares (información técnica del producto de Sensititre).

Sistema Phoenix

El sistema microbiológico automático Phoenix (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) es un nuevo sistema de identificación y prueba de sensibilidad a los antibióticos completamente automático. Está formado por paneles descartables que combinan tanto la identificación como las pruebas de sensibilidad a los antibióticos y un instrumento que realiza una lectura automática a intervalos de 20 minutos durante la incubación (lámina en color 6-6H). El segmento de identificación para gramnegativos utiliza 45 sustratos bioquímicos, que incluyen 16 fluorogénicos, 14 de fermentación, 8 de fuentes de carbono, 5 cromogénicos y otros 2 sustratos (urea y ornitina) para identificar bacilos gramnegativos aerobios en 2-12 horas, con la gran mayoría de los resultados provistos en 4 horas o menos. El instrumento controla tanto los cambios espectrales visibles como los niveles de intensidad de fluorescencia; según el tipo de sustrato, interpreta los resultados y proporciona una respuesta cuando el sistema tiene confianza en la identificación. En un estudio de Stefaniuk y cols., el Phoenix mostró una tasa alta de concordancia con los métodos de identificación convencionales, que varió del 100% para los cocos grampositivos hasta el 96% para los no fermentadores gramnegativos y del 92,5% para las enterobacterias.⁴⁶⁰

Sistema OmniLog ID

El sistema OmniLog ID (Biolog, Hayward, CA) es una plataforma completamente automática para usar con el método de prueba de utilización de fuente de carbono de Biolog (véase la descripción de Biolog GN2 Microplaca en la sección anterior). El sistema OmniLog incuba, lee e interpreta simultáneamente las Microplacas Biolog. Este sistema procesa continuamente muestras pero permite al usuario un acceso completo en cualquier momento durante una corrida de la muestra. Una característica singular de este sistema es la temperatura de incubación definida por el usuario que permite que los microorganismos sean incubados a su temperatura óptima para obtener el crecimiento máximo para una identificación precisa. El instrumento comienza la lectura de las microplacas 4 horas después de que han sido colocadas en el lector. Se compara el patrón con la base de datos de identificación y se dice que existe identificación cuando se han desarrollado suficientes reacciones positivas. Si no se obtiene ningún resultado después de 6 horas, el instrumento continúa automáticamente incubando la microplaca y comienza la lectura nuevamente luego de 16 horas hasta 24 horas. La base de datos de Biolog contiene más de 1 400 microorganismos diferentes que incluyen 501 especies de gramnegativos, que representan aquellos importantes tanto en microbiología clínica como no clínica. Muchas de estas especies no pueden ser identificadas con otros sistemas de identificación.

En resumen, los fabricantes siguen proporcionando nuevos sistemas y modificaciones de los ya existentes para la identificación de microorganismos. Para pasar los estándares de la Food and Drug Administration, todos estos sistemas deben tener un rendimiento con una precisión igual o mejor a los métodos de referencia. Por lo tanto, cada sistema puede ser utilizado en los laboratorios clínicos, pero la elección depende de diversas variables, como el volumen de las pruebas, la experiencia del personal técnico, la necesidad de identificaciones definitivas y el costo de la operación. Las enterobacterias, como grupo, están aumentando con rapidez y en su mayoría son muy activas desde el punto de vista bioquímico, por lo cual son muy apropiadas para el procesamiento por medio de sistemas automáticos y semiautomáticos. En este libro sólo hay espacio para una reseña general de estos sistemas. Para saber más remitimos al lector a la revisión de los sistemas automáticos escrita por Stager y Davis.⁴³⁶ Pueden consultarse las referencias citadas para obtener descripciones más detalladas y evaluaciones del rendimiento.

REFERENCIAS

- Abbott S, Janda JM. *Enterobacter cancerogenus* ("Enterobacter raiysiae") infections associated with severe trauma or crush injuries. *Am J Clin Pathol* 1997;107:359-361.
- Abbott SL, Janda JM. Isolation of *Klebsiella regensburgi* ("Klebsiellatrubulisi") from a patient with transient bacteremia and from a patient with a septic knee. *J Clin Microbiol* 1994;32:2854-2855.
- Abbott SL, O'Connor J, Rubin T, et al. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4852-4854.
- Abdel-Haq NM, Asmar BI, Abuhamanour WM, et al. *Yersinia enterocolitica* infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:954-958.
- Achondo K, Bascomb S, Bobali J, et al. New improved MicroScan Rapid Negative Identification Panel. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 1995;C307:53.
- Adamkiewicz TV, Herkovich M, Krishnan C, et al. Infection due to *Yersinia enterocolitica* in a series of patients with β -thalassemia: incidence and predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1998;27:1362-1366.
- Avalantis A, Belle AM, Chagnion JP, Serruys E. *Klebsiella ascorbata* isolated from a baby with diarrhea. *Clin Microbiol Newslett* 1985;7:51.
- Aguirre PM, Cacho JB, Folgueira L, et al. Rapid fluorescence method for screening *Salmonella* spp. from enteric differential agars. *J Clin Microbiol* 1990;28:118-149.
- Alballaa SR, Qadri SMH, Al-Furayh O, Al-Qutary K. Urinary tract infection due to *Rahella aquapalis* in a renal transplant patient. *J Clin Microbiol* 1992;30:2948-2950.
- Albert MJ, Alam K, Islam M, et al. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. *Infect Immun* 1991;59:1507-1513.
- Alekris S, Steigerwalt AG, Bockemuhl J, et al. *Yersinia ruckeri* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:327-332.
- Anabury T, Dachs H, Ogawa O, et al. *Serratia ficaria*: a misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zone. *J Clin Microbiol* 1998;36:3266-3272.
- Ancher JR, Schell RF, Penell DR, et al. Identification of *Yersinia* spp. with the API 20E system. *J Clin Microbiol* 1987;25:2398-2399.
- Andrino MJ, Bland LA, Tittle MA, et al. Growth and coagulase production of *Yersinia enterocolitica* and *Enterobacter agglomerans* in packed erythrocytes. *J Clin Microbiol* 1989;27:1483-1485.
- Arthur JD, Pierce JR. *Citrobacter diversus* meningitis and brain abscess associated with *Bacteroides melaninogenicus*. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:592-593.
- Aschelfind KE, Fry JC, Bailey MJ, et al. Characterization of *Serratia* isolates from soil: ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont, et al. 1983 to *Serratia quinovorans* comb. sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:2281-2289.
- Aspevall O, Osterman B, Dummer R, et al. Performance of four chromogenic urine culture media after one or two day of incubation with reference media. *J Clin Microbiol* 2002;40:1300-1303.
- Aspinall SE, Huckle MA, Hutchinson DN. Improved isolation of salmonellae from faeces using a semisolid Rappaport-Vassiliadis medium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:936-939.
- Awsare SV, Lillo M. A case report of *Escherichia vulneris* urosepsis. *Rev Infect Dis* 1991;13:1247-1248.
- Babu K, Sonnenburg M, Kalligula S, et al. Isolation of salmonellae from dried rattlesnake preparations. *J Clin Microbiol* 1990;28:361-362.
- Balench PR, Thom AL, Coster DJ. *Serratia ficaria* endophthalmitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1563-1564.
- Bae BHC, Sareka SB. *Cuterebra divisa* isolated from scrotal abscess. *J Urol* 1983;130:148-149.
- Bae BHC, Sareka SB, Ajamy JA. Enteric group 15 (*Enterobacteriaceae*) associated with pneumonia. *J Clin Microbiol* 1981;14:596-597.
- Bagley ST, Seidler RJ, Brenner DJ. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Curr Microbiol* 1981;6:105-109.
- Baltescu M, Hansen PR, Marcinak JE, et al. Chronic vulvovaginitis caused by antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in a prepubertal child. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:170-172.
- Bale MJ, McLaws SM, Fenn JP, et al. Use of acid fast savings with morphologic criteria and the spot indole test as a routine means of identification of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984;2:187-191.
- Bale MJ, McLaws SM, Matten JM. The spot indole test for identification of swimming *Proteus*. *Am J Clin Pathol* 1985;83:87-90.
- Baron EJ. Rapid identification of bacteria and yeast: summary of a National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed guideline. *Clin Infect Dis* 2001;33:220-225.
- Barry AL, Bodel RE. Identification of *Enterobacteriaceae* by the AutoMicrobic system: *Enterobacteriaceae* biochemical cards versus *Enterobacteriaceae*-plus biochemical cards. *J Clin Microbiol* 1982;15:575-581.
- Barry AL, Bernshten KL, Adams AP, et al. Improved 15-hour methyl red test. *Appl Microbiol* 1970;30:866-870.
- Bascomb S, Abbott SL, Bobali JD, et al. Multicenter evaluation of the MicroScan Rapid Gram-Negative Identification Type 3 Panel. *J Clin Microbiol* 1997;35:2531-2536.
- Beer N, Klugman KP, Tobiansky L, Koonhof HJ. Wound colonization by *Erwinia americana*. *J Clin Microbiol* 1986;23:650-651.
- Beatty ME, Bopp CA, Wells JG, et al. Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States. *Emerg Infect Dis* 2004;10:518-521.
- Bercovier H, Steigerwalt AG, Guisoale A, et al. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:166-172.
- Bercovier H, Ursing J, Brenner DJ, et al. *Yersinia kristensenii* a new species of *Enterobacteriaceae* composed of mucosa-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia pseudocolitica*-like). *Curr Microbiol* 1980;4:219-224.
- Bettelheim KA, Evangelidis H, Pearce JL, et al. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J Clin Microbiol* 1993;31:760-761.
- Biering G, Karlsson S, Clark NC, et al. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 1989;27:2054-2056.
- Bisset ML, Powers C, Abbott SL, Janda JM. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. *J Clin Microbiol* 1990;28:910-912.
- Bjune G, Roud TE, Eng J. Bacterial shock due to transfusion with *Yersinia enterocolitica* infected blood. *Scand J Infect Dis* 1984;16:411-412.
- Blekher L, Siegmund-Igra Y, Schwart D, et al. Clinical significance and antibiotic resistance pattern of *Leishmania* spp., and emerging nosocomial pathogen. *J Clin Microbiol* 2000;38:3036-3038.
- Bochner B. "Brenthprints" at the microbial level: an automated redox-based technology quickly identifies bacteria according to their metabolic capacities. *ASM News* 1989;55:536-539.
- Bochner B. Rainbow UTI System: a rapid and simple multicolor diagnostic system for common urinary tract pathogens. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 1995;C374:65.
- Boersma NE, Althaus RE, Meurant RG. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:249-255.
- Bodero CR, D'Huicville HM, Samsonetti PJ. DNA hybridization technique to detect *Shigella* sp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1984;20:959-961.
- Bollet C, Galmier M, Sainy J-M, et al. *Serratia fomiculata* isolated from a leg abscess. *J Clin Microbiol* 1991;29:834-835.
- Bottone EJ. Atypical *Yersinia enterocolitica*: clinical and epidemiological parameters. *J Clin Microbiol* 1978;7:562-567.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:257-276.
- Bourbeau PP, Heiser BJ. Comparison of Vitek GNI and GNI + cards for identification of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1998;36:2775-2777.
- Brenner DJ. *Enterobacteriaceae*. In: Krig NR, Holt JC, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984;408-420.
- Brenner DJ, Bercovier H, Ursing J, et al. *Yersinia hawaiiensis*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia pseudocolitica*-like). *Curr Microbiol* 1980;4:207-212.
- Brenner DJ, Davis DR, Steigerwalt AG, et al. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermanni* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1982;15:703-713.
- Brenner DJ, Grimont PAD, Steigerwalt AG, et al. Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter freundii* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter brachii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedulii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:645-658.
- Brenner DJ, Hickman-Brenner FW, et al. Replacement of NCTC 4175, the current type strain of *Proteus vulgaris* with ATCC 29905: request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:870-871.
- Brenner DJ, McWhorter AC, Kai A, et al. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimen, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and

- Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *J Clin Microbiol* 1986;23:1114-1120.
54. Brenner DJ, McWhorter AC, Leete-Kauton JK, et al. *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wound. *J Clin Microbiol* 1982;15:1133-1140.
 55. Brenner DJ, Muller HE, Steigerwalt AG, et al. Two new *Rahnella* genus species that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;48:141-149.
 56. Brenner DJ, Richard C, Steigerwalt AG, et al. *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: a new species of Enterobacteriaceae found in clinical specimens and environment. *Int J Syst Bacteriol* 1988;30:1-6.
 57. Brenner DJ, Ursing J, Bercovier H, et al. Deoxyribonucleic acid relatedness in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica* organisms. *Curr Microbiol* 1980;4:195-200.
 58. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, et al. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 2000;38:2465-2467.
 59. Brewer T, Benkel DH, Shapiro RL, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* 2001;7:977-982.
 60. Brooker DC, Lund ME, Blazevic DJ. Rapid test for lysine decarboxylase activity in Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol* 1973;26:622-623.
 61. Brooks JT, Bergmeier-Sweet D, Kennedy M, et al. Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp. *Clin Infect Dis* 2004;38:190-198.
 62. Brooks JT, Sowers EO, Wells JG, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* reported to CDC, 1983-2000 (abstract S56). In: Program and abstract of the 9th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (San Francisco; Alexandria, VA: Infectious Disease Society of America, 2001:165).
 63. Bruckner DA, Colonna P, Glenn D, et al. *Cimobacter farmeri* bacteremia in a child with short-bowel syndrome. *J Clin Microbiol* 1997;35:3332-3334.
 64. Caldwell ME, Ryerson DL. Salmonellosis in certain reptiles. *J Infect Dis* 1939;65:242-245.
 65. Caprioli A, Torzi AE. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: Kaper JB, O'Brien AD, eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington, DC: American Society for Microbiology Pres, 1998:38-48.
 66. Carlander JE, Chao JD, Corale RB, et al. *Rahnella aquatilis* bacteremia in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Infect Dis* 2001;33:471-473.
 67. Carlquist FR. A biochemical test for separating paracolon groups. *J Bacteriol* 1956;71:339-341.
 68. Caroff N, Chameaux C, Le Gallou F, et al. Two epidemiologically related cases of *Rahnella aquatilis* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:349-352.
 69. Carpenter CCC. Shigellosis. In: Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 16th ed. Philadelphia: Saunders, 1982:1517-1519.
 70. Carrero P, Garrote JA, Pacheco S, et al. Report of six cases of human infection by *Serratia plymorum*. *J Clin Microbiol* 1995;33:275-276.
 71. Carricajo A, Boisse S, Thore J, et al. Comparative evaluation of five chromogenic media for detection, enumeration and identification of urinary tract pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:796-803.
 72. Caner J, Bowden FJ, Sriprakash KS, et al. Diagnostic polymerase chain reaction for donovansia. *Clin Infect Dis* 1999;28:1166-1169.
 73. Caner JS, Bowden FJ, Bastian I, et al. Phylogenetic evidence for reclassification of *Cahymnabacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1695-1700.
 74. Carter JS, Kemp DJ. A colorimetric detection system for *Cahymnabacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect* 2000;76:134-136.
 75. Cassie R, Cucchini P. Comparison of *Salmonella* plasmogenic medium with DCL5 agar for isolation of *Salmonella* species from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:3229-3232.
 76. Castillo CB, Bruckner DA. Comparative evaluation of the Eiken and API 20E systems and conventional methods for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1994;20:754-757.
 77. Centers RN. Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2001. Atlanta: Department of Health and Human Services, 2002.
 78. Centers for Disease Control and Prevention. *Shigella* surveillance: annual summary, 2001. Atlanta: Department of Health and Human Services, 2002.
 79. Centers for Disease Control and Prevention. H1P investigates *Enterobacter hormchei* infections. *CDC/NCID Focus* Feb 1993;3(5).
 80. Centers for Disease Control and Prevention. Arizona hantavirus septicemia associated with rattlesnake powder—California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1983;32:464-465.
 81. Centers for Disease Control and Prevention. Gastrointestinal illness associated with imported Brie cheese—District of Columbia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1985;32:533.
 82. Centers for Disease Control and Prevention. Update milkborne salmonellosis—Illinois. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1985;34:200.
 83. Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Salmonella enteritidis* infections and shell eggs—United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;39:909.
 84. Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Yersinia enterocolitica* bacteremia and endotoxin shock associated with red blood cell transfusions—United States, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40:176-178.
 85. Centers for Disease Control and Prevention. outbreak of *Salmonella enteritidis* infection associated with consumption of raw hell eggs, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:369-372.
 86. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumonic plague—Arizona, 1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:737-739.
 87. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* gastroenteritis—California, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42:793-797.
 88. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with nationally distributed ice cream product—Minnesota, South Dakota, and Wisconsin, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:740-741.
 89. Centers for Disease Control and Prevention. Reptile-associated salmonellosis—selected states, 1994-1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:347-350.
 90. Centers for Disease Control and Prevention outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21—Helena, Montana, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:501-503.
 91. Center for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider—Connecticut and New York, October 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:4-8.
 92. Centers for Disease Control and Prevention. Red blood cell transfusions contaminated with *Yersinia enterocolitica*—United States, 1991-1996, and initiation of a national study to detect bacteria-associated transfusion reactions. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:553-555.
 93. Centers for Disease Control and Prevention. Fatal hantavirus—Arizona and Colorado, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:617-620.
 94. Centers for Disease Control and Prevention. Reptile-associated salmonellosis selected states, 1996-1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:11009-1013.
 95. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infection associated with eating raw or undercooked shell eggs—United States, 1996-1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:73-79.
 96. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O111:H8 outbreak among teenage campers—Texas, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:321-324.
 97. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds—Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:911-913.
 98. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits—Pennsylvania and Washington, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:293-297.
 99. Centers for Disease Control and Prevention. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered formula—Tennessee, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:297-300.
 100. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport—United States, January–April 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:545-548.
 101. Centers for Disease Control and Prevention. Imported plague—New York City, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:725-728.
 102. Centers for Disease Control and Prevention. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis among infants exposed to chitterlings—Chicago Illinois, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:956-958.
 103. Centers for Disease Control and Prevention. Reptile-associated salmonellosis—selected states, 1998-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:1206-1209.
 104. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of provisional cases of selected notifiable diseases. United States, cumulative, week ending January 3, 2004 (53rd) week. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;52:1297.
 105. Chagla AH, Borczyk AA, Adom JE, et al. Evaluation of the L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis test for the differentiation of member of the families Enterobacteriaceae and Fibriaceae. *J Clin Microbiol* 1993;31:1946-1948.
 106. Chong CL, Jeong I, Shin JH, et al. *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. *J Clin Microbiol* 1999;37:4161-4162.
 107. Chonles S, Rahafison L, Kalafatis L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 2003;361:211-216.
 108. Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewe L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1991;35:107-111.
 109. Chapman PA, Wright DJ, Siddons CA. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Med Microbiol* 1994;40:424-427.
 110. Chaux C, Crepy M, Xueref S, et al. Comparison of three chromogenic agar plates for isolation and identification of urinary tract pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2002;5:641-645.
 111. Chester II, Moskowitz LB. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1987;25:439-441.
 112. Clavel H. *Serratia odorifera* biogroup I causing an invasive human infection. *J Clin Microbiol* 1986;26:1244-1245.
 113. Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *paracolon* cultures from each 72, other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol* 1946;32:461-466.
 114. Christiaens E, Hansen W, Meinet J. Unlancement des expectorations d'un patient atteint de leucémie lymphoïde chronique et de broncho-emphyse d'une Enterobacteriaceae nouvellement décrite: *Rahnella aquatilis*. *Med Maladies Infect* 1987;17:733-734.
 115. Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Svingenhuson O, Cooksey RC. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:467-472.

116. Clark RB, Janda JM. Infection of *Serratia plymorum* from a human burn site. *J Clin Microbiol* 1985;3:650-657.
117. Clarridge JE, Mueber DM, Painsam V, et al. Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. *J Clin Microbiol* 1980;11:511-514.
118. Clayland BG, Clayland C, Tomblin KM, et al. Full spectrum automation for the clinical microbiology laboratory. *Am Clin Lab* 1989; May:30-34.
119. Cohen ML, Potter M, Podlask R, Feldman RA. Turtle-associated salmonellosis in the United States: effect of public health action, 1970-1976. *JAMA* 1980;243:1247-1249.
120. Coudron PE, Markowitz SM. *Codexia lupager* isolated from lung tissue. *Clin Microbiol Newsl* 1987;9:171-172.
121. Couffée E, Saint-Jean LA, Plante R. Infection with *Edwardsiella tarda* related to a vascular prosthesis. *Clin Infect Dis* 1992;14:621-622.
122. Cover TL, Aber RC. *Yersinia enterocolitica* N Engl J Med 1989;321:16-24.
123. Ochoya V, Goudin C. Urinary infection due to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Vie Med Can Fr* 1973;2:3-5.
124. Cross JH, Brenner DJ, Ewing WH, et al. Molecular relationships among the salmonellae. *J Bacteriol* 1973;115:307-315.
125. Carlsson RG. Neonatal intracranial abscess: two cases caused by *Citrobacter* and a literature review. *Ann Neurol* 1980;8:269-272.
126. Dahl KM, Barry J, DeBiasi RL. *Escherichia hermanni* infection of a cephalohematoma: case report, review of the literature, and description of a novel invasive pathogen. *Clin Infect Dis* 2002;35:e96-e98.
127. Darbas H, Jean-Pierre H, Paillisson J. Case report and review of septicemia due to *Serratia foetida*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2285-2288.
128. da Silva CL, Miranda LE, Moreira BM, et al. *Enterobacter hormaechei* blood-stream infection at three neonatal intensive care units in Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:173-177.
129. De Baere T, Wauters C, Hoytbroeck A, et al. Isolation of *Loxocera odoratissima* from a patient with a chronically inflamed gallbladder and from a patient with sepsis without focus. *J Clin Microbiol* 2003;39:1674-1675.
130. De Baere T, Wauters G, Kampfer P, et al. Isolation of *Burkholderia gonivorae* from a spinal cord patient with urinary bladder pathology. *J Clin Microbiol* 2002;40:3867-3870.
131. Degrolami PC, Eichenberger KA, Salty LC, et al. Evaluation of the AutoScan-3 device for reading microdilution trays. *J Clin Microbiol* 1983;18:1292-1295.
132. Desenclos J-C, A. Juego S, Klotz KC. A cluster of *Edwardsiella tarda* infection in a day-care center in Florida. *J Infect Dis* 1990;162:782-783.
133. De Smet JM, Bolderdijk RF. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J Food Prot* 1987;50:658-661.
134. Devenish JA, Ciebia BW, Brodsky MH. Nucleic-acid-bright green-glucose agar: new medium for isolation of salmonellae. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:539-545.
135. Devresse K, Claeys G, Verschraegen G. Septicemia with *Ewingella americana*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2746-2747.
136. Domingo D, Llinas A, Alarcón T, et al. Nosocomial septicemia caused by *Serratia plymorum*. *J Clin Microbiol* 1994;32:575-577.
137. Drancourt M, Boullet C, Carta A, et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov., and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:925-932.
138. Drew DL, Mercer L, Peacock JB. Splenic abscess caused by *Shigella flexneri* and *Bacteroides fragilis*. *J Clin Microbiol* 1984;19:79-80.
139. D'Souza HA, Campbell M, Baron EJ. Practical bench comparison of BBL CHROMagar Orientation and standard two-plate media for urine cultures. *J Clin Microbiol* 2004;42:60-64.
140. Delguer M V, Fabbriani SH, Bando SY, et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enterotoxigenic *E. coli* heat stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis* 2003;188:1685-1694.
141. Dupont HL. *Shigella* Infect Dis Clin N Am 1988;2:599-605.
142. Dupont HL. *Shigella* species (bacillary dysentery). In: Mandell GL, Bennett E, Dolin R, eds. *Principle and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000;2363-2369.
143. Dupont HL, Levine MM, Hornick RB, et al. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* 1989;159:1126.
144. Dajch H, Alwegg M. Comparison of Rambach agar, SM-1D medium, and Hektoen enteric agar for primary isolation of non-typhi salmonellae from stool samples. *J Clin Microbiol* 1993;31:410-412.
145. Dauch H, Alwegg M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J Clin Microbiol* 1995;33:802-804.
146. Dyer J, Hayami KC, Janda WM, Schreckenberger PC. *Citrobacter rodentium* meningitis and brain abscess in a premature infant. *J Clin Microbiol* 1997;35:2686-2688.
147. Edberg SC, Trepet RW. Rapid and economical identification and antimicrobial susceptibility test methodology for urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 1983;18:1287-1291.
148. Ederer GM, Clark M. Moolay-indole-ornithine medium. *Appl Microbiol* 1970;20:849-850.
149. Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis: Burgess, 1972.
150. Edwards PR, Fife MA. Lysine-iron agar in the detection of Arizona cultures. *Appl Microbiol* 1961;9:478-480.
151. Edson M, Tierney LA, Roellag OJ, et al. Feline plague in New Mexico: risk factors and transmission to humans. *Am J Public Health* 1988;78:1333-1335.
152. Eigner U, Retzbach R, Hentzmann R, et al. Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens. *Int J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:558-565.
153. Eklund M, Scheu F, Sjöström A. Clinical isolates of non-O157 abiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol* 2001;39:2829-2834.
154. Elin RJ, Robinson RA, Levin AS, et al. Lack of clinical usefulness of the Simulus test in the diagnosis of endocarditis. *N Engl J Med* 1973;289:521-524.
155. Engler HD, Troy K, Botone EJ. Bacteremia and subcutaneous abscess caused by *Proteus penneri* in a seafaring host. *J Clin Microbiol* 1990;28:1645-1646.
156. Euzéby JP. Revised *Salmonella* nomenclature designation of *Salmonella enterica* (ex Kaufmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev., as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignières 1900 (Approved List 1980), rejection of the name *Salmonella chrysaeus* (Smith 1894) (Schuster 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:927-930.
157. Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier, 1986.
158. Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR, et al. *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* n. sp., based on a new species of *E. tarda*. *Int Bull Bact Nomencl Taxon* 1963;15:33-38.
159. Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. *Yersinia rockeri* sp. nov., the red-mouth (RM) bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:37-44.
160. Feinstein V, Hopper RL, Mills K, Bodey GP. Colonization by or diarrhea due to *Klebsiella* species. *J Infect Dis* 1982;145:127.
161. Fahnstiel V, Yabery R, Trier P, Bodey GP. Overwhelming infection in a cancer patient caused by Arizona himshawii: its relation to snake pill ingestion. *Am J Infect Control* 1982;10:147-148.
162. Fallow S. Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonella* and *Shigella*. *Am J Clin Pathol* 1958;29:598-600.
163. Farmer JJ III, Ashby MA, Hickman FW, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1980;30:569-584.
164. Farmer JJ III, Carter GP, Miller VL, Fallow S, Wachsmuth IK. Pyrazinamide, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2589-2594.
165. Farmer JJ III, Davis BR, Hickman-Brenner FW, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;21:46-76.
166. Farmer JJ III, Fanning GR, Davis BR, et al. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter aerocola*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;21:77-81.
167. Farmer JJ III, Fanning GR, Hamley-Carter GP, et al. *Klebsiella*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Klebsiella aerocola* sp. nov. and *Klebsiella cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981;13:919-933.
168. Farmer JJ III, Jørgensen JH, Grimont PAD, et al. Xanthobacterium luminescens (DNA hybridization group 51) from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1989;27:1594-1600.
169. Farmer JJ III, McWhorter AC, Genu X, Edwardsiella Ewing and McWhorter 1965, 374. In: Krieg NR, Holt JC, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984;486-491.
170. Farmer JJ III, Sheth NK, Hutkins JA, et al. Bacteremia due to *Codexia penneri* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1982;16:775-778.
171. Fay GD, Barry AL. Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl Microbiol* 1972;23:710-713.
172. Ferragut C, Izard D, Gavini P, et al. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:133-142.
173. Ferragut C, Izard D, Gavini P, et al. *Betulaella*, a new genus of the family *Enterobacteriaceae*. *Zentralbl Baktériol Parasitenk Infektionskr Hyg Abt I Orig Reihe C* 1981;2:33-44.
174. Fischer-Le Saut M, Vialard V, Brunel B, et al. Polyphasic classification of the genus *Photobacterium* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *abasterii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov., and *P. aerobionta* sp. nov. *Int J System Bacteriol* 1999;49:1645-1656.
175. Foberg U, Fryden A, Kihlström E, et al. *Yersinia enterocolitica* septicemia: clinical and microbiological aspects. *Scand J Infect Dis* 1986;18:269-279.
176. Frederiksen W. Come names of the species *Citrobacter koseri*, *Levineia malakotica*, and *Citrobacter diversus*; request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:107-108.
177. Freney J, Fleuret J, Gruet LD, et al. *Klebsiella trevisanii* colonization and septicemia. *Lancet* 1984;1:909.
178. Freney J, Gavini P, Alexandre H, et al. Nosocomial infection and colonization by *Klebsiella trevisanii*. *J Clin Microbiol* 1986;23:948-950.
179. Freney J, Gavini P, Plasson C, et al. Isolation of *Escherichia fergusonii* from a patient with septicemia in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1987;6:78.
180. Fuahe G, Hany A, Alwegg M. Isolation of *Escherichia fergusonii* from four different sites in a patient with pancreatic carcinoma and cholangiosepsis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2201-2203.
181. Fuahe G, Moenier D, deBernardis C, et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 1998;36:1948-1952.
182. Fuahe G, Rosner H, Rahnella aquatilis bacteremia in an HIV-infected intravenous drug abuser. *Diag Microbiol Infect Dis* 1995;22:293-296.

183. Gage KL, Dennis DT, Orloski KA, et al. Cases of cat-associated human plague in the western US, 1977-1998. *Clin Infect Dis* 2000;30:893-900.
184. Guillot O, Di Camillo P, Berche P, et al. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples. *J Clin Microbiol* 1999;37:762-765.
185. Garcia A, Fox JG. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1592-1597.
186. Gavin PJ, Warren JR, Orlas AA, et al. Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family *Stenotrophococcaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:869-874.
187. Gavini F, Izard D, Grimonot PAD, et al. Priority of *Klebsiella plautiella* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *Klebsiella previansii* Fetsugu, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc 1983. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:486-488.
188. Gavini F, Mergem J, Begi A, et al. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Bejerinck 1958) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. in *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea discoria* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:337-345.
189. Gayraud M, Scavizzi MR, Mollaret HH, et al. Antibiotic treatment of *Yersinia enterocolitica* septicemia: a retrospective review of 43 cases. *Clin Infect Dis* 1993;17:405-410.
190. Gerrard JG, McNevin S, Alfredson D, et al. *Photobacterium* species: bioluminescent bacteria as emerging human pathogens? *Emerg Infect Dis* 2003;9:251-254.
191. Giannarellou H, Antoniadou A, Kanavos K, et al. *Yersinia enterocolitica* endocarditis: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:126-130.
192. Gianfrancesco G, Pignato S, Agodi A. A simple chromogenic test for rapid screening of *Proteus* and *Providencia* bacteria. *Microbiologia* 1985;8:395-397.
193. Gint VI, Fargen JJ III, Grimonot PAD, et al. *Serratia ficaria* isolated from a human clinical specimen. *J Clin Microbiol* 1981;14:234-236.
194. Gimsberg HG, Daun RS. *Escherichia hermannii* sepsis with duodenal perforation in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:300-302.
195. Glusacm JZ, Rodensky B, Abrahamov A. Catheter-associated sepsis caused by *Serratia odorifera* biovar 1 in an adolescent patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:183-184.
196. Glynn MK, Bopp C, Dewit W, et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998;338:1333-1338.
197. Goldstein EJC, Lewis RP, Martin WJ, et al. Infections caused by *Klebsiella ozonae*: a changing disease spectrum. *J Clin Microbiol* 1978;8:413-418.
198. Goossens H, Wauters G, De Boeck M, et al. Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1984;19:940-941.
199. Goubau P, Van Aelst F, Verhaegen J, Boogaerts M. Septicemia caused by *Rahobella aquatilis* in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:697-699.
200. Graham DR, Anderson RL, Ariel FE, et al. Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates. *J Infect Dis* 1981;144:203-209.
201. Graham DR, Budd JD. *Citrobacter diversus* brain abscess and meningitis in neonates. *JAMA* 1981;245:1923-1925.
202. Granier SA, Leflon-Gaubou V, Goldstein JW, et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus 1 R PCR assay for detection of *Randallia* sp. isolates among strains identified as *Klebsiella oxytoca* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2003;41:1740-1742.
203. Granier SA, Plaisance L, Leflon-Gaubou V, et al. Recognition of two genetic groups in *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of the chromosomal beta-lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC PCR typing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:661-668.
204. Greenblatt RB, Barfield WE. Newer methods in the diagnosis and treatment of gram-negative infections. *Br J Ven Dis* 1952;28:123-128.
205. Grimonot PAD, Farmer JJ III, Grimonot F, et al. *Escherichia americana* gen. nov. sp. nov. A new *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Ann Microbiol (Paris)* 1983;134A:39-52.
206. Grimonot PAD, Grimonot F, Farmer JJ III, Aubury MA. *Cedecea davisae* gen. nov., sp. nov. and *Cedecea lapagei* sp. nov., new *Enterobacteriaceae* from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:317-326.
207. Grimonot PAD, Grimonot F, Richard C, et al. *Edwardsiella iberica* a new species of *Enterobacteriaceae*. *Curr Microbiol* 1980;4:347-351.
208. Gupta A, Fontana J, Crowe C, et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. *J Infect Dis* 2003;188:1707-1716.
209. Harvinton-Miller JMT, Shub S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:81-83.
210. Haesen DS, Jansen AE, Nijssens-Lauritsen N, et al. Direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI+GNS-GA). *Clin Microbiol Infect* 2002;8:38-44.
211. Hansen MW, Chłapczyński GY. Isolation of an unusual *Cedecea* species from a cutaneous ulcer. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:152-153.
212. Harrell LA, Cameron ML, O'Hara CM. *Rahobella aquatilis* an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989;27:1671-1672.
213. Hasbun L, Moore ERB, Vanam L, et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* System Appl Microbiol 1998;21:384-397.
214. Hawke JP, McWhorter AC, Steigerwalt AG, et al. *Edwardsiella iberica* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:396-400.
215. Head CB, Whitney DA, Raman S. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1982;16:615-621.
216. Heizmann WR, Michel R. Isolation of *Escherichia americana* from a patient with conjunctivitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:957-959.
217. Hengstler KA, Hamman R, Fahr A-M. Evaluation of BBL CHROMagar Orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2773-2777.
218. Hevelink AE, van Heerwaarden C, Zwankuis-Nabais JT, et al. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect* 2002;129:295-302.
219. Hickman FW, Steigerwalt AG, Farmer JJ III, Brenner DJ. Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 3. *J Clin Microbiol* 1982;15:1097-1102.
220. Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III, Steigerwalt AG, et al. *Providencia rustigianii*, a new species in the family *Enterobacteriaceae* formerly known as *Providencia citrifaciens* biogroup 3. *J Clin Microbiol* 1983;17:1057-1060.
221. Hickman-Brenner FW, Huntley-Carter GP, Farmer JR, et al. *Koserella trabulsi*, a new genus and species of *Enterobacteriaceae* formerly known as enteric group 45. *J Clin Microbiol* 1985;21:39-42.
222. Hickman-Brenner FW, Huntley-Carter GP, Saitoh Y, et al. *Moeilarella wisconsinensis*, a new genus and species of *Enterobacteriaceae* found in human stool specimens. *J Clin Microbiol* 1984;19:460-463.
223. Hickman-Brenner FW, Vohra MP, Huntley-Carter GP, et al. *Leminorella*, a new genus of *Enterobacteriaceae*: identification of *Leminorella grimaldi* sp. nov. and *Leminorella richardii* sp. nov. found in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;21:234-239.
224. Hodges GR, Degener CE, Barnes WG. Clinical significance of *Citrobacter* isolates. *Am J Clin Pathol* 1978;70:37-40.
225. Hollis DG, Hickman FW, Fanning GR, et al. *Tetanolella pharyngis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981;14:79-88.
226. Hollines B, Cotas M, Ganner M, et al. Evaluation of Biotec system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. *J Clin Microbiol* 1994;32:1970-1975.
227. Holt-Harris JE, Teague O. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. *J Infect Dis* 1916;18:596-600.
228. Hoppe JE, Henner M, Aleksee S, et al. Catheter-related *Rahobella aquatilis* bacteremia in a pediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Microbiol* 1993;31:1911-1912.
229. Horii T, Suzuki Y, Kimura T. A intravenous catheter-related septic shock caused by *Sophylococcus aceti* and *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* 2001;33:930-932.
- 229a. Hornaarche E, Edwards PR. Proposal for the rejection of the generic name *Cloaca* Casellani and Chalmers, and proposal of *Enterobacter* as a generic name with designation of type species and of its type species and of its type culture, with request for an opinion. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 1960;10:75-76.
230. Horowitz HW, Nadelman RB, Van Horn KG, et al. *Serratia pharyngitis* sepsis associated with infection of central venous catheter. *J Clin Microbiol* 1987;25:1562-1563.
231. Houang ETS, Tan PC, Lai SL, et al. The use of CHROMagar Orientation as a primary isolation medium with presumptive identification for the routine screening of urine specimens. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1999;107:859-862.
232. Huber TW, Thomas JS. Detection of resistance due to inducible β -lactamase in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2481-2486.
233. Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swing J. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:807-810.
234. Inoue K, Miki K, Tanura K, et al. Evaluation of L-pyrrolidonyl peptidase paper strip test for differentiation of members of the family *Enterobacteriaceae*, particularly *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* 1996;34:1811-1812.
235. Inoue K, Sugiyama K, Kosako Y, et al. *Enterobacter cowanii* sp. nov., a new species of the family *Enterobacteriaceae*. *Curr Microbiol* 2000;41:417-420.
236. Izard D, Ferragut C, Gavini F, et al. *Klebsiella ferruginea*, a new species from soil and water. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:116-127.
237. Izard D, Gavini F, Trinel PA, Leclerc H. *Rahobella aquatilis*, nouveau membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. *Ann Microbiol* 1979;130A:163-177.
238. Izard D, Gavini F, Trinel PA, Leclerc H. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:35-42.
239. Jacobs J, Janssen D, Vandeven J, et al. *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. *J Clin Microbiol* 1989;27:1119-1121.
240. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996;34:908-911.
241. Jan D, Bertie C, Babin G. Fatal posttransfusion *Enterobacter amnigenus* septicemia. *Presse Med* 1999;28:965.
242. Janda JM, Abbott SL. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella iberica* in human disease. *Clin Infect Dis* 1993;17:742-748.
243. Janda JM, Abbott SL. Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella iberica*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;111:275-280.
244. Janda JM, Abbott SL. The *Enterobacteriaceae*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.
245. Janda JM, Abbott SL, Albert MJ. Prototypal diarrhoeagenic strains of *Hoplia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2399-2401.
246. Janda JM, Abbott SL, Cheung WKW, et al. Biochemical identification of *citrobacter* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1850-1854.
247. Janda JM, Abbott SL, Woodward D, et al. Invasion of Hep-2 and other eukaryotic cell lines by *Providencia*: further evidence supporting the role of *Providencia* *alcaliflavescens* in bacterial gastroenteritis. *Curr Microbiol* 1998;37:159-165.

248. Janda WM, Hellerman DV, Zeiger B, et al. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* from a congenital abscess. *Am J Clin Pathol* 1985;83:655-657.
249. Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-878.
250. Jensen KT, Frederiksen W, Hickman-Brenner FW, et al. Recognition of *Morganella* subspecies, with proposal of *Morganella morganii* subsp. *morganii* subsp. nov. and *Morganella morganii* subsp. *sibirica* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992;2:613-620.
251. Jensen N, Vareis P, Whitfield PB. Formation of galactol in chocolate milk by milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. *Leti Appl Microbiol* 2001;33:339-343.
252. Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non O157:H7 serotypes on verocytogenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1996;59:1112-1122.
253. Jøker RN, Nørholm T, Siboni KE. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Dan Med Bull* 1965;12:128-130.
254. Kaper JB, O'Brien AD, eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington DC: ASM Press, 1998.
255. Karch H, Janetzki-Miesness C, Alekso S, Datz M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 1996;34:516-519.
256. Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxic complication of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 2004;189:353-359.
257. Karmali MA, Steele BT, Pettit M, et al. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* 1983;1:619-620.
258. Karl C, Bibashi E, Kokolova E, et al. Case of peritonitis caused by *Erwinella americana* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1999;37:3733-3734.
259. Kehl KS, Haines P, Behrke CE, Acheson DWK. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2051-2054.
260. Kehl SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:2711-2715.
261. Kelly ME, Leicester C. Evaluation of the Ausimex Walkaway system for rapid identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1992;30:1568-1571.
262. Keren DF, Rawlings W, Murray HW, Leonard WR. *Arizona histolytica* osteomyelitis with antecedent enteric fever and sepsis. *Am J Med* 1976;60:577-582.
263. Kharsany ABM, Hoosen AA, Kiepiela P, et al. Phylogenetic analysis of *Corynebacterium granulomatis* based on 16S rRNA gene sequences. *J Med Microbiol* 1999;43:841-847.
264. Kharsany ABM, Hoosen AA, Kiepiela P, et al. Growth and cultural characteristics of *Corynebacterium granulomatis*: the aetiological agent of granuloma inguinale (Donovanosis). *J Med Microbiol* 1997;46:579-583.
265. Kilian M, Bulow P. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidase. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 1976;84:245-251.
266. Kilian M, Bulow P. Rapid identification of *Enterobacteriaceae*. II. Use of a beta-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 1979;87:271-276.
267. Kimmitt PT, Hatwood CR, Bauer MR. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 2000;6:458-465.
268. King BM, Allen DL. A previously unclassified group of *Enterobacteriaceae*. *Am J Clin Pathol* 1964;41:210-212.
269. King S, Metzger WL. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. *Appl Microbiol* 1968;16:577-578.
270. Kircher SM, Cotic RJ, Dick NK, Seip WF. CO₂ incubation of MacConkey agar (MacConkey III). *Abstr Ann Meet Am Soc Microbiol* 2000;C274:194.
271. Kitch TT, Jacobs MR, Appelhans PC. Evaluation of RapID ONE system for identification of 379 strains in the family *Enterobacteriaceae* and oxidase-negative, gram-negative nonfermenters. *J Clin Microbiol* 1994;32:931-934.
272. Kleiman MB, Allen SD, Neal P, Reynolds J. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1981;14:352-354.
273. Kline MW. *Citrobacter meningitis* and brain abscess in infancy: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Pediatr* 1988;113:430-434.
274. Kline MW, Mason EO, Kaplan SL. Characterization of *Citrobacter diversus* strains causing neonatal meningitis. *J Infect Dis* 1988;157:101-105.
275. Kosako Y, Sakazaki R. Priority of *Yersinia nishinurgeti* Kosako, Sakazaki, and Yoshizaki 1985 over *Yersinia nishinurgeti* Hickman-Brenner, Huxley-Carter, Brenner, and Farmer 1985. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:171.
276. Kosako Y, Tazuma K, Sakazaki R, et al. *Enterobacter lobei* sp. nov., a new species of the family *Enterobacteriaceae* resembling *Enterobacter cloacae*. *Curr Microbiol* 1996;33:261-265.
277. Kosako Y, Sakazaki R, Yoshizaki E. *Islandella regensburgi* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family *Enterobacteriaceae*. *Jpn J Med Sci Biol* 1984;37:117-124.
- 277a. Koser SA. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol* 1923;8:493-520.
278. Kraiden S, Fiksa M, Petrea C, et al. Expanded clinical spectrum of infections caused by *Proteus penneri*. *J Clin Microbiol* 1987;25:578-579.
279. Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infection among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:113-122.
280. Lee LA, Gerber AR, Lonsway DK, et al. *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the homebased preparation of chitterlings. *N Engl J Med* 1990;322:984-987.
281. Lee LA, Taylor J, Carter GP, et al. *Yersinia enterocolitica* O:3: an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1991;163:600-603.
282. Le Minor L, Popoff MY. Request for an opinion: designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:465-468.
283. Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, et al. Individualization d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1986;137B:211-217.
284. Le Minor L, Véron M, Popoff M. Taxonomie des *Salmonella*. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 1982;131D:223-243.
285. Levine WN, Goldberg MJ. *Escherichia vulneris* osteomyelitis of the tibia caused by a wooden foreign body. *Orthop Rev* 1994;23:262-265.
286. Levy RL, Saunders RL. *Citrobacter meningitis* and cerebral abscess in early infancy: cure by meniscectomy. *Neurology* 1981;31:1575-1577.
287. Linde HJ, Neubauer H, Meyer H, et al. Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card. *J Clin Microbiol* 1999;37:211-214.
288. Ling TKW, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:4705-4707.
289. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, et al. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:2964-2966.
290. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-584.
291. Ljunghberg P, Valones M, Hajjeh VR, et al. Report of four cases of *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:804-810.
292. Loughran CA, West DC. Isolation of *Lactococcus adenohyalos* from an infant with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Infect Dis* 2001;32:1639.
293. Ludwig K, Bitzan M, Zimmermann S, et al. Immune response to non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1996;174:1028-1039.
294. Lund ME, Mason JM, Blazevic DJ. Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H/S-negative *Citrobacter*. *Appl Microbiol* 1974;28:22-25.
295. Lupercio SA, Newman JV, Dangler CA, et al. *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1343-1350.
296. Lunell JE, Karmali MA, Soto-Hernandez JL, Verghese A. *Klebsiella* species soft tissue infection: case report and review. *J Clin Microbiol* 1988;26:2650-2651.
297. MacConkey A. Lactose-fermenting bacteria in feces. *J Hyg* 1905;3:333-378.
298. MacFaddin JE. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
299. Mackenzie AMR, Lebel P, Oubine E, et al. Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1608-1611.
300. Maddocks S, Olm T, Chen S. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and xylose-lysine-desoxycholate and *Salmonella-Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:2999-3003.
301. Maertens J, Delforge M, Vandenberghe P, et al. Catheter-related bacteremia due to *Erwinella americana*. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:103-104.
302. Mahajan RK, Khan SA, Chandel DS, et al. Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. *J Clin Microbiol* 2003;41:3830-3832.
303. Maki DG, Rhame FS, Mackel DC, et al. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: epidemiologic and clinical features. *Am J Med* 1976;60:471-485.
304. Mangum ME, Radtch D. *Cedreva* species: unusual clinical isolate. *Clin Microbiol Newsltr* 1982;4:117-119.
305. Maraki S, Samonis G, Marmelakis E, Tselentis Y. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2706-2708.
306. March SB, Rannam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986;23:869-872.
307. Marsh PK, Gorbach SL. Invasive enterocolitis caused by *Edwardsiella ictus*. *Gastroenterology* 1982;82:336-338.
308. Mastromanni A, Coronado O, Chiedo F. *Morganella morganii* meningitis in a patient with AIDS. *J Infect* 1994;29:356-357.
309. Mazzyer MA, Omega S, Doleans F, et al. Evaluation of CPS ID2 medium for detection of urinary tract bacterial isolates in specimens from a rehabilitation center. *J Clin Microbiol* 1995;33:1025-1027.
310. Mazzanti A, Zuliani J, Fontana R, et al. Isolation from blood culture of a *Lactococcus adenohyalos* strain producing an SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2003;41:1738-1739.
311. McNeil MM, Davi RJ, Anderson RL, et al. Plasmids of *Erwinella americana*: supplementary epidemiologic marker in an outbreak of pseudobacteremia. *J Clin Microbiol* 1987;25:501-503.

312. McNeill MM, Davis BJ, Anderson RL, et al. Mechanism of cross-contamination of blood culture bottles in outbreaks of pseudobacteremia associated with non-sterile blood collection tubes. *J Clin Microbiol* 1985;22:23-25.
313. McNeill MM, Davis BJ, Solomon SL, et al. *Escherichia overiformis* recurrent pseudobacteremia from a persistent environmental reservoir. *J Clin Microbiol* 1987;25:498-500.
314. McWhorter AC, Hasklock RL, Neoon FA, et al. *Thalassidroma paumotuensis*, a new genus and specie of the Family Enterobacteriaceae that resembles *Salmonella* subgroups 4 and 5. *J Clin Microbiol* 1991;29:1480-1485.
315. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 Lancet 1998;352:1207-1212.
316. Mead PS, Slutsker L, Diet V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607-625.
317. Merlino J, Siarakas S, Robertson GL, et al. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1996;34:1788-1793.
318. Mermel LA, Spiegel CA. Nosocomial sepsis due to *Serratia odorifera* biovar 1. *Clin Infect Dis* 1992;14:208-210.
319. Mermim J, Huwagner L, Vajla D, et al. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. *Clin Infect Dis* 2004;38(Suppl): S251-S261.
320. Meschick B, Lonsway DR, Carter GP, et al. *Yersinia enterocolitica*: a frequent seasonal stool isolate from children at an urban hospital in the southeast United States. *J Clin Microbiol* 1991;29:2868-2869.
321. Meyer KS, Urban C, Eagan JA, et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to lase-generation cephalosporins. *Appl Infect Med* 1993;119:353-358.
322. Meyer-Brosch S, Bastian SN, Arze PD, et al. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* 2001;203:347-361.
323. Miedouge M, Hucini J, Grignon F, Watine J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* urinary tract infection associated with hemolytic-uremic syndrome in an adult and possible adverse effect of ofloxacin therapy. *Clin Infect Dis* 2000;30:395-396.
324. Miller JM, Alschi P. Evaluation of new computer-enhanced identification program for microorganisms: adaption of BioBASE for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1996;34:179-181.
325. Miller JM, Rhodes DL. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *J Clin Microbiol* 1991;29:1143-1147.
326. Miller RG, Tate CRM, Mallinson ET. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poultry Sci* 1991;70:2429-2432. (Erratum, *Poultry Sci* 1992;71:398.)
327. Mobile-Boelani JC, Farrar JA, Werner SB, et al. *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann Intern Med* 2001;135:239-247.
328. Möller V. Simplified test for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1955;36:158-172.
329. Monney I, Freydisse AM, Baron C, et al. Evaluation of two new chromogenic media for detection of *Salmonella* in stools. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:257-261.
330. Mori M, Ohta M, Agata N, et al. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Immunol* 1989;33:887-895.
331. Moss NS, Wilder D, Combs D, et al. Evaluation of the Vitek GNI + Card. *Abstr Annu Meet Am St Microbiol* 1996;C389.
332. Mulczyk M, Szwczak A. Pyroglutaminyl peptidase in bacteria: a new colorimetric test for differentiation of *Enterobacteriaceae*. *J Gen Microbiol* 1970;61:9-13.
333. Müller HE, Bremer DJ, Fanning GR, et al. Extended description of *Burkholderia* species with recognition of six new species of *Burkholderia* and two new species of *Klebsiella*: *Burkholderia ferruginea* sp. nov., *Burkholderia graminis* sp. nov., *Burkholderia brassicae* sp. nov., *Burkholderia izandii* sp. nov., *Burkholderia noackiae* sp. nov., *Burkholderia warmbahiae* sp. nov., *Klebsiella cocchioides* sp. nov., and *Klebsiella georgiana* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:50-63.
334. Müller HE, O'Hara CM, Fanning GR, et al. *Providencia heidelberg* a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:252-256.
335. Murphy TV, Nelson JD. *Shigella boydii*: report of 38 patients and review of the literature. *Pediatrics* 1979;63:511-516.
336. Muytjens HL, Zaen HC, Sanderkamp HU, et al. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1983;18:115-120.
337. Nauder HL, Dolan C, Mele L, et al. Accuracy and reproducibility of the AutoMicrobic system gram-negative general susceptibility-plus card for testing selected challenge organisms. *J Clin Microbiol* 1985;22:355-360.
338. Nabel B, Raul JR. Choleic prostatitis due to *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:856.
339. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:142-201.
340. Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 1998;4:251-261.
341. Nazarowc-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol* 1997;34:103-114.
342. NCCLS. Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast: Approved Guideline. NCCLS document M15-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
343. Nettles RE, Sexton DJ. Successful treatment of *Edwardiella ictala* prosthetic valve endocarditis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1997;25:918-919.
344. Neubauer H, Aleksie S, Hensel A, et al. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belonging to the same serogroup but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* 2000;290:61-64.
345. Neubauer H, Sauer T, Becker H, et al. Comparison of system for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3366-3368.
346. Nowicki TJ, Daly JA, Motiue SL, Curral KC. Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2000;38:547-551.
347. Nowogiesic E, Fyfe M, Hockin J, et al. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* in British Columbia-November 1998. *Can Commun Dis Rep* 1999;25:97-100.
- 347a. Nunez ML, Diaz J, Lorente L, et al. Evaluation of CPS ID2 medium for diagnosis of urinary infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1111-1113.
348. Nunez JP, Niskanen T, Hallanvuo S, et al. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *J Infect Dis* 2004;189:766-774.
349. Nye KJ, Fallon D, Froelich D, et al. An evaluation of the performance of XLD,DCA, MLCB, and ABC agars a direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from feces. *J Clin Pathol* 2002;55:286-288.
350. Ochou TJ, Cleary TD. Epidemiology and sepsis of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:259-263.
351. O'Farrell N, Donovanosis. *Sex Transm Infect* 2002;78:452-457.
352. O'Farrell N, Hosen AA, Cohetes K, et al. A rapid stain for the diagnosis of granuloma inguinale. *Gonorrhea Med* 1990;66:200-201.
353. Olshausen JH, Fourcade N, Prolet B, et al. A propos d'une infection ventriculaire par *Moraxella wisconsinensis*. *Med Maladies Infect* 1987;6:414-416.
354. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:534-546.
355. O'Hara CM, Brenner FW, Seigerwald AG, et al. Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., non. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5, and 6. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1869-1875.
356. O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the autoSCAN-W/A system for rapid (2-hour) identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1992;30:1511-1513.
357. O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI + card. *J Clin Microbiol* 2003;41:2096-2101.
358. O'Hara CM, Rotman SB, Miller JM. Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of *Citrobacter*. *J Clin Microbiol* 1995;33:242-245.
359. O'Hara CM, Seigerwald AG, Farmer JJ, et al. Proposed reclassification of CDC enteric group 49 is *Enterobacter kobei*. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 2001;C435:252.
360. O'Hara CM, Seigerwald AG, Farmer JJ, et al. Isolation of *Providencia heidelberg* from human feces. *J Clin Microbiol* 1999;37:3048-3050.
361. O'Hara CM, Seigerwald AG, Hill BC, et al. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. *J Clin Microbiol* 1999;37:2046-2049.
362. O'Hara CM, Seigerwald AG, Hill BC, Miller JM, et al. First report of a human isolate of *Erwinia persicina*. *J Clin Microbiol* 1998;36:21-22 of a human isolate of *Erwinia persicina*. *J Clin Microbiol* 1998;36:246-250.
363. O'Hara CM, Seward CD, Wight JL, et al. Isolates of *Enterobacter intermedium* from the gallbladder of a patient with cholecystitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:3035-3036.
364. O'Hara CM, Tenover FC, Miller JM. Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan WalkAway Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/ENF for identification of members of the family Enterobacteriaceae and confirmation gram-negative non-glucose-fermenting bacilli. *J Clin Microbiol* 1993;31:3165-3169.
365. O'Hara CM, Webber GL, Miller JM. Evaluation of Vitek GNI + and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal ENF identification systems for identification of members of the family of members of the family Enterobacteriaceae and other gram-negative, glucose-fermenting and non-glucose-fermenting bacilli. *J Clin Microbiol* 1997;35:3269-3273.
366. Okamura K. Ono-effective and rapid presumptive identification of gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROM-Magar Orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. *J Clin Microbiol* 2000;38:4586-4592.
367. Okurel AJC, Rose BE, Luluada CP. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* 1990;53:941-943.
368. Olsen SJ, Miller G, Keillady N, et al. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis* 2002;8:370-375.
369. Olsson M, Syk A, Wollan R. Identification of salmonellae with the 4-methylumbelliferyl capillare fluorescence test. *J Clin Microbiol* 1991;29:2631-2632.
370. Olvik O, Sorum H, Birkness K, et al. Plasmid characterization of *Salmonella typhimurium* transmitted from animals to human. *J Clin Microbiol* 1985;22:330-338.
371. Quani E, Breckner DA. *Leclercia adevarchylus* isolated from a blood culture. *Clin Microbiol Newslett* 1991;13:157-158.
372. Pabst WL, Altwegg M, Kind C, et al. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2003;41:2289-2293.
373. Pai CH, Gallis E, Tuomanen E, et al. Placebo-controlled double-blind evaluation of trimethoprim-sulfamethoxazole treatment of *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis. *J Pediatr* 1984;104:308-311.
374. Pai CH, Sarger S, Laflair L, et al. Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools. *J Clin Microbiol* 1979;9:712-715.

375. Papasian CJ, Dana-Killer S, Gurison B. Symptomatic *Shigella sonnei* urinary tract infection. J Clin Microbiol 1995;33:2222-2223.
376. Park CH, Vandel NM, Hixon DL. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. J Clin Microbiol 1996;34:988-990.
377. Parry MF, Hutchinson JH, Brown NA, et al. Nosocomial *Enterobacter meningitis*, risk factors, management, and treatment outcomes. Clin Infect Dis 2003;37:159-166.
378. Parry MF, Hutchinson JH, Brown NA, et al. Gram-negative sepsis in neonates: a nursery outbreak due to hand carriage of *Citrobacter diversus*. Pediatrics 1980;66:1105-1109.
379. Paton AW, Paton JC. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 1996;34:463-465.
380. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 1988;1:450-479.
381. Patrick ME, Adcock PM, Gomez TM, et al. *Salmonella enteritidis* infections, United States, 1995-1999. Emerg Infect Dis 2004;10:1-7.
382. Peel MM, Alfredson DA, Germond IG, et al. Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photobacterium damselae* from infected humans in Australia. J Clin Microbiol 1999;37:3647-3653.
383. Penner JL, Ghis XJ. *Providencia* Ewing 1962, W&L. In: Kneg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:494-496.
384. Penner JL. International Committee on Systematic Bacteriology Taxonomic Subcommittee on *Enterobacteriaceae*. Int J Syst Bacteriol 1988;38:223-224.
385. Perez JM, Canali P, Rume C, et al. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. J Clin Microbiol 2003;41:1130-1134.
386. Perkins SR, Becken TA, Bump CM. *Citrobacter diversus* bacteremia. J Clin Microbiol 1986;24:675-676.
387. Perry JD, Ford M, Taylor J, et al. ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol 1999;37:766-768.
388. Perry JD, Riley G, Gould FK, et al. Alafosfalin a selective agent for the isolation of *Salmonella* from clinical specimen. J Clin Microbiol 2002;40:3913-3916.
389. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*: etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 1997;10:35-66.
390. Pfaffer MA, Sahm D, O'Hara C, et al. Comparison of the AutoSCAN-W/A rapid bacterial identification system and the Vitek AutoMicrobic System for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1991;29:1422-1428.
391. Pflieger GE. *Serratia fonticola* as an infectious agent. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:199-200.
392. Pien FD, Bruce AE. *Ewingella americana* bacteremia in an intensive care unit. Arch Intern Med 1986;116:111-112.
393. Pien FD, Farmer JJ III, Weaver RE. Polymicrobial bacteremia caused by *Ewingella americana* (family *Enterobacteriaceae*) and an unusual *Pseudomonas* species. J Clin Microbiol 1983;18:727-729.
394. Pien FD, Shram S, Svenson JM, et al. Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hemmatis*. J Clin Microbiol 1985;22:283-285.
395. Pignato S, Giurumano G, Giurumano C. Rambach agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subspecies I-VI. J Med Microbiol 1995;43:68-71.
396. Podschun R. Isolation of *Klebsiella terrigena* from human feces: biochemical reactions, capsule types, and antibiotic sensitivity. Zentralbl Bakteriol 1991;275:73-78.
397. Podschun R, Acklen U, Ojpari J, et al. Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward. J Clin Microbiol 1998;36:2331-2332.
398. Podschun R, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:349-352.
399. Podschun R, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. Med Microbiol Lett 1994;3:90-95.
400. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11:589-603.
401. Poisson DM. Novobiocin, brilliant green, glycerol, lactose agar: new medium for the isolation of *Salmonella* strains. Res Microbiol 1992;143:211-216.
402. Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2000;151:63-65.
403. Popoff MY, Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovar. 7th Rev. Paris: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Pasteur Institute, 1997.
404. Potts C. Prairie dogs plagued by *Yersinia pestis*. ASM Newslett 2000;66:718-719.
405. Prats G, Richard C, Mirelis B, Lopez P. Human isolates of *Enterobacter intermedium*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1987;366:432-434.
406. President's Council on Food Safety. Egg safety from production to consumption: an action plan to eliminate *Salmonella enteritidis* illness due to eggs. Washington, DC: President's Council on Food Safety, 1999.
407. Priest FG, Somerville EJ, Cole JA, et al. The taxonomic position of *Ochrobacterium proteus*, a common brewery contaminant. J Gen Microbiol 1973;75:295-307.
408. Qadri SMH, Zubairi S, Hawley HP, et al. Simple spot test for rapid detection of urease activity. J Clin Microbiol 1984;20:1198-1199.
409. Rabinsky-Ehr T, Dingman D, Marcus R, et al. Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection Connecticut. Emerg Infect Dis 2002;8:525-527.
410. Raj P. Pathogenic and laboratory diagnosis of *Escherichia coli*-associated enteritis. Clin Microbiol Newslett 1993;15:89-93.
411. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol 1990;6:301-303.
412. Ramam S. Etiologic role of *Hafnia alvei* in human diarrheal illness. Infect Immun 1991;59:4744-4745.
413. Ramam S, Butler RW, March S, et al. *Enterobacter hafniae*-associated gastroenteritis-Newfoundland. Can Dis Wkly Rep 1979;5:231-232.
414. Reeves MW, Evans GM, Heiba AA, et al. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J Clin Microbiol 1989;27:313-320.
415. Reina J, Alomar P. *Enterobacter agalae* wound infection. Clin Microbiol Newslett 1989;11:134-135.
416. Reina J, Borell N, Ljungqvist I. Community-acquired bacteremia caused by *Serratia plymorum*: case report and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis 1992;15:449-452.
417. Reina J, Hervás J, Benelli N. Acute gastroenteritis caused by *Hafnia alvei* in children. Clin Infect Dis 1993;16:443.
418. Reina J, Salva F, Gil J, Alomar P. Urinary tract infection caused by *Enterobacter agalae*. J Clin Microbiol 1989;27:2877.
419. Reiner BS, Austin EF. Evaluation of CPS ID 2 chromogenic agar a single medium for urine culture. Diagn Microbiol Infect Dis 1997;28:113-117.
420. Reynolds HY. Pneumonia due to *Klebsiella* (Friedlander's pneumonia). In: Wyngaarden JB, Smith LH, eds. Cecil Textbook of Medicine. 16th ed. Philadelphia: Saunders, 1982:1436-1437.
421. Rhoads S, Marinelli L, Imperatore CA, Nachamkin I. Comparison of MicroScan WalkAway system and Vitek system for identification of gram-negative bacteria. J Clin Microbiol 1993;33:3044-3046.
422. Rhoads DL, Smith PB, Baker CN, et al. AutoSCAN-4 system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1985;22:915-918.
423. Richard C. Nouvelles *Enterobacteriaceae* nosocomiales en bactériologie médicale: *Moraxella morganii*, *Kansella melaleuca*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asburiae*, *Salmonella agona*. Ann Biol Clin 1989;17:231-236.
424. Richens J. The diagnosis and treatment of diphtheria (granuloma inguinale). Genitourin Med 1991;67:441-452.
425. Ridell J, Sisson A, Paulin L, et al. *Hafnia alvei* in stool specimens from patients with diarrhea and healthy controls. J Clin Microbiol 1994;32:2335-2337.
426. Riley LW, Ris RS, Helgeson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983;308:681-685.
427. Robinson A, McCarter YS, Tettenli J. Comparison of Crystal enteric/normofermenter system, API 20E system, and Vitek antimicrobial system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1995;33:364-370.
428. Robinson EM, Klevjer-Anderson E, Smith CA, et al. *Enterobacter agalae*, a new opportunistic pathogen: report of four cases. J Clin Microbiol 1993;31:249-254.
429. Ruiz J, Nunez M-L, Diaz J, et al. Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. J Clin Microbiol 1996;34:686-688.
430. Ruiz J, Nunez M-L, Sempere MA, Diaz J, Gomez J. Systemic infections in three infants due to a lactose-fermenting strain of *Salmonella* *virchow*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:454-456.
431. Ruiz J, Sempere MA, Varela MC, Gomez J. Modification of the methodology of stool culture for *Salmonella* detection. J Clin Microbiol 1992;30:525-526.
432. Ruiz J, Varela MC, Sempere MA, et al. Presumptive identification of *Salmonella enterica* using two rapid tests. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991;10:649-651.
433. Sakazaki R, Muen Y. The new group of *Enterobacteriaceae*: the Asakusa group. Jpn J Bacteriol 1963;17:616-617.
434. Samra Z, Heifetz M, Talpor J, et al. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. J Clin Microbiol 1998;36:990-994.
435. Sanders CC, Muelker RC Jr, Martin RR, et al. Resistance to cefamandole: a collaborative study of emerging clinical problems. J Infect Dis 1982;145:118-125.
436. Sanders CC, Sanders WE, Jr. Emergence of resistance during drug therapy with newer beta lactam antibiotics: role of inducible beta lactamases and implications for the future. Rev Infect Dis 1983;5:639-648.
437. Sauter RL, Matsumi JH, Legaspi RC. *Serratia marcescens* meningitis associated with a contaminated benzalkonium chloride solution. Infect Control 1984;5:223-225.
438. Scarpato C, Piccoli R, Ricordi P, et al. Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:283-289.
439. Scavizzi MR, Gayraud M, Houtstein MJ, et al. In-vitro and in-vivo activities of antibiotics of *Yersinia enterocolitica*. J Antimicrob Chemother 1996;38:1108-1109.
440. Schauer DH, Zabel BA, Pedraza IF, et al. Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. J Clin Microbiol 1995;33:2064-2068.
441. Schieven BC. Evaluation of Rainbow UTI system for rapid isolation and identification of urinary pathogens. Abstr Ann Meet Am Soc Microbiol 1995;C373-65.
442. Schieven BC, Hunsain Z, Lammigan R. Comparison of American MicroScan dry frozen microdilution trays. J Clin Microbiol 1985;22:493-496.
443. Schreibeider HC, Jensen KT, Frederiksen W. Taxonomic notes: synonymy of *Enterobacter cancerogenus* (Draesevic 1960) Dickey and Zimmell 1988 and *Enterobacter agalae* Farmer, et al. 1985, and resolution of an ambiguity in the biochemical profile. Int J Syst Bacteriol 1994;44:586-587.
444. Schreckenberger PC, Blazevic DJ. Rapid methods for biochemical testing of anaerobic bacteria. Appl Microbiol 1974;28:759-762.
445. Schreckenberger P, Molero M, Held N. Evaluation of the Rapid E-Plus Panel for Identification of *Enterobacteriaceae*. Abstr Ann Meet Am Soc Microbiol 1993;C309-900.
446. Sharma NK, Doyle PW, Gerbasi SA, Jessop JE. Identification of *Yersinia* species by the API 20E. J Clin Microbiol 1990;28:1443-1444.

447. Siegler RL. Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *JAMA* 2003;290:1379-1381.
448. Sierra-Madero J, Pratt K, Hall GS, et al. *Klebsiella mediasiensis* following open-heart surgery: a case report. *J Clin Microbiol* 1990;28:2848-2849.
449. Silverblatt FJ, Weinstein R. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease 2nd Ed. New York: Wiley, 1985;226-236.
450. Simmons JS. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J Infect Dis* 1926;39:209-214.
451. Slaven EM, Lopez FA, Hart SM, Sanders CV. Myonecrosis caused by *Edwardsiella iberda*: a case report and case series of extraintestinal *E. iberda* infections. *Clin Infect Dis* 2001;32:1430-1433.
452. Smith FB. Performance of Six Bacterial Identification Systems. Atlanta: Centers of Sex Disease Control, Bacteriology, Division, 1975.
453. Smith RD, McNamara JJ, Ladd M. *Shigella* and child abuse. *Pediatrics* 1986;78:953-954.
454. Sögaard P, Kjærgaard P. Two isolations of enteric group 69 from human clinical specimens. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1986;94:363-367.
455. Spaulding AC, Rothman AL. *Escherichia vulneris* as a cause of intravenous catheter-related bacteremia. *Clin Infect Dis* 1996;22:728-729.
456. Stager CE, Davis JR. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:302-327.
457. Stanek JL, Vincellette J, Lanothe F, et al. Evaluation of the sensitive system for identification of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1983;17:647-654.
458. Stapp JR, Jelacic S, Yea Y-L, et al. Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 antigen detection in stool and broth cultures to that in sorbitol-MacConkey agar test cultures. *J Clin Microbiol* 2000;38:3404-3406.
459. Starr M, Bennett-Wood V, Dighean AK, et al. Hemolytic-uremic syndrome following urinary tract infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* case report and review. *Clin Infect Dis* 1998;27:310-315.
460. Stefaniuk E, Baranik A, Grzadzinski M, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:479-485.
461. Stenhouse MAE, Milner LV. *Klebsiella enterocolitica*: a hazard in blood transfusion. *Transfusion* 1982;22:396-398.
462. Stewart JM, Quirk JR. Community-acquired pneumonia caused by *Enterobacter aerogenes*. *Am J Med* 2001;111:82-83.
463. Stock I, Falken E, Wiedemann B. *Moraxella viscometensis*: identification, natural antibiotic susceptibility and its dependency on the medium applied. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:1-11.
464. Stratton CW. An overview of plague: pathogenesis and clinical manifestations. *Antimicrob Infect Dis* Newton 1997;16:49-51.
465. Strobel E, Heesemann J, Mayer G. Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis. *J Clin Microbiol* 2000;38:2738-2790.
466. Suira L, Chasten R, Bollet C, et al. *Serratia erythraea* gen. nov., sp. nov., isolated from back necrotic lesions of plantpathogenic *Enterobacteriaceae* by phenotype features. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1291-1304.
467. Tanaka K, Sakazaki R, Kosako Y, Yoshizaki E. *Leclercia adecarboxylata* gen. nov., comb. nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. *Curr Microbiol* 1986;13:179-184.
468. Tan SC, Wong YH, Jegathesan M, et al. The first isolate of *Takumella ptyseos* in Malaysia. *Malays J Pathol* 1989;11:25-27.
469. Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 1995;20:1-10.
470. Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, et al. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* 1987;1:1129-1132.
471. Taylor WT. Isolation of *Shigella* 1: Xylose lysine agar: new media for isolation of enteric pathogens. *Am J Clin Pathol* 1963;44:471-475.
472. Taylor WT, Achtarian D. Carboxyl test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl Microbiol* 1972;24:58-61.
473. Temesgen Z, Teal DR, Cockrell FR III. *Leclercia adecarboxylata* infections: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:79-81.
474. Terri R, Vuersto R, Mikkola P, et al. Clinical manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1989;8:587-591.
475. Thaller R, Bertoni F, Thaller MC. A *Klebsiella cryomicroscopica* strain from a gallbladder infection. *Eur J Epidemiol* 1988;4:124-126.
476. Thompson JS, Hodge DS, Brnczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 1998;36:2165-2168.
477. Thorpe CM, Acheson DWK. Testing of urinary *Escherichia coli* isolates for Shiga toxin production. *Clin Infect Dis* 2001;32:1517-1518.
478. Tipples MA, Bland LA, Murphy JJ, et al. Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion* 1990;10:207-213.
479. Tristram DA, Forbes BA. *Klebsiella*: a case report of urinary tract infection and sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:297-298.
480. Urményi AMC, White-Franklin A. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961;1:313-315.
481. Ursing J, Brenner DJ, Broutier JL, et al. *Yersinia frederiksenii*, a new species of *Enterobacteriaceae* composed of thermotolerant strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr Microbiol* 1980;1:213-217.
482. Ursus PR, Unzuaga MJ, Melero P, et al. *Serratia rubida* as an invasive pathogen. *J Clin Microbiol* 1996;34:216-217.
483. Van Acker J, De Smet F, Maykens G, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakagutii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* 2001;39:293-297.
484. Vandepitte J, Lennens P, De Sover L. Human *edwardsielliosis* traced to ornamental fish. *J Clin Microbiol* 1983;17:165-167.
485. Van der Heijden IM, Res PCM, Wilbrink B, et al. *Yersinia enterocolitica*: a cause of chronic polyarthralgia. *Clin Infect Dis* 1997;25:831-837.
486. Vienna JK, Greene KD, Reller ME. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* 2003;290:2709-2712.
487. Verboon-Maclé M, Vandenberg WP, Peters ACB, et al. Neonatal brain abscess caused by *Morganella morganii*. *Clin Infect Dis* 1995;20:471.
488. Vogel LC, Ferguson L, Gotsch SP. *Campylobacter* infections of the central nervous system in early infancy. *J Pediatr* 1978;93:86-88.
489. Van Gmelin A. Revised nomenclature of *Campylobacter* family. *Enterobacter* intermedium, and "*Flavobacterium bronchophilum*". *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:211.
490. Wagner SJ, Friedman L, Dodd RY. Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:290-302.
491. Waller F, Fruchart A, Bouvet PJM, Conzel R. Isolation of *Moraxella viscometensis* from bronchial aspirate. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:182-183.
492. Warren JR, Farmer III, Dewhirst FE, et al. Outbreak of nosocomial infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing strains of enteric group 137, a new member of the family *Enterobacteriaceae* closely related to *Campylobacter* fume and *Campylobacter* formosus and *Campylobacter* amelonatus. *J Clin Microbiol* 2000;38:3940-3952.
493. Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, et al. Oral therapeutic agents with highly clustered glutathione for the treatment of shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections. *J Infect Dis* 2004;189:360-368.
494. Waterman SH, Inoue G, Carr SJ, Kilman L. *Salmonella arizonae* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *Am J Public Health* 1990;80:286-289.
495. Wauters G, Boel A, Voorn GP, et al. Evaluation of a new identification system, Crystal enteric/non-fermenter, for gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1995;33:845-849.
496. Wauters G, Janssens M, Seigerwald AG, Brenner DJ. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercoulli* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:424-429.
497. Wayne LG. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:185-187.
498. Wayne LG. Actions of the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on Requests for Opinions published between January 1985 and July 1993. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:177-178.
499. Wellger PN, Takars JL, Brennon P, et al. An outbreak of *Enterobacter hirmerchali* infection and colonization in an intensive care nursery. *Clin Infect Dis* 1997;24:1243-1244.
500. Weisfeld AS, Sonnenwirth AC. Rapid isolation of *Yersinia* spp. from feces. *J Clin Microbiol* 1982;15:508-510.
501. Werner SB, Weidner CE, Nelson BC, et al. Primary plague pneumonia contracted from a domestic cat at South Lake Tahoe, Calif. *JAMA* 1984;251:929-931.
502. Westblom TU, Coggin ME. osteomyelitis caused by *Enterobacter* *tylosus*, formerly enteric group 19. *J Clin Microbiol* 1987;25:2432-2433.
503. Westblom TU, Mäkitie TW. Acute bacterial gastroenteritis caused by *Haefia* *afri*. *Clin Infect Dis* 1992;14:1271-1272.
504. Westbrook CL, O'Hara CM, Roman SB, et al. Incidence and identification of *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates with emphasis on newborns. *J Clin Microbiol* 2000;38:1495-1497.
- 504a. Wödlinger B, Murali M. Evaluation of a new chromogenic agar medium for the identification of urinary tract pathogens. *Lab Appl Microbiol* 1995;20:300-302.
505. Wilson D, Tushy M, Procop GW. The low prevalence of Shiga-toxin production among sorbitol non-fermenting *Escherichia coli* urinary tract isolates does not warrant routine testing. *Clin Infect Dis* 2000;31:1313.
506. Wilson JE, Waterer RR, Wofford JD Jr, Chapman SW. Serious infections with *Edwardsiella iberda*, a case report and review of the literature. *Arch Intern Med* 1989;49:208-210.
507. Winkler J-W, Alekovic S, Walbe H-H. Isolation of *Moraxella viscometensis* from an infected human gallbladder. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:351-352.
508. Wong CS, Jelacic S, Halpern RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 2000;342:1930-1936.
509. Wong VK. Broviac catheter infection with *Klebsiella cryomicroscopica*: a case report. *J Clin Microbiol* 1987;25:1115-1116.
510. Wootfry BE, Lally RT, Edner MN, et al. Evaluation of the AutoMicrobic system for identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1984;20:1053-1059.
511. Wu M-S, Shyu R-S, Lai M-Y, et al. A predisposition toward *Edwardsiella iberda* bacteremia in individuals with preexisting liver disease. *Clin Infect Dis* 1995;21:705-706.
512. York MK, Baron EJ, Clarridge IE, et al. Multilaboratory validation of rapid spot test for identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3394-3398.
513. York MK, Brooks GP, Ho EH. Evaluation of the autoSCAN-W7A rapid system for identification and susceptibility testing of gram-negative fermentative bacilli. *J Clin Microbiol* 1992;30:2903-2910.
514. Zedek PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1993;39:155-158.
515. Zbinden R, Blas R. *Serratia pharyngica* osteomyelitis following a motorcycle accident. *J Clin Microbiol* 1988;26:1409-1410.
516. Zobell CE. Factors influencing the reduction of nitrate and nitrites by bacteria in semisolid media. *J Bacteriol* 1932;24:273-281.

Bacilos gramnegativos no fermentadores

Parte I: Metabolismo de los no fermentadores

Metabolismo fermentativo y oxidativo

Vía de Embden-Meyerhof-Parnas

Vía de Entner-Doudoroff

Vía de las hexosas monofostato
de Warburg-Dickens

Señales iniciales de que una cepa aislada desconocida es no fermentadora

Falta de pruebas de fermentación de la
glucosa

Reacción de citocromo oxidasa positiva

Falta de crecimiento en agar de
MacConkey

Pruebas utilizadas en la identificación de los no fermentadores

Utilización de la glucosa

Motilidad

Producción de pigmentos

Hidrólisis de la urea

Reducción de nitratos

Desnitrificación de nitratos y nitritos

Producción de indol

Descarboxilación

Hidrólisis de esculina

Tinciones para flagelos

Método de Leifson

Método de Ryu

Técnica de preparación húmeda

Morfología de los flagelos

Parte II: Taxonomía, características bioquímicas e importancia clínica de géneros de no fermentadores relevantes en medicina

Microorganismos móviles con flagelos polares

Pseudomonadales

Familia *Pseudomonadaceae*

Género *Pseudomonas* - Grupo rRNA I

Familia *Burkholderiaceae*

Grupo rRNA II

Género *Burkholderia* - Grupo *Pseudomallei*

Género *Ralstonia* y género *Cupriavidus*

Género *Pandoraea*

Género *Inquilinus*

Género *Lautropia*

Familia *Comamonadaceae*

Grupo rRNA III

Grupo *Acidovorans*

Grupo *Facilis-Dehalobact*

Familia *Caulobacteraceae*

Grupo rRNA IV

Grupo *Brevundimonas-Diminished*

Familia *Xanthomonadaceae*

Grupo rRNA V

Género *Stenotrophomonas*

Familia *Sphingomonadaceae*

Género *Sphingomonas*

Familia *Oceanospirillaceae*

Género *Balsanella*

Familia OxalobacteraceaeGénero *Massilia*Género *Herbaspirillum***Familia Alteromonadaceae**Género *Shewanella*—Grupo productor de sulfuro de hidrógenoGénero *Alisthewanella*—Grupo halofílico**Familia Halomonadaceae**Género *Halomonas***Familia Methylobacteriaceae**Género *Methylobacterium*Género *Roseomonas*

Especies sin nombre

Laribacter hongkongensis

Grupo NO-1 de los CDC

Bordetella holmesii (grupo NO-2 de los CDC)

Grupo EO-5 de los CDC

Parte III: Consideraciones para la recuperación y la identificación de los no fermentadores

Niveles de servicio en la identificación de los no fermentadores

Pautas para la recuperación de los no fermentadores

Identificación de las especies más frecuentes

*Pseudomonas aeruginosa**Acinetobacter baumannii**Stenotrophomonas maltophilia*

Métodos para la identificación que utilizan pruebas convencionales

Esquemas de identificación de Weyant (CDC), Gilardi y Pickett

Enfoque práctico de la identificación de los no fermentadores

Procesos computarizados

Equipos comerciales

Tubo Oxi/Ferm

Sistema API 20E

Sistema API 20NE

Sistema Remel NF

Sistema Crystal Enteric/Nonfermenter

Sistema RapID NF Plus

Sistema Biolog

Sistemas de identificación automáticas

Sistema Vitek Legacy

Sistema Vitek 2

Sistemas Microscan Walkaway-96, Walkaway-40 y Autoscan-4

Sistema Sensititre AP80

Sistema Phoenix

Selección de un sistema

Microorganismos móviles con flagelos peritricos

Familia AlcaligenaceaeGénero *Alcaligenes*Género *Achromobacter*Género *Bordetella*Género *Kerstesia*Género *Oligella***Familia Rhizobiaceae**Género *Rhizobium* (antes *Agrobacterium*)**Familia Brucellaceae**Género *Deinobacterium*

Microorganismos inmóviles y oxidasa positivos

Familia Flavobacteriaceae*Chryseobacterium*, *Empedobacter* y grupos sin nombre de los CDC*Weeksella* y *Bergeyella*Género *Myroides***Familia Sphingobacteriaceae***Sphingobacterium* y *Pedobacter***Familia Moraxellaceae**Género *Moraxella*Género *Psychrobacter* y grupos de oxidantes eugénicos (EO) de los CDC**Familia Neisseriaceae**Género *Neisseria*

Grupo 1 de bacilos de Gilardi

Microorganismos inmóviles y oxidasa negativos

Género *Acinetobacter*

Los bacilos gramnegativos no fermentadores constituyen un grupo de bacilos no esporulados aerobios que no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas distintas de la fermentación. Dentro de este grupo existen varios géneros y especies de bacterias con requerimientos especiales de crecimiento que no se explican en este capítulo. La línea divisoria entre lo que es un "no fermentador" y lo que puede ser designado de otro modo como bacilo gramnegativo no fermentador "con requerimientos nutricionales especiales", "inusual" u "otro" (explicado en el capítulo 9) se basa más sobre una convención que en características genéticas o fenotípicas definidas. En este capítulo, la expresión **bacilos gramnegativos no fermentadores** se utiliza para indicar todos los bacilos gramnegativos aerobios que muestran un crecimiento abundante dentro de las 24 horas sobre la superficie del agar hierro de Kligler (KIA) o agar triple azúcar-hierro (TSI), pero ninguno de ellos crece en el extremo de estos medios ni lo acidifican.

Los géneros de no fermentadores que se explicarán en este capítulo son *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Alishewanella*, *Balneatrix*, *Bergeyella*, *Bordetella*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Delftia*, *Empedobacter*, *Flavobacterium*, *Laribacter*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Myroides*, *Ochrobactrum*, *Oligella*, *Pandoraea*, *Paracoccus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Roseomonas*, *Shewanella*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Weeksella* y algunos microorganismos que actualmente sólo llevan las designaciones alfanuméricas de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC). En este capítulo también se incluyen algunas especies de *Neisseria* que se presentan como bacilos gramnegativos y deben ser diferenciadas de los bacilos no fermentadores que tienen un aspecto similar. Si bien los géneros *Eikenella*, *Brucella* y *Francisella* tienen las características generales de los no fermentadores, se los agrupa en este libro con los bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales y se explican en el capítulo 9. En el cuadro 7-1 se presenta la nomenclatura de los microorganismos aceptada en la actualidad y una lista de las designaciones anteriores. En el cuadro 7-2 se ofrecen los sinónimos para varias especies bacterianas que tenían antes o tienen ahora designaciones alfanuméricas de los CDC.

A medida que se acumula más información, se debe aceptar como parte del progreso científico la reclasificación de las bacterias entre géneros y especies y la creación de nuevas designaciones. Los estudios de homología del DNA a menudo desempeñan un papel más importante en la clasificación final de las bacterias que un esquema basado sólo sobre características fenotípicas. Por ejemplo, dentro del género *Pseudomonas* se reconocen actualmente varias biovariedades y variedades patógenas, dispuestas según homologías de RNA recombinante (rRNA) y DNA.⁷⁰⁰ A pesar de los refinamientos, los microbiólogos clínicos aún deben reconocer y clasificar las cepas aisladas en el laboratorio sobre la base de las características morfológicas y bioquímicas. También deben mantenerse al corriente de los cambios en la nomenclatura bacteriana para poder utilizar los nombres actuales en la práctica diaria y no interpretar erróneamente los datos experimentales recogidos de distintos investigadores que utilizan diferentes designaciones.

PARTE I: METABOLISMO DE LOS NO FERMENTADORES

Las bacterias que obtienen su energía de compuestos orgánicos se conocen como **quimioorganótrofos**. La mayoría de las

bacterias halladas en medicina clínica obtienen energía de la utilización de los hidratos de carbono por una de varias vías metabólicas. La detección y la medición de distintos productos metabólicos son necesarias para identificar las especies bacterianas que pueden ser causa de enfermedades infecciosas. Algunas bacterias, como los miembros del género *Moraxella*, no metabolizan los hidratos de carbono, antes bien obtienen la energía de la degradación de otros compuestos orgánicos, como aminoácidos, alcoholes y ácidos orgánicos. Algunas bacterias de vida libre, como los grupos fijadores de nitrógeno o aquellos capaces de oxidar azufre o hierro, pueden obtenerla de compuestos químicos inorgánicos simples. Éstos se denominan **quimolitótrofos** y rara vez causan de enfermedad en el ser humano.

El espacio de este libro sólo permite un resumen de las vías metabólicas utilizadas por los no fermentadores, el suficiente para comprender términos como **aerobio**, **anaerobio**, **fermentación** y **oxidación**. Estos procesos metabólicos no sólo definen el nicho taxonómico de las bacterias; también determinan las pruebas y los procedimientos utilizados en la identificación de los microorganismos en el laboratorio. Se pueden consultar los libros de Doelle¹⁹² y Thimann¹⁹³ para obtener una explicación más detallada del metabolismo y la fisiología bacterianas y el texto de MacFaddin,¹⁹⁴ que proporciona una revisión de la bioquímica de las pruebas y reacciones utilizadas para realizar las diversas identificaciones.

Metabolismo fermentativo y oxidativo

La degradación bacteriana de los hidratos de carbono prosigue por varias vías metabólicas en las cuales los hidrogeniones (electrones) son transferidos sucesivamente a compuestos de potencial de oxidorreducción mayor, con la liberación final de energía en forma de adenosintrifosfato (ATP). Todos los hidratos de carbono de seis, cinco y cuatro carbonos son degradados inicialmente a ácido pirúvico, un producto intermedio inicial. La glucosa es la principal fuente de hidratos de carbono para las bacterias y la degradación prosigue por tres vías principales: de Embden-Meyerhof-Parnas, de Entner-Doudoroff y de Warburg-Dickins (de las hexosas monofosfato). Como se muestra en la figura 7-1, la glucosa es convertida en ácido pirúvico en cada una de estas tres vías por un conjunto diferente de pasos de degradación. Las bacterias utilizan una o más de estas vías para el metabolismo de la glucosa según su composición enzimática y la presencia o la ausencia de oxígeno.

Vía de Embden-Meyerhof-Parnas

Como la glucosa se degrada sin oxígeno, la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, también llamada **vía glucolítica** o **anaerobia**, es utilizada fundamentalmente por las bacterias anaerobias y, en cierta medida, también por las bacterias anaerobias facultativas. Los pasos intermedios en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas comprenden la fosforilación inicial de glucosa, la conversión a fosfato de fructosa y la segmentación para formar dos moléculas de gliceraldehído fosfato, las cuales a través de una serie de pasos intermedios (que no se muestran en la figura 7-1), forman ácido pirúvico. Esta vía se explica con mayor detalle en el capítulo 6.

Históricamente, la vía de Embden-Meyerhof-Parnas también ha sido llamada **vía fermentativa**. Fermentación y metabolismo anaerobio fueron considerados sinónimos desde que Pasteur demostró que los ácidos y los alcoholes constituyen los principales productos finales de la degradación de los hidratos

Cuadro 7-1 Nomenclatura para bacilos no fermentadores gramnegativos

NOMBRE ACTUAL	DESIGNACIONES PREVIAS	COMENTARIOS
<i>Achromobacter</i> Grupos B, E y F <i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Alcaligenes xyloxydans</i> subespecie <i>denitrificans</i> <i>Alcaligenes denitrificans</i> subespecie <i>denitrificans</i> CDC Ve	Especie de <i>Achromobacter</i> sin nombre Ya no se utiliza la designación de la subespecie
<i>Achromobacter piechaudii</i>	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	Nueva especie aislada fundamentalmente de muestras clínicas humanas, pero algunas cepas del medioambiente. No se conoce la importancia clínica. Una otitis media causada por este microorganismo
<i>Achromobacter xyloxydans</i>	<i>Alcaligenes xyloxydans</i> subespecie <i>xyloxydans</i> <i>Achromobacter xyloxydans</i> <i>Alcaligenes denitrificans</i> subespecie <i>xyloxydans</i> CDC IIIa y IIIb	Ya no se utiliza la designación de la subespecie
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> variedad <i>aunttratus</i> <i>Achromobacter aunttratus</i> <i>Bacterium aunttratum</i> <i>Herellea vaginicola</i> Bucilo de Morax-Axenfeld <i>Moraxella glycolytica</i> variedad <i>nonliquefaciens</i> <i>Pseudomonas calcoacetica</i>	Nombre de la especie dado a <i>Acinetobacter</i> genoespecie 2. Produce ácido a partir de glucosa. Puede ser separado de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (genoespecie 1) por el crecimiento a 41 °C y 44 °C, la producción de β -xilosidasa y la utilización de malato (<i>A. baumannii</i> -positivo y <i>A. calcoaceticus</i> -negativo) Los laboratorios que no realicen esta prueba pueden elegir comunicar estos microorganismos como complejo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> . La mayoría de las cepas de <i>Acinetobacter</i> aisladas de muestras clínicas humanas pertenecen a esta especie
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> variedad <i>lwoffii</i> <i>Achromobacter lwoffii</i> <i>Mina polymorpha</i> <i>Moraxella lwoffii</i>	Nombre de la especie dado a <i>Acinetobacter</i> genoespecie 8. Cepa no oxidante de glucosa hallada en muestras clínicas humanas
<i>Alcaligenes faecalis</i>	CDC VI <i>Alcaligenes odorans</i>	Se propuso <i>Alcaligenes odorans</i> en una fecha posterior para un microorganismo que es una cepa del que antes recibía el nombre <i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	<i>Weeksella zoohelcum</i> CDC IIj	Prueba de urea rápida positiva. Asociada con mordeduras de perros y gatos
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Alcaligenes bronchicanis</i> <i>Alcaligenes bronchoseptica</i> <i>Bordetella bronchicanis</i> <i>Brucella bronchiseptica</i> <i>Haemophilus bronchiseptica</i>	Prueba de urea rápida positiva
<i>Bordetella hinzii</i>	Similar a <i>Bordetella pertussis</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> tipo II Bacteria TC (coriza de pavo) tipo II Especie de <i>Alcaligenes</i> cepa C ₅ T ₂ Grupo 2 de no oxidantes de los CDC (NO-2)	Nueva especie aislada en el aparato respiratorio de pollos y pavos. En humanos se comunicó el aislamiento en el aparato respiratorio, secreción ótica y heces
<i>Bordetella holmesii</i>		Nueva especie aislada de hemocultivos. Oxidasa negativo, inmóvil; pigmento soluble pardo producido en agar-infusión de cerazón-úrea
<i>Bordetella trematum</i>		Nueva especie aislada de heridas y secreción ótica
<i>Brevundinomonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i> CDC Ia	Oxidasa negativo, móvil
<i>Brevundinomonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i> <i>Corynebacterium vesiculare</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas multivorans</i> <i>Pseudomonas kingae</i> CDC EO-1	Pigmento amarillo. Aislado de muchas fuentes acuáticas y superficies húmedas. Patógeno respiratorio en pacientes con fibrosis quística
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Pseudomonas gladioli</i> <i>Pseudomonas marginata</i>	Consiste al menos en nueve especies genéticas difíciles de separar fenotípicamente
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	Primariamente patógeno de las plantas. Ha sido comunicado de esputo de pacientes con fibrosis quística
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Flavobacterium indologenes</i> CDC IIb	Causa de melioidosis en seres humanos
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> CDC IIa	Altamente patógeno para lactantes prematuros

Cuadro 7-1 Nomenclatura para bacilos no fermentadores gramnegativos (cont.)

NOMBRE ACTUAL	DESIGNACIONES PREVIAS	COMENTARIOS
<i>Comamonas terrigena</i>	Distintas especies de <i>Vibrio</i> <i>E. Falsen</i> grupo 10 <i>Aquaspirillum aquaticum</i>	
<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas desmolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas cruxifera</i>	
<i>Cupriavidus pauculus</i>	<i>Wautersia paucula</i> <i>Ralstonia paucula</i> IVc-2 CDC	Prueba de ureasa rápida positiva
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Comamonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas desmolytica</i> <i>Pseudomonas indologens</i> <i>Achromobacter cytoovorans</i>	Reacción de indol naranja. Debido a la producción de ácido antranílico a partir de triptona
<i>Empedobacter brevis</i> Especies de <i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium breve</i>	Varias especies incluidas antes en el género <i>Flavobacterium</i> han sido reclasificadas como miembros de géneros nuevos o de otros géneros; las especies restantes están ampliamente distribuidas en el suelo y los hábitats de agua dulce y no se encuentran en nuestras clínicas humanas
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>Pseudomonas mesophila</i> <i>Pseudomonas methica</i> <i>Vibrio extorquens</i> <i>Mycoplama rubra</i> Especies de <i>Paranitrobacter</i> Especies de <i>Chromobacterium</i> Especies de <i>Brifertellia</i>	Bacilos de crecimiento lento, con pigmento rosado. No se tiñen bien, aparecen amorfos, con muchas vacuolas que no se tiñen
<i>Moraxella atlantae</i>	CDC M-3	
<i>Moraxella lacunata</i> <i>Moraxella nonliquefaciens</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Myxides odorans</i> <i>Myxides odoratissima</i>	<i>Moraxella liquefaciens</i> <i>Bacillus duplex nonliquefaciens</i> <i>Mima polymorpha</i> variedad <i>oxidans</i> <i>Flavobacterium odoratum</i> CDC M-4F	Colonias grandes con una tendencia a propagarse; indol negativo
<i>Neisseria weaveri</i>	Especie de <i>Moraxella</i> M-5 CDC M-5	Cepas asociadas con mordeduras de perros
<i>Neisseria elongata</i> subespecie <i>nitroreducens</i>	Especie de <i>Moraxella</i> M-6 CDC M-6	Catalasa negativo. Cepas asociadas con endocarditis
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	CDC Vd-1, Vd-2 Especies de <i>Achromobacter</i> , biotipos 1 y 2 <i>Achromobacter</i> , grupos A, C y D	Sólo se aisló en muestras humanas
<i>Oligella ureolytica</i>	CDC IVc	Prueba de urea rápida positiva y fenilalanina desaminasa positiva
<i>Oligella urethralis</i>	CDC M-4	Se aisló en infecciones del oído y de las vías urinarias
<i>Pandoraea</i>	Nuevo género que comprende cinco especies	Se aisló en muestras humanas (principalmente de pacientes con fibrosis quística) y en el medioambiente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas pyocyanea</i> <i>Bacterium aeruginosa</i>	Pertenece al grupo fluorescens, crece a 42 °C. Cepa aislada con más frecuencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Pertenece al grupo fluorescens, gelatina positivo
<i>Pseudomonas luteola</i>	CDC Vc-1 <i>Chryseomonas luteola</i> <i>Chryseomonas polytricha</i>	Con pigmento amarillo, oxidasa negativo, esculina positivo

(Continúa)

Cuadro 7-1 Nomenclatura para bacilos no fermentadores gramnegativos (cont.)

NOMBRE ACTUAL	DESIGNACIONES PREVIAS	COMENTARIOS
<i>Pseudomonas mendocina</i>	CDC Vb-2	
<i>Pseudomonas oryzaehabitans</i>	CDC Vc-2 <i>Flavimonas oryzaehabitans</i> <i>Pseudomonas lacunogenes</i>	Cepas asociadas con septicemia y endocarditis de válvula protésica. Con pigmento amarillo, oxidasa negativo, esculina negativo
<i>Pseudomonas putida</i>		Pertenece al grupo fluorescente, gelatina negativo
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CDC Vb-1	Colonias rugosas. Ubicuo en suelo y agua. Pocas veces se asocia con infección
<i>Psychrobacter phenylpyruvica</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvica</i> <i>Monarella phenylpyruvica</i> CDC grupo M-2	Fenilalanina desaminasa positiva, crece a 4 °C, tolera concentraciones de NaCl de hasta 9%
<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Bartholletia pickettii</i> <i>Pseudomonas pickettii</i> CDC Va-1, Va-2	Colonias purpúreas de crecimiento lento después de 24 horas en placa de agar sangre. Pocas veces asociado con infección
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	<i>Pseudomonas thomasi</i> (Va-3)	Manitol positivo
<i>Rhizobium radiobacter</i>	CDC Vd-3 <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Agrobacterium biovariedad 1</i>	
Especies de <i>Roseomonas</i>	"Grupo cocoide rosado" de los CDC	Incluye tres genomoespecies con nombre (<i>R. gilardi</i> , <i>R. cervicalis</i> , <i>R. faerfae</i>) y tres sin nombre. Colonias rosadas, a menudo mucoides, bacilos coccoides rechenchos gramnegativos de tinción débil
<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella algae</i>	<i>Pseudomonas putrefaciens</i> <i>Alseimonas putrefaciens</i> <i>Achromobacter putrefaciens</i> CDC Ib-1, Ib-2	H ₂ S positivo. <i>S. algae</i> es la cepa predominante aislada en humanos y requiere NaCl para su crecimiento
<i>Sphingobacterium multivorans</i>	CDC III-2 <i>Flavobacterium multivorans</i>	Pigmento amarillo, oxidasa positivo, esculina positivo, manitol negativo, pocas veces asociado con infección grave
<i>Sphingobacterium spiritovorans</i>	CDC III-3 <i>Flavobacterium spiritovorans</i> <i>Flavobacterium yabuuchiae</i> <i>Sphingobacterium versatile</i>	Pigmento amarillo, oxidasa positivo, esculina positivo, manitol positivo. Las fuentes más frecuentes para el aislamiento fueron sangre y orina
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> CDC III-1	Pigmento amarillo, oxidasa positivo, esculina positivo, crecimiento lento. Se encuentra en distintas muestras clínicas
<i>Symbiobacterium multophilum</i>	<i>Xanthomonas multophilum</i> <i>Pseudomonas multophilum</i> CDC I	Oxidasa negativo, lisina y DNasa positivo, puede aislarse de casi cualquier sitio clínico. Puede producir infecciones oportunistas
<i>Weeksella vitrea</i>	CDC III <i>Flavobacterium genitale</i>	Mucóide y viscoso. Difícil de eliminar del agar. Las cepas aisladas en muestras clínicas han sido asociadas con infecciones urinarias y vaginales.

de carbono cuando se excluye el oxígeno del sistema. Según un concepto actual, se sostiene que existe un metabolismo fermentativo en un sistema glucolítico cuando los compuestos orgánicos sirven como aceptor final de hidrógeno (electrones). Por lo tanto, como se ve en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas que se muestra en la columna de la izquierda de la figura 7-1, el ácido pirúvico actúa como aceptor intermedio de hidrógeno, pero luego se oxida al entregar sus hidrogeniones al lactato de sodio para formar ácido láctico o a otras sales orgánicas para formar algunos de los denominados ácidos mixtos. Estos ácidos son los productos finales del metabolismo de la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y explican la caída del pH

en las pruebas de fermentación utilizadas para identificar las bacterias. Las bacterias tienen los sistemas enzimáticos apropiados pueden degradar aún más estos ácidos mixtos en alcoholes, CO₂ u otros compuestos orgánicos.

Aunque estos principios bioquímicos parecen algo alejados del trabajo cotidiano del laboratorio, los microbiólogos deben tener un conocimiento básico del metabolismo bacteriano cuando idean o interpretan procedimientos de prueba que comparan fermentación con oxidación. La fermentación debe ser determinada en los sistemas de prueba que excluyen oxígeno. Los productos glucolíticos formados mediante fermentación tienen una acidez relativamente fuerte, la cual es detectada con

Cuadro 7-2 Grupos bacterianos con letras y números de los CDC: sinónimos

DESIGNACIONES DE LOS CDC	USO ACTUAL	DESIGNACIONES DE LOS CDC	USO ACTUAL
I	<i>Sienotrophomonas maltophilia</i>	HB-3,4	<i>Actinobacillus actinomycetocombians</i>
Ia	<i>Brevundimonas diminuta</i>	HB-5	<i>Pasteurella bettyae</i>
Ib-1	<i>Shewanella putrefaciens</i>	M-1	<i>Kingella kingae</i>
Ib-2	<i>Shewanella algae</i>	M-2	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>
Ila	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	M-3	<i>Moraxella atlantae</i>
Ilb	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	M-4	<i>Oligella urethralis</i>
Ile	Grupo Ile de los CDC	M-4E	<i>Myroides odoratus/odoratimimus</i>
IId	<i>Cardiobacterium hominis</i>	M-5	<i>Neisseria weaveri</i>
Ile	Grupo Ile de los CDC	M-6	<i>Neisseria elongata</i> subespecie <i>mitoreducens</i>
II	<i>Weissella viriosa</i>	TM-1	<i>Kingella denitrificans</i>
Ilg	Grupo Ilg de los CDC	DF	<i>Dyrgonia fermenter</i>
Iib	Grupo Iib de los CDC	DF-1	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
Ili	Grupo Ili de los CDC		<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
Iij	<i>Bergeyella zoohelcum</i>		<i>Capnocytophaga sputigena</i>
III-1	<i>Sphingomonas petcinobilia</i>	DF-2	<i>Capnocytophaga carinosa</i>
III-2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Similar a DF-2	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>
III-3	<i>Sphingobacterium spiritovarum</i>	DF-3	Sin nombre
IIIa, IIIb	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	EO	<i>Engonic oxidizer</i>
IVa	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	EO-1	<i>Bordetella cepacia</i>
IVb	<i>Bordetella pertussis</i>	EO-2	<i>Atmoccocus yeei</i>
IVc	Sin nombre	EO-3	Sin nombre
IVe-2	<i>Capriastidus pauculus</i>	EO-5	Sin nombre
IVd	Grupo 2 similar a pseudomonas	EF	<i>Engonic fermenter</i>
IVe	<i>Oligella ureolytica</i>	EF-1	Grupo 2 similar a pseudomonas
Va-1	<i>Ralstonia pickettii</i>	EF-3	<i>Vibrio vulnificus</i>
Va-2	<i>Ralstonia pickettii</i>	EF-4	Similar a <i>Pasteurella</i>
Va-3	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	EF-5	<i>Photobacterium damela</i>
Vb-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	EF-6	<i>Vibrio fluvialis</i>
Vb-2	<i>Pseudomonas mendocina</i>	EF-9	<i>Tatumella pyoverdina</i>
Vb-3	Similar a <i>Pseudomonas stutzeri</i>	EF-13	<i>Vibrio holthae</i>
Vc	<i>Achromobacter denitrificans</i>	EF-19	<i>Comamonas terrigena</i>
Vd-1	<i>Ochrobactrum anitropi</i>	EF-26	Especies similares a <i>Bordetella</i>
Vd-2	<i>Ochrobactrum anitropi</i>	NO	No oxidante
Vd-3	<i>Rhizobium radiobacter</i>	NO-1	Grupo NO-1 de los CDC
Ve-1	<i>Pseudomonas luteola</i>	NO-2	<i>Bordetella holmesii</i>
Ve-2	<i>Pseudomonas oryzaletitans</i>	WO	Oxidante débil
VI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	WO-1	Sin nombre
HB-1	<i>Eikenella corrodens</i>	WO-2	Especies de <i>Ammonia</i>
HB-2	<i>Haemophilus aphrophilus</i>		

facilidad por los indicadores de pH y pueden producirse grandes cantidades de gas. No sucede lo mismo en el caso de la vía de Entner-Doudoroff.

Vía de Entner-Doudoroff

La vía de Entner-Doudoroff también se denomina **vía aerobia** porque se necesita oxígeno para que ocurra la glucólisis. Obsérvese en la columna central de la figura 7-1 que la glucosa no es convertida en dos moléculas de triosa carbono como en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas; más bien, es oxidada a 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato antes de formar ácido pirúvico. Algunas bacterias utilizan vías de corto-circuito a través de las cuales la glucosa se oxida directamente en ácido glucurónico y cetoglucurónico sin un paso de fosforilación inicial. En cualquier caso, se forma el ácido pirúvico intermedio. "Oxidación" se refiere más a la manera en que el ácido pirúvico transfiere sus hidrogeniones a la vía por medio

de la cual se forma. Al carecer de las enzimas deshidrogenasas necesarias para oxidar el ácido pirúvico a ácido láctico u otros "ácidos mixtos", las bacterias oxidativas transfieren los hidrogeniones disponibles del ácido pirúvico al ciclo de Krebs, donde los iones finalmente se unen con oxígeno elemental para formar agua. Por lo tanto, el **metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono** se define actualmente como las reacciones productoras de energía que requieren oxígeno molecular (u otros elementos no orgánicos) como aceptor terminal de hidrógeno (electrones).

Esta diferencia en el metabolismo exige enfoques prácticos alternativos para la identificación de bacterias oxidativas y fermentativas. Los ácidos que se forman en la vía de Entner-Doudoroff (ácido glucurónico y sus derivados) y los producidos en el ciclo de Krebs (ácido cítrico y sus derivados) son extremadamente débiles comparados con los ácidos mixtos resultantes de la fermentación. Como el producto final del metabolismo oxidativo es el agua, los microorganismos oxida-

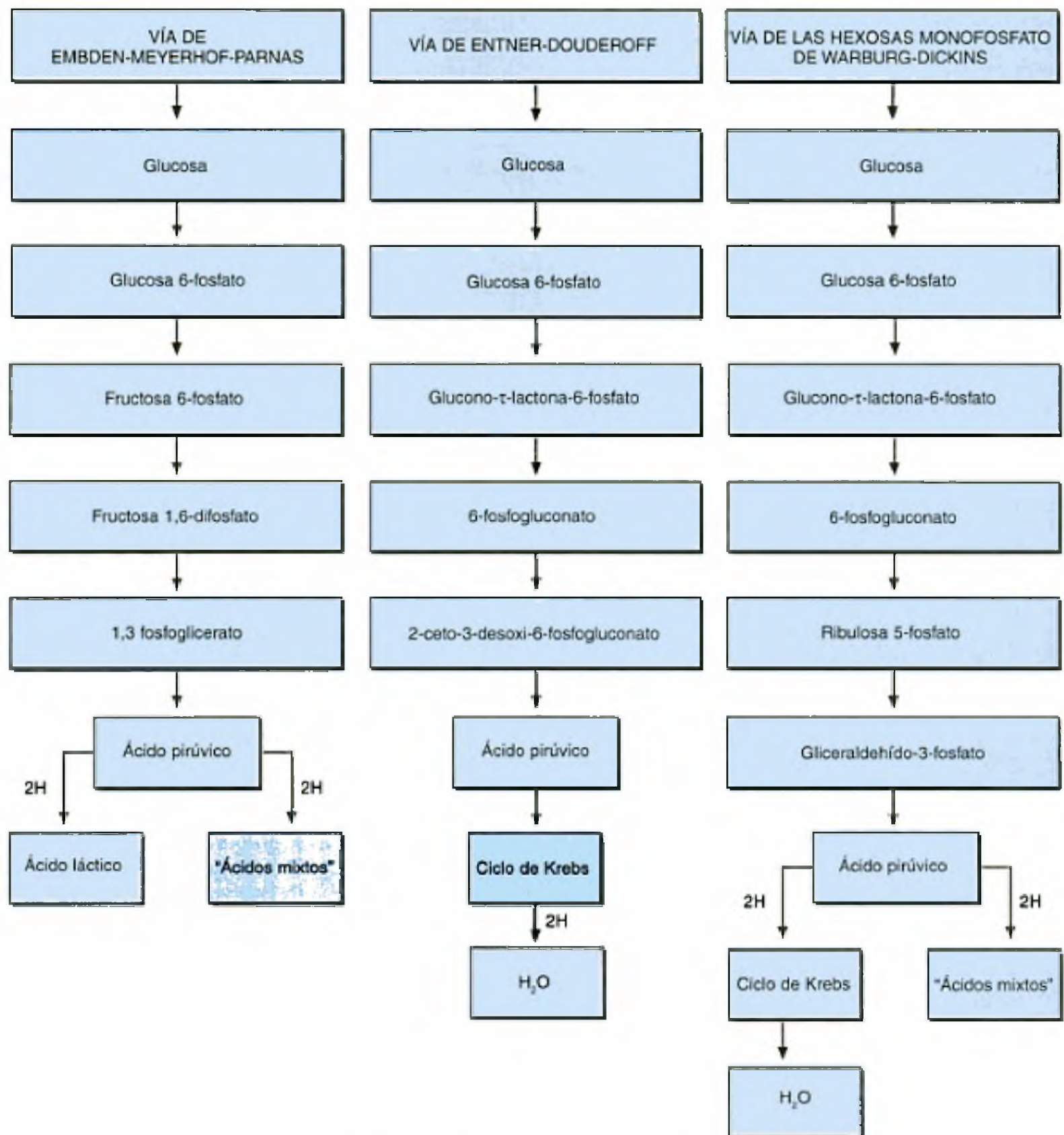


Figura 7-1 Vías metabólicas para la degradación bacteriana de glucosa.

tivos no forman gas a partir de los hidratos de carbono. Por lo tanto, es necesario utilizar sistemas de prueba que tengan detectores más sensibles de la producción de ácido cuando se estudian las bacterias oxidativas, que se explican en detalle más adelante en este capítulo. A menudo, las pruebas diseñadas para detectar la producción de ácido por las bacterias fermentadas no se pueden utilizar con los microorganismos oxidativos porque producen cantidades insuficientes de ácido como para virar el indicador de pH.

Vía de las hexosas monofosfato de Warburg-Dickens

Las bacterias anaerobias facultativas tienen la capacidad de crecer sobre la superficie de una placa de agar en presencia de oxígeno o en un medioambiente anaerobio. El hecho de que un microorganismo pueda crecer en un medioambiente aerobio no significa necesariamente que utilice el oxígeno en su metabolismo. Es decir, no todos los aerobios son oxidativos. El término **aerotolerante** es más apropiado para las bacterias no oxi-

dativas que son capaces de crecer en presencia de oxígeno pero crecen mejor en un medioambiente anaerobio.

Muchos de los anaerobios facultativos pueden utilizar la vía de Embden-Meyerhof-Parnas o la vía de Entner-Doudoroff, según las condiciones ambientales en las que están creciendo. La vía de las hexosas monofosfato, como se muestra en la columna de la mano derecha de la figura 7-1, es en realidad un híbrido de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de la vía de Entner-Doudoroff. Obsérvese que los pasos iniciales en la degradación de la glucosa en la vía de las hexosas monofosfato son paralelos a los de la vía de Entner-Doudoroff; sin embargo, más adelante en el esquema de la vía de las hexosas monofosfato, se forma gliceraldehído-3-fosfato como precursor del ácido pirúvico, similar a la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. Estos microorganismos aparecen como fermentadores en los sistemas de prueba, aun cuando se utilice estrictamente esta última vía.

Obsérvese en la figura 7-1 que la ribulosa 5-fosfato es el precursor de la formación de gliceraldehído 3-fosfato en la vía de las hexosas monofosfato. La ribulosa es una pentosa y, por esta razón, esta última vía también ha sido denominada ciclo de las pentosas. Proporciona el principal camino por medio del cual algunas especies bacterianas metabolizan la pentosa.

Señales iniciales de que una cepa aislada desconocida es no fermentadora

El microbiólogo puede sospechar que un bacilo gramnegativo desconocido es miembro del grupo de no fermentadores al observar una o más de las siguientes características:

1. Falta de evidencias de fermentación de la glucosa (véase lámina en color 7-1A)
2. Reacción de citocromo oxidasa positiva (véase lámina en color 7-1B)
3. Falta de crecimiento en agar de MacConkey (véase lámina en color 7-1C)

En la lámina en color 7-1 se presentan otras características utilizadas para realizar una identificación preliminar de los no fermentadores.

Falta de pruebas de fermentación de la glucosa

Los ácidos producidos por los no fermentadores son considerablemente más débiles que los ácidos mixtos derivados de las bacterias fermentadoras; por lo tanto, es posible que el pH de los medios de prueba de fermentación en el cual está creciendo un no fermentador no caiga lo suficiente como para convertir el indicador de pH. La señal inicial de que un microorganismo desconocido es un no fermentador suele ser la falta de producción de ácido en los medios KIA o TSI, que se manifiesta en cada caso como una porción inclinada alcalina (roja) y una profundidad alcalina (véase lámina en color 7-1A). Inicialmente, es importante que un microorganismo desconocido sea clasificado por su modo de utilización de la glucosa para seleccionar el conjunto correcto de características bioquímicas como para hacer una identificación definitiva. Es posible que los microbiólogos que utilizan equipos comerciales de identificación y omiten la siembra del microorganismo desconocido en los tubos KIA o TSI no sepan si deben seleccionar un sistema fermentador o uno oxidativo. Por lo tanto, antes de establecer diferentes sistemas, se recomienda evaluar la característica oxidativa-fermentadora (OF) de toda cepa desconocida de

bacilos gramnegativos mediante la inoculación en agar inclinado (pico de flauta) en medio KIA o TSI.

Reacción de citocromo oxidasa positiva

Se puede sospechar que cualquier colonia de un bacilo gramnegativo que crece en agar sangre u otro medio de aislamiento primario que es citocromo oxidasa positivo pertenece al grupo de los no fermentadores (véase lámina en color 7-1B). Sin embargo, no todos los bacilos gramnegativos oxidasa positivos son no fermentadores. Por lo tanto, es necesario medir aún el modo de utilización de la glucosa (lo que demuestra nuevamente la importancia de establecer un tubo de KIA o TSI). Los cultivos de fermentadores oxidasa positivos, como especies de *Pasteurella*, especies de *Aeromonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Vibrio* y otros, pueden confundirse con no fermentadores, lo que dificulta aún más la identificación. En el protocolo 1-5 se explica el procedimiento para realizar la prueba de la citocromo oxidasa. Para evaluar la actividad oxidativa de los no fermentadores, los CDC recomiendan utilizar una solución acuosa al 0.5% de cloruro de tetrametil-*p*-fenilenediamina. Esta solución es buena durante una semana si se almacena en un frasco oscuro en la heladera a 4 °C a 10 °C. Se pueden utilizar algunas gotas de reactivo para irrigar la superficie del medio de agar sobre el cual están creciendo las colonias bacterianas. La aparición de color azul al cabo de algunos segundos indica una prueba positiva. Las reacciones negativas pueden confirmarse utilizando el método de Kovac, más sensible, en el cual se mezcla un puñado de microorganismos con algunas gotas de reactivo sobre un trozo de papel de filtro (véase lámina en color 7-1B). La aparición de color azul oscuro dentro de los 10 segundos indica un resultado positivo de la prueba.

Falta de crecimiento en agar de MacConkey

Aunque todos los miembros de las enterobacterias crecen en agar de MacConkey, algunos no fermentadores no lo hacen. Por lo tanto, se debe sospechar que un bacilo gramnegativo que crece en agar sangre pero crece poco o no crece en agar de MacConkey pertenece al grupo de los no fermentadores. Sin embargo, esta pauta está lejos de ser absoluta, porque muchos de los bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales tampoco crecen en agar de MacConkey. La capacidad de las bacterias para crecer en agar de MacConkey se determina inspeccionando con luz reflejada la superficie de las placas que han sido inoculadas y luego incubadas durante 24 a 48 horas. Los microorganismos que crecen bien producen colonias de 3 mm de diámetro o más y fáciles de ver. Las cepas que crecen poco producen colonias puntiformes pequeñas ampliamente dispersas o no producen ningún crecimiento (véase lámina en color 7-1C).

Pruebas utilizadas en la identificación de los no fermentadores

Utilización de la glucosa

La mayoría de los medios de cultivo convencionales ideados para detectar la producción de ácido por las bacterias fermentadoras, como las enterobacterias, no son apropiados para el estudio de los bacilos no fermentadores. No apoyan el crecimiento de muchas cepas y los ácidos producidos a menudo son demasiado débiles para convertir el indicador de pH. Hugh y Leifson³⁵⁰ fueron los primeros en idear un medio de oxidación-



Figura 7-2 Prueba oxidativa-fermentativa (OF). Los microorganismos oxidativos producen ácido tanto en los tubos cerrados como en los abiertos (azul oscuro); los microorganismos oxidativos sólo producen ácido en el tubo abierto. Los microorganismos asacarolíticos que no utilizan hidratos de carbono no producen cambios en ninguno de los tubos.

fermentación (OF) que se adaptara a las propiedades metabólicas de los bacilos no fermentadores, como se señala en el protocolo 7-1.

Obsérvese que el medio OF de Hugh-Leifson contiene peptona al 0,2% e hidratos de carbono al 1,0%, de modo que la relación entre peptona e hidratos de carbono es de 1:5, a diferencia de la relación 2:1 hallada en los medios utilizados para la fermentación de los hidratos de carbono. La disminución en la peptona reduce la formación de productos oxidativos a partir de aminoácidos, que tienden a elevar el pH del medio y pueden neutralizar los ácidos débiles producidos por los bacilos no fermentadores. Por otra parte, el aumento de la concentración de hidratos de carbono incrementa la producción de ácido por el microorganismo. La consistencia semisólida del agar, el uso de azul de bromotimol como indicador de pH y la inclusión de una pequeña cantidad de buffer de difosfato están ideados para aumentar la detección de ácido.

Se necesitan dos tubos de cada medio de hidrato de carbono para la prueba. El medio en un tubo está expuesto al aire; el otro está recubierto con vaselina estéril o parafarina fundida (fig. 7-2). Los microorganismos oxidativos sólo producen ácido en el tubo abierto expuesto al oxígeno atmosférico; los microorganismos fermentadores producen ácido en ambos tubos y las bacterias no sacarolíticas son inertes en este medio, el cual se mantiene a un pH alcalino después de la incubación. En la lámina en color 7-1D se ilustra la reacción OF de un no fermentador oxidativo y sólo el tubo abierto muestra el color amarillo de producción de ácido.

La prueba OF tiene limitaciones. Es posible que los bacilos no fermentadores de crecimiento lento no produzcan cambios de color durante varios días y las especies que producen amidas a partir de aminoácidos pueden hacer que las reacciones ácidas débiles reviertan con el tiempo, confundiendo así la interpretación final. Es importante seguir estrictamente las fórmulas de Hugh-Leifson cuando se realiza la prueba OF (véase protocolo 7-1).

Motilidad

Es posible que un medio de agar semisólido para detectar la motilidad de los microorganismos fermentadores no sea apro-

piado para las especies no fermentadoras que crecen sólo sobre la superficie del agar. Si se utiliza un medio de agar semisólido para los bacilos no fermentadores, debe inocularse con un corte sólo los 4 mm superiores del medio y realizar una lectura inicial en 4 a 6 horas. Muchas cepas móviles de bacilos no fermentadores muestran sólo una nebulosidad débil y temprana cerca de la superficie del agar, que tiende a desaparecer con una incubación prolongada. Nuevamente se deben realizar lecturas a las 24 y a las 48 horas para detectar la motilidad de las cepas de crecimiento lento. La incubación a 25 °C aumenta la motilidad de algunas cepas. Hemos observado que el medio de motilidad B con tetrazolio (Remel, Lenexa, KS) funciona muy bien para demostrar la motilidad con los bacilos no fermentadores (véase lámina en color 7-1E).

La preparación de la gota colgante puede ser más precisa para detectar la motilidad de muchas especies de bacilos no fermentadores. En esta técnica, se coloca una parte de un cultivo de caldo de crecimiento activo de 6 a 24 horas que ha sido incubado a 25 °C en el centro de un cubreobjetos 1 que es invertido y suspendido sobre la concavidad de un portaobjetos de depresión. Un enfoque más práctico (preferido por el autor) es extraer un pequeño fragmento del cultivo desarrollado en la superficie de una placa de agar sangre después de 18 a 24 horas y aplicarlo a la superficie de un portaobjetos seco de vidrio. Se agrega una gota de solución salina al inóculo sobre el portaobjetos y se coloca un cubreobjetos sobre la gota. En cualquiera de los métodos los microorganismos se visualizan bajo un objetivo 40 × con una luz reducida para detectar la presencia de motilidad. Se debe diferenciar la verdadera motilidad del movimiento browniano o el flujo de líquido por debajo del cubreobjetos. Las bacterias móviles muestran movimiento direccional y cambios en su posición unas en relación con las otras; cuando el movimiento browniano es la causa de la motilidad, mantienen las mismas posiciones relativas. El uso de tinciones para flagelos (véase protocolo 7-2), que se explican más adelante, también es útil para diferenciar ciertas especies móviles (fig. 7-3).^{1,30,429}

Producción de pigmentos

Los no fermentadores producen ciertos pigmentos, algunos de los cuales son útiles para realizar la identificación de una especie (véase lámina en color 7-1F). Los pigmentos hidrosolubles incluyen carotenoides (amarillo-anaranjado), violaceína (violeta o púrpura) y fenazinas (rojo, marrón, amarillo), que imparten colores definidos a las colonias. Los pigmentos hidrosolubles y difusibles incluyen fluoresceína (pioverdina), piocianina, piorrubina, melamina y otros diversos subproductos de pigmentos que cambian de color el medio de cultivo. Los medios "Tech" y "Flo"³⁹⁸ fueron creados para aumentar la formación de los pigmentos hidrosolubles piocianina y pioverdina (véase lámina en color 7-1G). Estos medios tienen peptonas especiales y una mayor concentración de iones sulfato y magnesio para aumentar la producción de pigmento. King y cols.³⁹⁸ observaron que el tipo de peptona utilizada en el medio basal afectaba mucho la producción de pigmento. La peptona Bacto (Difco Laboratories, Detroit, MI) resultó superior para la producción de piocianina pero tuvo un efecto inhibitorio sobre la elaboración de fluoresceína, mientras que la proteosa peptona 3 (Difco) aumentó la producción de fluoresceína e inhibió la formación de piocianina. El aumento de la concentración de fosfato provoca mayor producción de fluoresceína pero disminuye la producción de piocianina. También se puede aumentar la producción de pigmentos haciendo crecer los microorganis-

Figura 7-3 Bacterias coloreadas con tinciones para flagelos. (A) Tinción para flagelos positiva con flagelos polares (amplificación original, 900x). (B) Tinción para flagelos positiva de bacilos con flagelos peritricos (amplificación original, 900x).



mos en medios que contienen gelatina, patata o leche e inoculándolos a 25 °C a 30 °C. Se puede demostrar pioverdina en agar Flo observando fluorescencia bajo luz ultravioleta (utilizando una lámpara de Wood) o por la aparición de un pigmento amarillo en el medio de cultivo cuando se lo observa con luz visible (véase lámina en color 7-1G y H).

Hidrólisis de la urea

La hidrólisis de la urea se presenta con detalle en el protocolo 6-6. Como muchos de los no fermentadores que hidrolizan urea requieren medios enriquecidos para el crecimiento, se utiliza el agar inclinado-urea de Christensen. Se pueden lograr resultados positivos más rápidamente mediante el empleo de un inóculo importante. Las especies bacterianas, como *Bordetella bronchiseptica*, que hidrolizan ávidamente la urea pueden provocar un cambio de color rojo dentro de las 4 horas; los reactores débiles pueden requerir hasta 48 horas antes de poder visualizar una reacción positiva. La aparición de un tinte rosado, tardío y débil en la porción inclinada superior del medio probablemente indica una degradación inespecífica de los aminoácidos y debe ser leída como un resultado negativo de la prueba (véase lámina en color 7-2A).

Reducción de nitratos

En el protocolo 6-2 se presentan los principios y los procedimientos básicos para realizar la prueba de reducción de nitratos. La reducción de nitratos a nitritos es sólo el primer paso en un proceso bioquímico utilizado por algunos microorganismos para liberar oxígeno: un aceptor final de hidrógeno en el punto terminal del metabolismo oxidativo. La prueba de reducción de nitratos para no fermentadores se realiza en forma similar a la

utilizada para otros microorganismos; el parámetro es la aparición de color rojo al agregar ácido sulfanílico y α -naftilamina a un cultivo durante toda la noche en un medio que contiene nitrato. Si no se observa color rojo, el nitrato no se ha reducido o la reducción ha proseguido más allá del estadio de nitrato hasta la formación de otros compuestos o hasta gas nitrógeno (desnitrificación). La aparición de color rojo con el agregado de una pequeña cantidad de polvo de cinc indica la presencia residual de nitratos, lo que señala un resultado negativo de la prueba; la ausencia de color indica que el nitrato ha sido reducido a compuestos distintos de los nitritos (habitualmente gas nitrógeno), lo que denota que la prueba original fue positiva.

Desnitrificación de nitratos y nitritos

Algunos no fermentadores tienen la capacidad de reducir el nitrato o el nitrito (o ambos) a nitrógeno gaseoso (véase protocolo 7-3). Se puede utilizar el caldo de nitrato-nitrito, con un tubo de Durham invertido o un agar inclinado. Como los medios no contienen hidratos de carbono, cualquier gas que se forma deriva del nitrato o del nitrito, lo que indica una prueba de desnitrificación positiva. Es más fácil interpretar la prueba de caldo porque la recolección de burbujas de gas, habitualmente en las profundidades del extremo, indica un resultado positivo. La mayoría de los medios desnitrificadores contienen tanto nitratos como nitritos. En raros casos (p. ej., en la identificación de *Alcaligenes faecalis*, que desnitrifica los nitritos pero no los nitratos), pueden estar indicadas pruebas separadas de desnitrificación. Existen medios combinados fluorescencia-desnitrificación o fluorescencia-lactosa-desnitrificación; sin embargo, las reacciones pueden variar de las producidas en los medios recomendados por los CDC (véase lámina en color 7-2B).

Producción de indol

En el protocolo 1-4 se presentan los principios básicos y el procedimiento para la identificación de producción de indol. Pueden requerirse modificaciones menores cuando se detecta la producción de indol por ciertos no fermentadores reactivos débiles. Puede ser necesario un medio enriquecido que contiene triptófano, habitualmente caldo de infusión de corazón. Como algunos no fermentadores forman sólo pequeñas cantidades de indol, puede ser útil la extracción de los medios de cultivo formando capas con una pequeña cantidad de xileno o cloroformo sobre la superficie. Se debe ser cuidadoso en agregar sólo una pequeña cantidad de extractor porque incluso una dilución mínima puede disminuir la concentración de indol por debajo de la sensibilidad de detección por el reactivo de Ehrlich o de Kovac. La aparición de color fucsia en la interfaz de la superficie del medio (o el extractor) con el reactivo indica la formación de indol y constituye un resultado positivo de la prueba. Un microorganismo, *Delftia (Comamonas) acidovorans*, produce una reacción de indol "naranja calabaza" definida debido a la formación de ácido antranílico, más que indol, a partir del triptófano (véase lámina en color 7-2C).^{48b}

Descarboxilación

El método de Møller para detectar la descarboxilación de un aminoácido (descrito en el capítulo 6) se basa en un cambio del pH. El desarrollo de un color violeta alcalino en el medio de prueba, luego de la inoculación con el microorganismo de prueba y la incubación a 35 °C durante 24 a 48 horas, constituye un resultado positivo (véase protocolo 6-7). Muchos no fermentadores muestran sólo una actividad débil de descarboxilasa y pueden producir aminas insuficientes como para convertir el sistema indicador de pH. Este posible inconveniente del método de Møller puede superarse utilizando sólo pequeñas cantidades de sustrato (1 a 2 mL) y un inóculo importante de microorganismos que ya han crecido y en el cual ya se ha acumulado una alta concentración de enzimas. La sensibilidad de la detección también se aumenta si se cubre el medio de cultivo con 4 mm de vaselina. Es esencial utilizar controles de sustrato sin aminoácidos, no inoculados, para comparar las reacciones de color. La conversión inicial del medio a un color amarillo a medida que se acumulan ácidos a partir de la pequeña cantidad de glucosa en el medio no se observa con los no fermentadores; antes bien, las reacciones de punto final se leen comparando las reacciones de color violeta alcalinas fuertes con el tinte azul verdoso más claro de los controles (véase lámina en color 7-2D). Los tubos deben incubarse a 35 °C hasta durante 5 días antes de interpretar la reacción como negativa. Otros sistemas que utilizan reactivo de Ninhydrin como indicador pueden ser más sensibles para detectar actividad de descarboxilasa porque el compuesto reacciona directamente con las aminas para formar un color violeta.

Hidrólisis de esculina

La hidrólisis de esculina se utiliza principalmente como característica diferencial para distinguir entre las dos especies de *Brevundimonas* y algunas de las pseudomonas de pigmento amarillo. Se recomienda un medio de esculina sin bilis para evaluar a los no fermentadores, porque algunas especies de no fermentadores son inhibidas por la bilis. La cepa desconocida aislada se siembra en agar inclinado-esculina y el cultivo se incuba a 35 °C durante 24 a 48 horas. La esculina en el medio

da fluorescencia cuando se observa con la lámpara de Wood. Cuando la esculina se hidroliza, el medio vira al negro rojizo y la fluorescencia se pierde, lo que indica un resultado positivo de la prueba (véanse lámina en color 7-2E y protocolo 7-4).

Tinciones para flagelos

Aunque no suele ser necesarias, las tinciones para flagelos en ocasiones son útiles para identificar ciertos bacilos no fermentadores móviles, sobre todo cuando las reacciones bioquímicas son débiles o equívocas.

MÉTODO DE LEIFSON

Se pueden obtener resultados confiables utilizando la técnica de tinción de Leifson, descrita en el protocolo 7-2, si se presta estricta atención a las consideraciones descritas en el recuadro 7-1.^{130,429}

MÉTODO DE RYU

También se recomienda el uso de la tinción para flagelos de Ryu, que es fácil de realizar y brinda buenos resultados.^{410,424} El procedimiento para este método se explica en el protocolo 7-2.

TÉCNICA DE PREPARACIÓN HÚMEDA

Heimbrook y cols.³⁹⁹ describieron el uso de la técnica de la preparación húmeda de Mayfield e Innis⁴⁰³ y la tinción de Ryu⁴⁰⁴ como una forma rápida y simple de tinción de los flagelos. En este enfoque, las bacterias de prueba crecen en un medio no inhibidor durante 16 a 24 horas. Se prepara una suspensión débilmente turbia tocando primero con un palillo aplicador o un alambre una colonia sobre la placa y luego tocando con una gota de agua un portaobjetos. Se coloca un cubreobjetos sobre la gota y se examina el portaobjetos para detectar células móviles. Después de 5 a 10 minutos, o cuando alrededor del 50% de las células están fijadas al portaobjetos o al cubreobjetos de vidrio, se aplican dos gotas de tinción de Ryu

Recuadro 7-1 Consideraciones cuando se prepara una tinción de Leifson

1. Se deben limpiar esmeriladamente los portaobjetos. Estos deben ser enbebidos en dicromato ácido o alcohol etílico (ácido clorhídrico concentrado al 3% en alcohol etílico al 95%) durante 3 a 4 días. La limpieza final se debe hacer inmediatamente antes del uso calentando los portaobjetos en la flama azul de un mechero de Bunsen.
2. Las bacterias deben crecer en un medio sin hidratos de carbono. Un pH bajo puede inhibir la formación de los flagelos y cualquier formación ácida en el medio puede ser perjudicial. El pH de la solución de tinción se debe mantener en 5 o más alto.
3. Las bacterias deben ser teñidas durante la fase logarítmica activa del crecimiento, habitualmente dentro de las 24 o 48 horas. Puede ser necesaria la incubación a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas para promover el desarrollo completo de los flagelos en algunas especies.
4. Se deben tomar precauciones para no transferir el agar al portaobjetos porque puede interferir en la reacción de tinción. El lavado de las bacterias que se van a teñir dos o tres veces en agua (centrifugando ligeramente entre los lavados) antes de agregarlos a los portaobjetos puede ayudar a eliminar los inhibidores que tienen la superficie.

(descritas en el protocolo 7-2) al borde del cubreobjetos y se deja fluir bajo el cubreobjetos por acción capilar. Se examinan las células para detectar la presencia de flagelos después de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.

MORFOLOGÍA DE LOS FLAGELOS

El número y la disposición de los flagelos sobre la célula bacteriana pueden ser un auxiliar en la identificación de las especies. Se pueden observar los siguientes tipos de flagelos según su disposición:

- Polares.
- Monotricos: flagelo único en un polo o en ambos.
- Multitricos: dos o más flagelos en uno o ambos polos.
- Subpolares: flagelos cerca del polo con base de los flagelos en ángulo recto con el eje mayor.
- Laterales: flagelos que se proyectan desde el centro de la célula bacteriana.
- Peritricos: flagelos dispuestos al azar alrededor de la célula.

En la figura 7-3 se muestran bacterias representativas teñidas con tinciones para flagelos.

PARTE II: TAXONOMÍA, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E IMPORTANCIA CLÍNICA DE GÉNEROS DE NO FERMENTADORES RELEVANTES EN MEDICINA

En el espacio disponible aquí es posible proporcionar sólo un resumen de los no fermentadores de importancia médica. Se pueden consultar varias referencias para obtener una explicación más exhaustiva de las características de identificación y los síndromes clínicos causados por este grupo de microorganismos. ^{244,247,257,327,401,545,576,671,802}

A diferencia de las enterobacterias, los bacilos gramnegativos no fermentadores no se ajustan convenientemente a una sola familia de géneros bien caracterizados y la ubicación taxonómica correcta de muchos bacilos gramnegativos no fermentadores no se ha resuelto todavía. En consecuencia, el estudio de los no fermentadores suele ser confuso para el microbiólogo que se inicia. Los principales géneros de bacilos gramnegativos no fermentadores han sido clasificados por lo menos en 15 familias que abarcan *Alcaligenaceae* (*Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Oligella*), *Alteromonadaceae* (*Alishewanella*, *Shewanella*), *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*), *Burkholderiaceae* (*Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Ralstonia*), *Caulobacteraceae* (*Brevundimonas*), *Comamonadaceae* (*Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia*), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium*, *Bergeyella*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Myroides*, *Weeksella*), *Methylobacteriaceae* (*Methylobacterium*, *Roseomonas*), *Moraxellaceae* (*Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*), *Oceanospirillaceae* (*Balneatrix*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Agrobacterium*), *Sphingobacteriaceae* (*Sphingobacterium*, *Pedobacter*), *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*) y *Xanthomonadaceae* (*Stenotrophomonas*).²⁵⁷ Además, existen algunos no fermentadores de importancia clínica que no han sido asignados aún a ninguna familia y cuya posición taxonómica es incierta.

Un enfoque del estudio de los no fermentadores es agruparlos sobre la base de la presencia o la ausencia de motilidad y el tipo de flagelo presente en las cepas que son inmóviles. Con

ese criterio, es posible agrupar a los no fermentadores de importancia médica como se muestra en el recuadro 7-2.

Microorganismos móviles con flagelos polares

Pseudomonadales

El género *Pseudomonas* y algunos géneros estrechamente relacionados, muchos de los cuales se ubicaban antes en el género *Pseudomonas*, constituyen un grupo que a menudo se denomina pseudomonadales. Los miembros de este grupo comparten las características de ser bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvos que son aerobios estrictos; la mayoría de las cepas son móviles por medio de uno o más flagelos polares; utilizan glucosa y otros hidratos de carbono en forma oxidativa; y suelen ser citocromo oxidasa positivos. Las características diferenciales claves del grupo de pseudomonadales se describen en el cuadro 7-3.

Palleroni²⁶⁰ separó los pseudomonadales en cinco grupos por homología de RNA ribosómico sobre la base de los estudios de homología de rRNA-DNA. Gilardi, por otra parte, los separó en siete grupos principales de acuerdo con las características fenotípicas: fluorescentes, stutzeri, alcaligenes, pseudomallei, acidovorans, facilis-delafieldii y diminuta.²⁶⁰ En el recuadro 7-3 se presenta un esquema actualizado que combina algunas de las características de la clasificación genotípica y fenotípica.

Familia Pseudomonadaceae

GÉNERO PSEUDOMONAS –GRUPO rRNA I

Aunque la mayoría de los pseudomonadales fueron clasificados al principio en el género *Pseudomonas*, ahora se sabe que cada uno de los cinco grupos rRNA representa grupos genéticos taxonómicamente distintos y, en consecuencia, se han asignado diferentes nombres de género a cada uno. Sólo los miembros del grupo rRNA I retienen la designación de género de *Pseudomonas*.

Grupo fluorescente. Todas las especies dentro de este grupo se caracterizan por la producción de un pigmento pioverdina hidrosoluble que da fluorescencia blanca a verde azulado bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga (400 nm). La producción de pigmentos fluorescentes aumenta sobre todo en los medios con alta concentración de fosfato.²⁶⁸ Aunque los tres miembros de este grupo producen pioverdina, sólo una especie, *P. aeruginosa*, produce el pigmento hidrosoluble azul definido piocianina (véase lámina en color 7-1G). Las características bioquímicas claves que separan a los miembros del grupo fluorescente se presentan en el cuadro 7-4.

Pseudomonas aeruginosa produce un aspecto característico cuando crece en una placa de agar sangre. Aparece como grandes colonias grises con una periferia en expansión y muestra β -hemólisis. Las colonias a menudo tienen aspecto de piel de caimán y muestran un brillo metálico (lámina en color 7-2F). Se puede hacer una identificación rápida de *P. aeruginosa* en cultivo siempre que se observen las siguientes características: una morfología típica de las colonias (lámina en color 7-2F), producción de pigmentos difusibles (lámina en color 7-2G), olor a fruta y positividad de oxidasa (recuadro 7-4).³²⁹ En ocasiones, hemos observado cepas que producen un olor picante a "patatas podridas". Existe al menos una comunicación de un brote hospitalario causado por cepas de *P. aeruginosa* maloliente.⁴¹⁷

P. aeruginosa es el pseudomonadal que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas. La infección por *P. aeruginosa* prevalece especialmente en los pacientes con quemaduras,

Recuadro 7-2 No fermentadores de importancia médica

Móviles con flagelos polares	Género <i>Kersteria</i> Género <i>Oligella</i> (<i>O. ureolytica</i>) Familia <i>Rhizobiaceae</i> Género <i>Rhizobium</i> Familia <i>Brucellaceae</i> Género <i>Ochrobactrum</i> Familia <i>Halomonadaceae</i> Género <i>Halomonas</i>
	Inmóviles, oxidasa positivos
Familia <i>Pseudomonadaceae</i> (grupo rRNA I) Género <i>Pseudomonas</i> Familia <i>Burkholderiaceae</i> (grupo rRNA II) Género <i>Burkholderia</i> Género <i>Cupriavidus</i> Género <i>Lautropia</i> Género <i>Pandoraea</i> Género <i>Ralstonia</i> Familia <i>Comamonadaceae</i> (grupo rRNA III) Género <i>Comamonas</i> Género <i>Acidovorax</i> Género <i>Delftia</i> Familia <i>Caulobacteraceae</i> (grupo rRNA IV) Género <i>Brevundimonas</i> Familia <i>Xanthomonadaceae</i> (grupo rRNA V) Género <i>Stenotrophomonas</i> Familia <i>Sphingomonadaceae</i> Género <i>Sphingomonas</i> Familia <i>Oceanospirillaceae</i> Género <i>Balneatrix</i> Familia <i>Alteromonadaceae</i> Género <i>Alishewanella</i> Género <i>Shewanella</i> Familia <i>Oxalobacteraceae</i> Género <i>Herbaspirillum</i> Género <i>Massilia</i> Familia <i>Methylobacteriaceae</i> Género <i>Methylobacterium</i> Género <i>Roseomonas</i> Microorganismos de ubicación taxonómica incierta Grupos de importancia clínica, O-1, O-2, O-3, Vh-3 de los CDC	Familia <i>Flavobacteriaceae</i> Género <i>Flavobacterium</i> Género <i>Bergeyella</i> Género <i>Chryseobacterium</i> Género <i>Empedibacter</i> Género <i>Myxobolus</i> Género <i>Weeksella</i> Familia <i>Sphingobacteriaceae</i> Género <i>Sphingobacterium</i> Género <i>Prothobacter</i> Familia <i>Moraxellaceae</i> Género <i>Moraxella</i> Género <i>Psychrobacter</i> Familia <i>Neisseriaceae</i> Género <i>Neisseria</i> Familia <i>Alcaligenaceae</i> Género <i>Oligella</i> (<i>O. urethralis</i>) Familia <i>Rhodobacteraceae</i> Género <i>Panicoccus</i> (EO-2) Microorganismos de ubicación taxonómica incierta Grupos EO-3, EO-4, EF-4b de los CDC Grupos IIc, IIc, IIg, IIIc, III de los CDC Grupo I de bacilos de Gilardi
Móviles con flagelos peritricos	Inmóviles, oxidasa negativos
Familia <i>Alcaligenaceae</i> Género <i>Achromobacter</i> Género <i>Alcaligenes</i> Género <i>Bordetella</i> (<i>B. avium</i>, <i>B. bronchiseptica</i>, <i>B. hinzii</i>, <i>B. trematum</i>)	Familia <i>Moraxellaceae</i> Género <i>Acinetobacter</i> Familia <i>Alcaligenaceae</i> Género <i>Bordetella</i> (<i>B. pertussis</i>, <i>B. parapertussis</i>, <i>B. trematum</i>) Microorganismos de ubicación taxonómica incierta Grupo NO-1 de los CDC Grupo EO-5 de los CDC

fibrosis quística, leucemia aguda, trasplantes de órganos y adicción a drogas intravenosas.⁶⁰ Las infecciones suelen ocurrir en cualquier sitio donde tiende a acumularse la humedad: traqueostomías, catéteres permanentes, quemaduras, el oído externo ("oído de nadador") y heridas cutáneas rezumantes. La exudación de pus azulado, con olor similar a las uvas por la producción de piceanina, es característica. *P. aeruginosa* también provoca infecciones de las vías urinarias y las vías respiratorias altas; estas últimas pueden ser graves e incluso potencialmente mortales en los huéspedes inmunodeprimidos. El microorganismo también puede causar infecciones devastadoras del ojo. La queratitis, la infección de úlceras corneanas y la endoftalmitis por pseudomonas deben abordarse como emergencias médicas que pueden ser fulminantes y provocar la pérdida permanente de la visión. Se presentan con frecuencia regular en la

literatura especializada casos de endocarditis, meningitis, absceso encefálico e infecciones de huesos y articulaciones por la propagación hematológica.⁶⁰ La mayoría de los casos de endocarditis requieren un reemplazo valvular porque es difícil erradicar la infección.⁶² Están bien descritos los brotes de dermatitis y otitis externa por *P. aeruginosa* asociados con el uso de piscinas y bañeras calientes. Los CDC comunicaron al menos 75 casos durante seis brotes que ocurrieron entre 1997 y 1998.⁴⁷ También se han comunicado infecciones esporádicas por *P. aeruginosa* luego de la perforación de las orejas.³¹

P. aeruginosa produce varias sustancias que se cree que aumentan la colonización y la infección del tejido del huésped.⁶⁰ Estas sustancias, junto con distintos factores de virulencia, entre ellos, lipopolisacárido (LPS), exotoxina A, leucocidina, fango extracelular, proteasas, fosfolipasa y otras diversas

Cuadro 7-3 Características claves de los pseudomonas

	OXIDASA	MOTILIDAD	PROVERDINA	ANILILLO	GLUCOSA	MALTOSA	LACTOSA	MANTOL	ARGININA	LISINA	NO ₂ -NO ₃	NO ₂ -N ₂	UREA	ONPG	DNASA	ACTAMIDA	ESCUJINA	H ₂ EN KIA	POLIMIXINA
Género Pseudomonas																			
Grupo fluorescente																			
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	S
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S
<i>P. putida</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S
Grupo Stutzeri																			
<i>P. stutzeri</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	S
<i>P. mendocina</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	S
Grupo CDC Vh-3																			
<i>P. alcaligenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	-	S
<i>P. pseudocataligenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	-	S
Especies de Pseudomonas grupo I																			
Grupo con pigmento amarillo																			
<i>P. luteola</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	S
<i>P. arizababians</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	S
Género Burkholderia																			
<i>B. pseudomallei</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	R
Complejo <i>B. cepacia</i>	w	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	R
<i>B. gladioli</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	R
Género Ralstonia																			
<i>R. pickersli</i> Va-1	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	R
<i>R. pickersli</i> Va-2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	R
<i>R. mannitolilytica</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	R
Género Delfia																			
<i>D. acidovorans</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	S
Género Brevundimonas																			
<i>B. diminuta</i>	+	+	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V
<i>B. vesicularis</i>	+	+	-	+	w	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	S
Género Stenotrophomonas																			
<i>S. maltophilia</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	S
Género Shewanella																			
<i>S. algae</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	S
<i>S. putrefaciens</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	S
Género Spingomonas																			
<i>S. polysaccharilytica</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	S

+: 90% o más cepas positivas; -: 90% o más cepas negativas; V: 11-80% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; w: reacción positiva débil; S: sensible; R: resistente; ONPG: ortonitrofenil-β-D-galactopiranosida. Las reacciones claves están sombreadas. Datos tomados de la referencia³⁰.

Recuadro 7-3 Clasificación fenotípica de pseudomonadales (bacilos no fermentadores con flagelos polares)**Grupo RNA I**

Grupo fluorescente

*Pseudomonas aeruginosa**Pseudomonas fluorescens**Pseudomonas putida*

Grupo Stutzeri

*Pseudomonas stutzeri**Pseudomonas mendocina*

Grupo Yb-3 de los CDC

Grupo Alkaligenes

*Pseudomonas alcaligenes**Pseudomonas pseudoalcaligenes*Grupo I de especies de *Pseudomonas***Grupo rRNA II**Grupo *Pseudomallei* (grupo resistente a la colistina)*Burkholderia mallei**Burkholderia pseudomallei*Complejo *Burkholderia cepacia**Burkholderia gladii*Especies de *Pandoraea*Especies de *Ralstonia*Especies de *Cupriavidus***Grupo rRNA III**

Grupo oxidante débil

*Comamonas acidovorans**Comamonas terrigena**Comamonas testosteroni**Acidovorax delafieldii**Acidovorax facilis**Acidovorax temperans**Lautropia mirabilis*

WO-1 de los CDC

Grupo rRNA IV

Grupo Diminuta

*Brevundimonas diminuta**Brevundimonas vesicularis***Grupo rRNA V***Stenotrophomonas maltophilia***Grupo con pigmento amarillo***Pseudomonas luteola**Pseudomonas oryzihabundans**Sphingomonas paucimobilis***Grupo H₂S positivo***Shewanella putrefaciens**Shewanella algae***Grupo halófilico***Alishewanella ferulalis**Halomonas venusta*

Grupo I de no fermentadores halófilicos de los CDC

enzimas (recuadro 7-5), convierten a *P. aeruginosa* en la bacteria de mayor importancia clínica entre los bacilos gramnegativos no fermentadores. Se recupera con frecuencia un morfotipo mucoso inusual de *P. aeruginosa* de las secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística que tienen infecciones crónicas por *P. aeruginosa* (véase lámina en color 7-2H). El morfotipo mucoso se debe a la producción de grandes cantidades de un polisacárido (denominado alginato) que rodea a la célula, el cual es responsable del mal pronóstico y de las altas tasas de mortalidad en los pacientes con fibrosis quística. Existen revisiones extensas de este tema.^{233,492,518}

El tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* puede ser difícil. Un espectro relativamente estrecho de antibióticos es eficaz e incluye las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), las ureidopenicilinas (mezlocilina, piperacilina), las cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima), los monobactámicos (aztreonam), los carbapenémicos (imipenem, meropenem), las quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina) y los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina). Casi todas las cepas son resistentes a otras penicilinas y a cefalosporinas, incluidas ampicilina, cefuroxima y cefotaxima.^{233,491} *P. aeruginosa* puede portar plásmidos de multiresistencia y esta característica ha conducido a la aparición de algunas cepas resistentes a todos los antibióticos eficaces.⁴⁹¹

P. fluorescens y *P. putida* aparecen en el agua y el suelo y pueden existir en fuentes acuosas en el ambiente hospitalario. Ambos pueden existir como flora faríngea normal y son patógenos oportunistas raros en los seres humanos. Se ha comunicado que *P. putida* produce sepsis relacionada con catéteres en pacientes con cáncer^{10,496} y artritis séptica.^{466,469} Ambas especies han sido asociadas con bacteriemia por sangre transfundida.^{319,321,605,672,726,733} Tienen importancia creciente las comunicaciones de seudobacteriemias por *P. fluorescens*, la presencia de hemocultivos positivos en ausencia de bacteriemia verdadera y cualquier síntoma relacionado, más a menudo atribuidos a catéteres y dispositivos vinculados a catéteres contaminados.^{327,609}

Grupo Stutzeri. Los microorganismos del grupo Stutzeri son todos desnitrificadores del suelo y pueden crecer en condiciones anaerobias en medios que contienen nitratos, con producción de gas nitrógeno. Las cepas se movilizan por medio de flagelos monotricos polares y pueden crecer con NH₃ como única fuente de nitrógeno y acetato como única fuente de carbono para obtener energía. En el cuadro 7-5 se describen las características que diferencian a los miembros de este grupo.

P. stutzeri (antes grupo Vb-1 de los CDC) es ubicuo en el suelo y el agua y ha sido recuperado de humus, estiércol, paja, aguas cloacales, agua estancada, fórmulas para lactantes, equipamiento hospitalario, cosméticos para ojos y distintas muestras clínicas.^{243,250,570} Sólo pocas veces se ha asociado con infecciones, como otitis media,²⁴³ conjuntivitis,⁵⁷⁰ neumonía,^{97,100,553} artritis séptica,⁴⁶⁸ endocarditis,⁶³⁰ meningitis en un paciente HIV positivo,⁴³⁴ infecciones de injertos vasculares sintéticos,²³⁸ infecciones de heridas traumáticas^{243,253} y osteomielitis vertebral.⁶¹⁹ Es sensible a la mayoría de los antibióticos. Las colonias recién aisladas son adherentes y tienen un aspecto rugoso característico (véase lámina en color 7-3A), que se puede perder después del subcultivo repetido en el laboratorio. *P. stutzeri* comprende un conjunto heterogéneo de cepas que incluye al menos 10 grupos genómicos sin una condición taxonómica denominados genomovariedades.^{129,233,646,649,677} Sin embargo, los genomovariedades *P. stutzeri* se caracterizan por un alto nivel de heterogeneidad de las propiedades fenotípicas, que no permite dividir los taxones en diferentes especies.^{646,647,648} Sólo

Cuadro 7-4 Características claves del grupo fluorescente

PRUEBA	<i>P. AERUGINOSA</i>	<i>P. FLUORESCENS</i>	<i>P. PUTIDA</i>
Pterverdina	+	+	+
Piocianina	+	-	-
Acetamida	V	-	-
Crecimiento a 42 °C	+	-	-
Reducción de NO ₃	V (74)	V (19)	-
Hidrólisis de gelatina	V (46)	+	-

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas. Datos tomados de la referencia¹⁷⁹.

una de las genomovariedades descritas de *P. stutzeri* ha sido reclasificada y publicada con validez, como la nueva especie *Pseudomonas balearica*.³⁸ No se ha comunicado aún el aislamiento clínico de *P. balearica* en humanos.

P. mendocina (antes grupo Vb-2 de los CDC) y la especie sin nombre del grupo Vb-3 de los CDC pocas veces se aíslan de muestras clínicas. Las colonias de *P. mendocina* son lisas y tienen el aspecto y la consistencia de la manteca. Se ha comunicado un caso de cada uno de endocarditis de válvula mitral en un paciente con reemplazo de válvula aórtica²¹ y endocarditis de válvula tricúspide en un paciente con un defecto cardíaco congénito.³⁶⁷ Las cepas del grupo Vb-3 de los CDC se asemejan a *P. stutzeri* salvo en que son arginina positivos. Potvliege y cols.¹⁹² han comunicado un caso de septicemia por Vb-3 en un paciente con mieloma múltiple.

Grupo Alcaligenes. Los microorganismos del grupo Alcaligenes se caracterizan por ser asacarolíticos o sólo débilmente sacarolíticos en el medio de glucosa OF. Los miembros de este grupo son *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes* y especies de *Pseudomonas* del grupo I de los CDC. Las últimas especies sin nombre son similares a *P. alcaligenes*, salvo en que las cepas de especies de *Pseudomonas* del grupo I reducen tanto nitrato como nitrito a gas.³⁹⁰ En el cuadro 7-6 se detallan las caracte-

rísticas que diferencian este grupo de otras pseudomonas alcalinas similares. Aunque los miembros de este grupo se recuperan de muestras clínicas, sólo se ha comunicado pocas veces su capacidad para actuar como patógenos humanos. Hubo infor-

Cuadro 7-5 Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Factor de virulencia	Actividad biológica
Alginate	Polisacárido capsular que permite a las bacterias infectantes adherirse a las superficies de las células epiteliales pulmonares y formar biopelículas que, a su vez, protegen a las bacterias de los antibióticos y el sistema inmune del cuerpo.
Pili	Apéndices de superficie que permiten la adherencia del microorganismo a los receptores del gangliósido GM-1 sobre las superficies de las células epiteliales del huesped.
Neuraminidasa	Elimina los residuos de ácido siálico de los receptores del gangliósido GM-1, lo que facilita la unión de los pili.
Lipopolisacárido	Produce endotoxina, causa síndrome de sepsis: fiebre, shock, oliguria, leucopenia o leucocitosis, coagulación intravascular diseminada, anomalías metabólicas.
Exotoxina A	Destrucción tisular, inhibición de la síntesis proteica; interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos.
Enterotoxina	Interrumpe la actividad gastrointestinal normal y provoca diarrea.
Exoenzima S	Inhibe la síntesis proteica.
Fosfolipasa C	Destruye la membrana citoplasmática; destruye la sustancia tensioactiva pulmonar; inactiva las opsoninas.
Elastasa	Escinde las inmunoglobulinas y los componentes del complemento, interrumpe la actividad de los neutrófilos.
Leucocidina	Inhibe la función de neutrófilos y linfocitos.
Piocianinas	Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios; produce daño oxidativo de los tejidos, sobre todo de los tejidos oxigenados como el pulmón.

Cuadro 7-4 Requerimientos mínimos para la identificación definitiva de *P. aeruginosa*

Identificación basada en todas las siguientes características:

1. Bacilo gramnegativo
2. Oxidasa positivo
3. Olor típico (olor frutal similar a uvas o tortilla de maíz)
4. Morfología reconocible de las colonias
 - a. En agar sangre o agar chocolate aparecen como colonias grandes con brillo metálico, mucoides, rugosas o pigmentadas (piocianina) y a menudo β-hemolíticas (lámina en color 7-2F).
 - b. En agar de MacConkey aparecen como lactosa negativas con pigmentación verde o brillo metálico (lámina en color 7-2G).

Limitaciones:

1. Algunas cepas de *Acromonas* pueden asemejarse a *P. aeruginosa* (con ausencia del olor típico) pero son indol positivas (*P. aeruginosa* es indol negativa).
2. Algunas cepas de *Burkholderia cepacia* de pacientes con fibrosis quística pueden mostrar morfotipos que se asemejan a *P. aeruginosa*.

Datos tomados de la referencia¹⁷⁹.

Cuadro 7-5 Características claves del grupo Stutzeri

PRUEBA	<i>P. STUTZERI</i> VB-1	<i>P. MENDOCINA</i> VB-2	GRUPO VB-3 DE LOS CDC
Oxidasa	+	+	+
Glucosa OF	A	A	A
Maltosa OF	A	-	A
Lactosa OF	-	-	-
Manitol OF	V (70)	-	A
Reducción de NO ₂	+	+	+
NO ₂ a gas	+	+	+
Arginina	-	+	+
Lisina	-	-	-
Hidrólisis de almidón	+	-	V (75)
Polimixina B	S	S	S
Colonias arrugadas	+	-	-

+; 90 % o más de cepas positivas; -; 90% o más de cepas negativas; V; 11-89% de cepas positivas; ++; reacción positiva fuerte; A; reacción débil; S; sensible; OF; oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas. Datos tomados de la referencia¹⁰⁰.

mes de *P. alcaligenes* que producen infecciones oculares, empiema y un caso de endocarditis mortal.⁷⁵⁰

Grupo con pigmento amarillo

***Pseudomonas luteola*.** Esta especie ha sido conocida antes como *Chromobacterium typhiflavum*, grupo Ve-1 de los CDC, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas polytricha* y *Chryseomonas luteola*.³³² La ubicación taxonómica se resolvió en 1997 cuando la especie fue ubicada nuevamente en el género *Pseudomonas*.¹⁴ *P. luteola* es móvil por medio de flagelos polares multitricos, es oxidasa negativo, crece tanto en medio de agar de MacConkey como en agar sangre y produce colonias con pigmentación amarilla que a menudo son rugosas y adherentes al agar (véase lámina en color 7-3B). Las características bioquímicas que diferencian *P. luteola* de otros pseudomonadales con pigmento amarillo se describen en el cuadro 7-11. Es una cepa clínica rara y ha sido aislada de distintas muestras clínicas, como muestras de heridas, cuello uterino, orina y faringe.²⁵⁰ Las cepas recuperadas de muestras clínicas en el University of Illinois Hospital han sido aisladas en córnea, esputo, miembros inferiores, cavidad endometrial y sangre. A menudo se aísla con otros microorganismos y se juzga que no tiene importancia clínica. En un estudio, sólo se hallaron 14 cepas de *P. luteola* entre 565 aislamientos clínicos de no fermentadores en un periodo de dos años.⁵⁷⁰ Las comunicaciones de infecciones graves producidas por *P. luteola* incluyen bacteriemia,^{59,123,154,210,225,608,612} endocarditis,³⁴⁹ meningitis,^{123,415} ulceración de las piernas,⁷⁴⁶ osteomielitis⁶⁰⁸ y peritonitis.^{148,618}

***Pseudomonas oryzihabitans*.** Este microorganismo ha sido descrito antes como *Chromobacterium typhiflavum*, *Pseudomonas oryzihabitans*, grupo Ve-2 de los CDC y *Flavimonas oryzihabitans*.³³² La ubicación taxonómica se resolvió en 1997 cuando las especies fueron ubicadas nuevamente en el género *Pseudomonas*.¹⁴ *P. oryzihabitans* tiene características similares a *Chryseomonas luteola* ya que estos microorganismos también son móviles y oxidasa negativos y forman colonias con pigmentación amarilla en agar sangre. Al igual que *P. luteola*, las colonias de *P. oryzihabitans* son rugosas. Este microorganismo puede ser diferenciado de *P. luteola* por las reacciones negativas para hidrólisis esculina y ortonitrofenil- β -D-galacto-

piranósido (ONPG) y la característica de tener un solo flagelo polar. En el cuadro 7-11 se señalan otras características diferenciales. *P. oryzihabitans* también ha sido aislado en distintos sitios clínicos, como heridas, esputo, oído, ojo, orina, líquido peritoneal, equipamiento para terapia inhalatoria y sangre.^{225,252,400,430,441,593,608} Más recientemente, las infecciones por este microorganismo se han relacionado con la presencia de un catéter intravascular en pacientes inmunodeprimidos.^{462,481,636,772}

En el University of Illinois Hospital, se lo aisló en esputo, orina, secreción prostática, piel y sangre. También parece ser un patógeno emergente en la peritonitis relacionada con la diálisis peritoneal ambulatoria continua, con varios casos recién publicados.^{9,57,211,212,692} Otros factores predisponentes para las infecciones por *P. oryzihabitans* son los catéteres intravasculares permanentes, los injertos artificiales, el abuso de drogas intravenosas, el traumatismo de cráneo grave que requiere cirugía y el trasplante de médula ósea.¹¹⁶

Familia Burkholderiaceae

GRUPO rRNA II

El grupo rRNA II consiste en microorganismos ubicados en los géneros *Burkholderia*,^{258,834} *Ralstonia*,⁸²⁵ *Pandoraea*¹³³ y *Cupriavidus*.^{752a} y denominados en el pasado grupo *Pseudomallei*. Todas las especies de este grupo se separan con facilidad de otros grupos de pseudomonadales por la propiedad de mostrar resistencia al grupo de antibióticos de polimixina (polimixina B y colistina). En los cuadros 7-7, 7-8 y 7-9 se describen las características bioquímicas utilizadas para distinguir a los miembros de este grupo, el cual comprende muchas especies, algunas asociadas con plantas. En este libro sólo se incluyen las asociadas con enfermedad humana. Dos de las especies patógenas, *B. pseudomallei* y *B. mallei*, son mencionadas como agentes de amenaza biológica categoría B por el Grupo de Trabajo de Planificación Estratégica de los CDC debido a su disponibilidad y potencial para ocasionar enfermedades con alta morbilidad.⁶⁵¹

GÉNERO BURKHOLDERIA -GRUPO PSEUDOMALLEI

B. mallei es un parásito estricto de los animales (fundamentalmente caballos, mulas y burros) que causa una infección del aparato respiratorio conocida como muermo. La forma aguda

Cuadro 7-6 Características claves de los pseudomonadales alcalinos^a

PRUEBA	COMAMONAS				DELFTIA	PSEUDOMONAS		BREVUNDIMONAS	
	<i>C. terrigena</i>	<i>C. aquatica</i>	<i>C. kersterii</i>	<i>C. testosteroni</i>	<i>D. acidovorans</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. pseudo-Alcaligenes</i>	<i>B. diminuta</i>	<i>B. vesicularis</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	+	ND	ND	+	+	+	+	+	V (26)
Glucosa OF	Ale	Ale	Ale	Ale	Ale	Ale	Débil (19)	Débil (29)	Débil (57)
Fructosa OF	Ale	Ale	Ale	Ale	A	Ale	A	Ale	Ale
Manitol OF	Ale	Ale	Ale	Ale	A	Ale	Ale	Ale	Ale
Reducción de NO ₃	+	+	+	+	+	V (61)	+	-	-
NO ₃ a gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	V (58)	V (38)
Hidrólisis de esulina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	V (16)	-	-	+
Hidrólisis de tirosina	+	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
DNasa	-	ND	ND	-	-	-	-	V (12)	-
Acetamida	-	ND	ND	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	Naranja ^a	-	-	-	-
PYR ^c	+	-	-	+	+	-	-	V (12)	-
Sensibilidad a 250 µg de desferoxamina ^d	S	S	S	R	R	V	V	S (92)	S
Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Asimilación en API ID 32 GN de:									
3-hidroxibenato	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
4-hidroxibenato	-	V	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
L-alanina	+	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
Crecimiento a 42 °C	-	-	+	-	V (8)	V (48)	V (75)	V (19)	-
Disposición de los flagelos	Penachos polares o bipolares, longitud de onda larga (3,0 µm)				Polar único, longitud de onda normal (1,5 µm)				Polar único, longitud de onda corta (0,5 µm)

^aDatos tomados de las referencias^{10,11}.^bSe desarrolla un color naranja colabazca con el agregado de reactivo de Kovacs debido a la formación de ácido antranílico a partir del triptófano.^cDatos de PYR tomados de Leffineur K y cols.¹²^dProcedimiento de Laidlaw para Laidlaw JA y Riley TY¹³.

+; 90% o más de cepas positivas; -; 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; A: reacción ácida; Débil: ácido débil; R: resistente. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-7 Características claves de *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei* y *P. stutzeri*

PRUEBA	<i>P. STUTZERI</i>	<i>B. PSEUDOMALLEI</i>	<i>B. MALLEI</i>
Oxidasa	+	+	V
Motilidad	+	+	-
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	V
Glucosa OF	A	A	A
Maltosa OF	A	A	V
Lactosa OF	-	A	V
Manitol OF	V	A	V
Reducción de NO ₃	+	+	+
NO ₃ a gas	+	+	-
Arginina	-	+	+
Lisina	-	-	-
Hidrólisis de almidón	+ (92)	-	ND
Polimixina B	S	R	R
Colonias rugosas	+	+	-
Pigmento	Gris o ligeramente amarillo	Crema o testado	Gris

+: 90 % o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; A: reacción débil; S: sensible; R: resistente; ND: no disponible; OF: oscilación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.
 Datos tomados de las referencias^{158,160}.

de la enfermedad puede matar a un caballo en un par de semanas. En raros casos, se puede transmitir a los seres humanos, habitualmente a través de una abrasión de la piel.⁷⁸⁰ En 2000 ocurrió un caso de muermo adquirido en el laboratorio.¹¹⁰ El muermo comparte con el carbunco y con la peste la "distinción" de su uso en la guerra. Existe documentación de que *B. mallei* fue utilizado como agente para la guerra biológica en la Primera Guerra Mundial.³⁰⁵ *B. mallei* es un pequeño cocobacilo gramnegativo. En agar sangre de carnero aparece como colonias translúcidas grises y lisas en 2 días, sin ningún pigmento ni color característico. Es la única especie inmóvil en el género. En el cuadro 7-7 se presentan otras características diferenciales.

B. pseudomallei causa la melioidosis, una enfermedad similar al muermo en los animales y los seres humanos (recuadro 7-6). A partir de los resultados de rRNA y DNA-DNA obtenidos por Yabuuchi y cols, es evidente que *B. mallei* y *B. pseudomallei* pertenecen a una única genomoespecie, pero se ha propuesto mantener estas dos especies separadas por razones epidemiológicas y zoonóticas.¹²⁴ *B. pseudomallei* crece bien en medios de laboratorio estándares y a menudo produce colonias rugosas y, por lo tanto, puede ser morfológicamente semejante a *P. stutzeri*. El microorganismo tiene un nicho ecológico y existe en el suelo y en el agua estancada en un área de latitudes 20° al norte y al sur del Ecuador, fundamentalmente en Tailandia, Vietnam y partes del norte de Australia.^{153,160} Algunos informes recientes confirman que es endémico en China, Taiwán y Laos, pero se desconoce la verdadera incidencia en la mayoría de los países.^{158,164} Se han comunicado muy pocos casos de melioidosis en el subcontinente de la India, a pesar de las similitudes en las condiciones ambientales con los países del sudeste asiático, aunque en 1999 se comunicó un caso de absceso encefálico y pulmonar por melioidosis después de un viaje a Sri Lanka.³⁷² La mayoría de las infecciones son asintomáticas o se presentan como una enfermedad gripal autolimitada y breve que sólo se puede diagnosticar mediante serología.³¹ Se calcula que miles de miembros del personal militar de los Estados Unidos se infectaron por *B. pseudomallei* cuan-

do cumplían servicio en el sudeste asiático en las décadas de 1960 y 1970. Algunos estudios serológicos han puesto en evidencia títulos positivos para este microorganismo en el 1-9% de los soldados de los Estados Unidos que regresaron de Vietnam.^{131,402,710} Por lo tanto, si se estima en unos 3 millones el personal militar que sirvió en Vietnam desde 1965 hasta 1973, 250 000 pueden haberse infectado con *B. pseudomallei*.¹¹³ Una característica importante de esta enfermedad es su capacidad para producir una infección latente que se puede reactivar muchos años después de la exposición primaria. Por esta razón, la melioidosis ha sido apodada la "bomba de tiempo vietnamita" porque es posible que aún la enfermedad se esté incubando en los veteranos norteamericanos del conflicto de Vietnam.^{267,513}

Las infecciones se adquieren por el contacto con el microorganismo ya sea por inhalación de polvo o por contacto directo a través de lesiones en la piel. Se describieron tres formas de melioidosis: 1) enfermedad aguda, que se presenta como septicemia con lesiones metastásicas; 2) enfermedad semiaguda, que se presenta como una neumonía similar a la tuberculosis con celulitis y linfangitis y 3) enfermedad crónica, que se presenta como una celulitis crónica localizada (recuadro 7-6). Existe una comunicación de linfadenitis y mediastinitis por *B. pseudomallei* en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica.¹⁹⁸ Se ha demostrado que la diabetes mellitus es un factor de riesgo para el desarrollo de melioidosis bacteriémica.⁷²³ Es importante tratar los casos sospechosos con antibióticos antes de cualquier tratamiento de los pacientes, como lesiones que drenan, para evitar la sepsis. La mortalidad es del 95% en los pacientes con enfermedad aguda que no son tratados. *B. pseudomallei* es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos, entre ellos, penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, macrólidos, rifamicinas, colistina y aminoglucósidos.^{161,204} En general, es sensible a cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol, ureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos e (inusual para una pseudomona) amoxicilina-clavulanato.^{801,829} Las fluoroquinolonas tienen sólo actividad débil y han resultado muy desa-

Recuadro 7-6 Epidemiología, diagnóstico, tratamiento, prevención e informe de la melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*)**Epidemiología**

- La melioidosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Burkholderia pseudomallei*.
- Desde el punto de vista clínico y patológico es similar al muermo causado por *Burkholderia mallei*.
- La melioidosis es predominantemente una enfermedad de los climas tropicales, sobre todo del sudeste asiático, donde es endémica, con la máxima concentración de casos comunicados en Vietnam, Camboya, Laos, Tailandia, Myanmar (Birmania) y norte de Australia.
- Las bacterias que causan melioidosis se encuentran en agua y suelo contaminados. La infección se adquiere por la inhalación de polvo, la ingestión de agua contaminada y el contacto con suelo contaminado especialmente a través de abrasiones cutáneas y en las tropas militares, por la contaminación de heridas de guerra. Puede ocurrir transmisión persona a persona.
- El muermo es contraído por los seres humanos a través de animales domésticos infectados.
- *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia mallei* se consideran agentes potenciales para la guerra biológica y el terrorismo biológico.

Hallazgos clínicos

- Se describen cuatro presentaciones clínicas de la melioidosis:
 - **Infección aguda localizada:** esta forma de infección suele ser localizada como un nódulo y es el resultado de la inoculación a través de una herida en la piel. La forma aguda puede provocar fiebre y dolores musculares generales y progresar rápidamente para infectar el torrente circulatorio.
 - **Infección pulmonar:** esta forma de la enfermedad puede producir un cuadro clínico de bronquitis leve a neumonía grave. En los casos típicos, el inicio de la melioidosis pulmonar se acompaña por fiebre alta, cefalea, anorexia y dolor muscular intenso. El dolor torácico es frecuente, pero una tos no productiva o productiva con esputo normal es el sello de esta forma de melioidosis.
 - **Infección aguda del torrente circulatorio:** los pacientes con enfermedad subyacente como HIV, insuficiencia renal y diabetes son afectados por este tipo de la enfermedad, que suele producir shock séptico. En general, los síntomas son dificultad respiratoria, cefalea intensa, fiebre, diarrea, lesiones cutáneas llenas de pus, dolor muscular al tacto y desorientación. En los casos típicos es una infección de corta duración y los abscesos se encuentran en todo el cuerpo.
 - **Infección supurada crónica:** la melioidosis crónica es una infección que afecta los órganos del cuerpo, que en los casos típicos incluyen articulaciones, vísceras, ganglios linfáticos, piel, cerebro, hígado, pulmón, huesos y bazo.
- El período de incubación (tiempo entre la exposición y la aparición de síntomas clínicos) no está definido con claridad, pero puede oscilar desde 2 días hasta varios años.

Pruebas de laboratorio

- Se pueden observar microorganismos que aparecen como pequeños bacilos gramnegativos en la tinción de Gram directa de muestras respiratorias o materiales de abscesos.
- Se puede aislar *Burkholderia pseudomallei* de sangre, orina, esputo o lesiones cutáneas utilizando medios de laboratorio convencionales incubados a 35 a 37 °C en atmósfera ambiente.
- La detección y la medición de los anticuerpos contra las bacterias en la sangre son otro medio de diagnóstico.

Tratamiento recomendado

- En las infecciones agudas o crónicas, se recomienda la administración parenteral de imipenem o ceftazidima durante 2-4 semanas seguida del tratamiento oral con amoxicilina-clavulanato o una combinación de doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol durante 3-6 meses.³⁴⁴
- El tratamiento debe iniciarse temprano en el curso de la enfermedad. Aunque la infección del torrente circulatorio con melioidosis puede ser mortal, los otros tipos de la enfermedad no lo son.

Prevención y comunicación

- No existe ninguna vacuna contra la melioidosis.
- La prevención de la infección en las áreas endémicas para la enfermedad puede ser difícil, ya que el contacto con suelo contaminado es muy frecuente. Las personas que presentan diabetes y lesiones cutáneas deben evitar el contacto con suelo y agua estancada en estas áreas. El uso de botas durante el trabajo agrícola puede evitar la infección a través de los pies y las piernas.
- Se han documentado infecciones adquiridas en el laboratorio. En ambientes de asistencia de la salud, el uso de precauciones comunes para la manipulación de sangre y líquidos corporales puede evitar la transmisión.
- Todas las muestras de los pacientes y los cultivos deben ser manipulados con el uso de guantes y batas en un gabinete de bioseguridad. Las placas deben ser cerradas con cinta cuando son incubadas. La "aspiración" de placas que contienen *B. pseudomallei* es peligrosa y debe evitarse.
- Todos los posibles casos de melioidosis deben informarse a las autoridades sanitarias.

Tomado de los CDC (http://www.cdc.gov/ncidod/dmd/diseases/melioidosis_g.htm) y la American Society for Microbiology (<http://www.asm.org/policy/index.asp?bid=6342>).

lentadoras en los ensayos clínicos.^{341,345} Este perfil antibiótico atípico (es decir, resistente a gentamicina y colistina, y sensible a amoxicilina-clavulanato) en un bacilo gramnegativo oxidasa positivo es útil para confirmar la identificación de *B. pseudomallei* en el laboratorio de microbiología.¹⁶² La ceftazidima ha sido el tratamiento de elección para la melioidosis grave, pero la respuesta al tratamiento parenteral en alta dosis es lenta.³⁰⁰ Se ha demostrado que los antibióticos carbapenémicos son

muy activos contra *B. pseudomallei* in vitro^{161,301} y en un estudio se mostró que el imipenem solo era un tratamiento eficaz para la melioidosis grave aguda, y condujo a menos fallas de tratamiento que la ceftazidima sola.³⁰⁶ En otro estudio, el uso de terapia combinada con cefoperazona-sulbactam más trimetoprim-sulfametoxazol o ceftazidima más trimetoprim-sulfametoxazol pareció ser igualmente eficaz para el tratamiento de la melioidosis grave.¹²⁰

El diagnóstico definitivo de la melioidosis, que ha sido denominada "la gran imitadora", depende del aislamiento y la identificación de *B. pseudomallei* de muestras clínicas. El microorganismo crece fácilmente en la mayoría de los medios habituales de laboratorio y se puede aislar de la sangre mediante técnicas de hemocultivo estándares.⁴³⁰ Se recomiendan agarres selectivos, ya sea agar selectivo de Ashdown (ASA)⁴³¹ o agar selectivo para *Burkholderia pseudomallei* (BPSA)⁴³² o caldos selectivos⁷³⁸ para el aislamiento de *B. pseudomallei* de sitios corporales no estériles, sobre todo de esputo en los casos clínicamente sospechosos de melioidosis y para el seguimiento durante el tratamiento de la enfermedad.⁴³¹ En el cuadro 7-7 se describen las propiedades bioquímicas útiles para la identificación de este microorganismo. Dos biotipos de *B. pseudomallei* son categorizados por su capacidad para asimilar L-arabinosa.⁷⁰⁰ Los no asimiladores de L-arabinosa (Ara -) son virulentos y pueden aislarse tanto de muestras clínicas como del entorno, mientras que los asimiladores de arabinosa (Ara +) suelen ser avirulentos y con raras excepciones se encuentran sólo en el medioambiente.^{431,700} La identificación de *B. pseudomallei* no suele ser difícil en los laboratorios en áreas donde el microorganismo es endémico. Sin embargo, con el aumento de los viajes internacionales y la amenaza del bioterrorismo, se ha vuelto más probable que los laboratorios de áreas en donde *B. pseudomallei* no es endémico puedan encontrarlo. Como muchos laboratorios se basan sobre sistemas de identificación comerciales, Lowe y cols. compararon la exactitud de cuatro sistemas, los APE 20NE y 20E manual, y los sistemas Vitek 1 y 2 automáticos (bioMérieux Inc. Hazelwood, MO) por su capacidad para identificar correctamente 103 cepas de *B. pseudomallei*. Los sistemas API 20NE, API 20E y Vitek 1 dieron la identificación correcta en el 98%, el 99% y el 99% de los casos, respectivamente. El Vitek 2 no pudo identificar muchas de las cepas de *B. pseudomallei* debido en gran parte a diferencias en las reacciones bioquímicas logradas en comparación con los valores esperados en la base de datos.⁴⁶⁰ Koh y cols., utilizando 47 cepas de *B. pseudomallei*, evaluaron un nuevo sistema de identificación automático: el BD Phoenix System. Aunque *B. pseudomallei* no está en la base de datos Phoenix sólo se leyeron cuatro cepas como carentes de identificación. Todas las restantes fueron identificadas incorrectamente con resultados de alta confianza como *B. cepacia* (34), especies de *Burkholderia/Ralstonia* (6) u otra especie de no fermentadores (3).⁴¹²

Se han creado pruebas rápidas de aglutinación del látex para la detección de antígeno de *B. pseudomallei* en orina^{186,701,702} que ofrecen un método simple, rápido y altamente específico para el diagnóstico de melioidosis y son muy útiles en áreas con instalaciones de laboratorio limitadas.

Se aconseja a los trabajadores del laboratorio utilizar capuchas de seguridad biológica cuando trabajan con este microorganismo porque se ha comunicado la infección por *B. pseudomallei* adquirida en el laboratorio.^{29,279,594,667} Se puede hallar más información sobre las características clínicas y de laboratorio de la melioidosis en otras revisiones publicadas.^{158-160,428,805}

Burkholderia cepacia es un fitopatógeno que produce putrefacción en los bulbos de cebolla y en los pies (putrefacción de la jungla) de los seres humanos.⁷³² Desde comienzos de la década de 1980 ha surgido como causa de infecciones humanas oportunistas, sobre todo en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica^{73,419,551} y fibrosis quística.^{262,356,694,738} Los adelantos taxonómicos recientes han demostrado que *B. cepacia* es en realidad un conjunto de como mínimo nueve especies genómicas (o genomovariedades) estrechamente relacionados denomi-

nado complejo *B. cepacia* que incluye *B. cepacia* (genomovariedad I), *B. multivorans* (genomovariedad II), *B. cenocepacia* (genomovariedad III), *B. stabilis* (genomovariedad IV), *B. vietnamiensis* (genomovariedad V), *B. dolosa* (genomovariedad VIII) y *B. pyrrocinia* (genomovariedad IX), que pueden diferenciarse sobre la base de pruebas moleculares y bioquímicas.^{137,139,142,258,302,354,356,357,739,773} Aunque todas las genomovariedades del complejo de *B. cepacia* han sido cultivadas a partir del esputo de pacientes con fibrosis quística, *B. cenocepacia* (genomovariedad III) y *B. multivorans* (genomovariedad II) representan la mayoría de las cepas aisladas en pacientes en los Estados Unidos^{418,568,700} y Europa.^{3,188,478} Los enfermos con fibrosis quística que están colonizados por estos genotipos tienen mayor mortalidad en el año que sigue a la colonización y presentan un deterioro más acentuado en todas las funciones pulmonares luego de la colonización.⁴³⁷ Estas bacterias también se asocian con mayor frecuencia con la propagación epidémica y con el "síndrome de cepacia", que se manifiesta por insuficiencia respiratoria progresiva grave y bacteriemia.^{26,142,187,269,472,445,817} Además, varios estudios epidemiológicos han indicado que algunas cepas del complejo *B. cepacia* son transmisibles entre los pacientes y que la infección cruzada posiblemente ocurre por propagación directa de persona a persona.^{108,268,446,447,698} Los marcadores de virulencia como el pilus cable (cbl) codificado por el gen de la subunidad de pili na cable (*cblA*) que media la adherencia a las glucoproteínas del moco y aumenta la adherencia a las células epiteliales^{263,658,659,721} y el marcador de cepa endémica *B. cepacia* (BCESM),⁴⁷¹ designado así por su asociación con los tipos de cepas de *B. cepacia* que infectan a múltiples pacientes con fibrosis quística, se hallan casi exclusivamente en *B. cenocepacia*.

Se ha aislado el complejo *B. cepacia* en muchas fuentes de agua y superficies húmedas, en soluciones detergentes y líquidos para infusiones intravenosas. En general, los brotes hospitalarios de infección por *B. cepacia* se deben a una única fuente contaminada, como anestésicos,⁷² desinfectantes,^{505,705} soluciones intravenosas,^{193,766} soluciones para nebulizadores,^{217,351} lavado bucal¹⁰⁹ y dispositivos médicos, que incluyen equipamiento para terapia respiratoria.^{459,761} Los desinfectantes en los cuales crece *B. cepacia* son yodopovidona, compuestos de amonio cuaternario y clorhexidina.^{61,351,705} Se han comunicado pseudobacteriemias (hemocultivos falsos positivos) luego del uso de soluciones desinfectantes contaminadas por *B. cepacia*.^{61,151,559,565} También puede crecer en agua desilada con una fuente de nitrógeno debido a su capacidad para fijar CO₂ a partir del aire. Las infecciones clínicas incluyen neumonía y neumonitis en pacientes que reciben anestésicos contaminados, infección de las vías urinarias en pacientes que reciben líquidos de irrigación contaminados luego de un cateterismo o una cistoscopia, septicemia luego de cardiocirugía, endocarditis causada por válvulas cardíacas contaminadas, conjuntivitis y artritis séptica.⁵⁵⁹ La peritonitis que sigue a la diálisis peritoneal ha sido asociada con solución de yodopovidona contaminada por *B. cepacia*.⁵⁶⁵ Las infecciones que afectan el sistema nervioso central incluyen un caso de bacteriemia secundaria a la contaminación de una válvula de Holter para derivación ventrículo-auricular en un niño con hidrocefalia congénita⁴⁹ y un caso de abscesos encefálicos secundarios a otitis media supurada crónica en un adulto.⁵⁰⁷

Se describieron medios selectivos con colorantes bacterios-táticos, antibióticos o un pH bajo para el aislamiento selectivo de *B. cepacia*, los cuales incluyen medio para *Pseudomonas cepacia* (PCM), que contiene cristal violeta, polimixina B y

ticarcilina;²⁵⁶ medio OFPBL, que contiene polimixina B, bacitracina y lactosa;²⁵⁶ y agar selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA), que contiene lactosa, sacarosa, polimixina B, gentamicina y vancomicina.¹⁰⁰ Las evaluaciones comparativas de estos medios han mostrado que el aislamiento de *B. cepacia* en pacientes con fibrosis quística aumenta con su uso.^{300,367,774,819} Se observó que BCSA (utilizado sobre todo en los Estados Unidos) y el medio para *B. cepacia* Mast (utilizado sobre todo en Europa) son los más apropiados para el crecimiento de todas las cepas problemáticas de *B. cepacia*.^{774,819}

La identificación de *B. cepacia* en el laboratorio clínico es problemática porque no es un único fenotipo sino un complejo de por lo menos nueve especies genéticas separadas.⁴³⁶ Los equipos de identificación comerciales han funcionado mal en la identificación de estos microorganismos. Kiska y cols. compararon cuatro sistemas comerciales: Rapid NF Plus (Remel), API Rapid NFT (renombrado API 20NE (bioMérieux), Vitek GNI (bioMérieux) y Uni-N/F Tek (Remel). La identificación correcta para *B. cepacia* fue del 86% para Uni-N/F Tek, del 81% para Rapid NF Plus, del 50% para Vitek GNI y del 43% para API 20NE.⁴⁰⁴ Van Pelt y cols. comunicaron que el 90% de las cepas de *B. cepacia* fueron identificadas correctamente con el API 20NE y el Vitek GNI, y un 68%, con los paneles combo tipo 1 para orina de toda la noche MicroScan WalkAway.⁷⁶⁷ Shelly y cols. evaluaron el rendimiento de nueve equipos comerciales diferentes utilizados en 108 laboratorios de microbiología clínica de 91 ciudades de los Estados Unidos que remitían las cepas aisladas a un laboratorio de referencia en fibrosis quística para efectuar pruebas confirmatorias utilizando un abordaje polifásico que incluyó ensayos de PCR basados sobre rRNA específico de especie.⁶⁸² Los valores predictivos positivos variaron del 71% al 98%; los valores predictivos negativos variaron del 50% al 82% y todos los sistemas dieron identificaciones erróneas para el complejo *B. cepacia*. Las especies identificadas en forma errónea más a menudo como *B. cepacia* fueron las de *Burkholderia gladioli*. Brisse y cols.⁸⁵ compararon los instrumentos automáticos BD Phoenix y Vitek 2 para la identificación de cepas del complejo *B. cepacia*. Las tasas de identificación correcta fueron del 50% para BD Phoenix y del 53% para Vitek 2 cuando se consideraron todas las cepas del complejo *B. cepacia*, pero difirieron mucho para *B. ceno-cepacia* (genomovariedad III) (71% para Phoenix y 38% para Vitek 2) y *B. multivorans* (genomovariedad II) (58% para Phoenix y 89% para Vitek 2). Los resultados de estos estudios apoyan la recomendación de que cuando se utilizan equipos comerciales para la identificación de cepas del complejo *B. cepacia*, los resultados deben confirmarse con la realización de pruebas bioquímicas complementarias (cuadro 7-8) o por métodos moleculares.

A diferencia de otros pseudomonadales frecuentes, *B. cepacia* es resistente a los antibióticos aminoglucósidos, pero suele ser sensible a trimetoprim-sulfametoxazol, que se ha convertido en el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por este germen. Daniel y cols. realizaron estudios de sensibilidad in vitro en 36 aislamientos de *B. cepacia* en sangre y observaron que la mayoría de ellas eran sensibles a minociclina (94,4%), ceftazidima (86,1%), ciprofloxacina (83,3%) y trimetoprim-sulfametoxazol (83,3%).¹⁶⁴ En los estudios de sinergia de dos y tres fármacos realizados por Bonacorsi y cols., el agregado de ciprofloxacina aumentó significativamente las actividades destructivas de piperacilina, imipenem y meropenem, mientras que la combinación de tres fármacos de β -lactámicos-ciprofloxacina-tobramicina tuvo el efecto más sinérgico.⁷¹ Aaron y cols., que también efectuaron

pruebas in vitro utilizando múltiples combinaciones de antibióticos para *B. cepacia*¹ y comunicaron que la combinación de dos antibióticos mejoraba la actividad bactericida para las siguientes combinaciones: meropenem-minociclina, meropenem-amikacina y meropenem-ceftazidima. Las combinaciones de tres antibióticos que contenían tobramicina, meropenem y otro antibiótico fueron más eficaces y resultaron bactericidas contra el 81% y el 93% de las cepas aisladas. En otro estudio, Nzula y cols. mostraron que las concentraciones inhibitorias mínimas de antibióticos (CIM) varían ampliamente para las diferentes cepas del complejo *B. cepacia*.³⁴¹ Aunque todas las cepas fueron resistentes a la polimixina B, las CIM para cloranfenicol variaron desde 4 hasta 128 mg/L, aquellas para trimetoprim, desde 0,25 hasta 64 mg/L y la mayoría de las cepas mostraron resistencia. Asimismo, los rangos de CIM para tobramicina, ciprofloxacina y ceftazidima variaron ampliamente, lo que sugirió la necesidad de que los laboratorios realizaran pruebas de sensibilidad en aislamientos individuales. Vermis y cols. observaron que las CIM de los microorganismos aislados en muestras de pacientes con fibrosis quística fueron más altas que las de pacientes que no tenían fibrosis quística y que, en general, las cepas del complejo *B. cepacia* eran más sensibles a rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol e imipenem y más resistentes a polimixina B.⁷⁷⁴

Para obtener mayor información sobre biología, taxonomía, mecanismos de virulencia y epidemiología de *B. cepacia*, se pueden consultar varias revisiones excelentes.^{142,235,269,369,445,470,774}

B. gladioli (antes *P. marginata*) es fundamentalmente un patógeno que causa "putrefacción de flores" en el gladiolo y otras plantas. Es uno de los pocos pseudomonadales negativos para la citocromo oxidasa y produce colonias amarillas no fluorescentes después de 48 a 72 horas de incubación. Se ha comunicado que causa enfermedad pulmonar en el ser humano y a veces bacteriemia e infecciones de tejidos blandos en pacientes con fibrosis quística,^{43,127,274,370,374,390,514} enfermedad granulomatosa crónica,^{306,643} diabetes⁶⁴⁶ y otras deficiencias inmunitarias.²⁷⁴ Existe una comunicación de queratitis y endoftalmitis por *B. gladioli* en un paciente anciano con diabetes mellitus.⁶²⁹

En general, crece como colonias amarillas debido a la producción de un pigmento amarillo difusible y no fluorescente. Las pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación del complejo *B. cepacia* incluyen reacciones negativas para lisina, maltosa y lactosa. La mayoría de las cepas son oxidasa negativas y catalasa positivas. En el cuadro 7-8 se presentan otras características de diferenciación. Los trabajadores de laboratorio deben estar conscientes de que los métodos fenotípicos para la diferenciación de *B. gladioli* de los microorganismos son poco confiables y pueden conducir a una identificación errónea.¹³² Los sistemas de identificación comerciales a menudo no pueden discriminar *B. gladioli* de especies relacionadas.^{682,767} Por lo tanto, se deben utilizar métodos con base molecular cuando se juzga necesario confirmar que una cepa aislada es *B. gladioli*.^{31,132,804} El patrón de sensibilidad a los antibióticos también puede servir como indicio de que un microorganismo podría ser *B. gladioli*, dado que tiende a ser sensible a aminoglucósidos, imipenem, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol y resistente a aztreonam y cefalosporinas.⁶⁴³

GÉNERO *BALSTONIA* Y GÉNERO *CUPRIAVIDUS*

Palleroni⁵⁶⁰ y más tarde Li y cols.⁴³⁹ demostraron dos grupos de homología de DNA dentro del grupo II de homología de RNA para *Pseudomonas*. En 1992, Yabuuchi propuso el nombre genérico *Burkholderia* para siete especies, pero señaló que

Cuadro 7-8 Características claves del complejo *Burkholderia cepacia* y especies relacionadas

PRUEBA	<i>B. cepacia</i> ^a I	<i>B. multivorans</i> ^a II	<i>B. cenocepacia</i> ^a III	<i>B. starkeyi</i> ^a IV	<i>B. vietnamiensis</i> ^a V	<i>B. indologas</i> ^a VI	<i>B. ambifaria</i> ^a VII	<i>B. anthracis</i> ^a VIII	<i>B. pinnocincta</i> ^a IX	<i>B. gladiolus</i> ^a	ESPECIES DE PASADENA ^a S. LINGENS ^a	INQUIETU RAJSTONIA PICKETTII
Oxidasa	100 ^b	100	100	100	100	100	100	100	+	0	67	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Glicerol OF	100	100	95	100	100	100	100	100	+	100	11	0
Maltosa OF	39	59	78	93	97	100	100	100	V	0	0	ND
Lactosa OF	61	100	79	91	97	100	100	100	+	0	0	43
Xilosa OF	87	98	86	44	75	100	100	100	ND	96	0	ND
Sucrosa OF	87	0	80	0	94	0	93	V	+	0	0	0
Adonitol OF	70	91	79	78	0	100	100	V	ND	93	0	ND
Lactosa al 10%	100	100	36	100	100	ND	ND	ND	ND	8	ND	ND
ONPG	100	98	99	0	100	100	100	V	-	100	0	75
Lisina	100	53	99	100	100	0	100	V	+	0	0	0
Citratina	80	0	71	100	0	0	0	0	ND	0	0	0
Nitrito reducido	4	91	31	4	47	100	67	V	+	33	31	0
Gelatina	24	2	35	93	0	0	94	0	V	70	0	38
Elastina	56	2	33	0	0	0	56	V	V	11	0	ND
Ureasa	91	100	8	60	100	0	0	ND	-	23	63	25
Colina, 10 µg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Crecimiento en agua de Miles-Campbell	83	96	84	93	83	100	100	100	+	96	100	ND
Crecimiento a 42 °C	43	100	84	0	100	100	36	V	-	+	89	83
Utilización de malonato	100	90	42	100	100	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
Pigmento amarillo	78	2	3	0	0	0	0	0	-	44	0	0

^aDatos tomados de las referencias^{1,2,3,4,5,6,7}.^bDatos tomados de la referencia¹⁰.^cDatos tomados de la referencia¹⁰.^dDatos tomados de la referencia¹⁰.^eDatos tomados de la referencia¹⁰.^fDatos tomados de la referencia¹⁰.^gLa reacción de catalasa para *B. pickettii* es a menudo débil o tardía (Schaeferberger P. observación personal).^hDatos tomados de la referencia¹⁰.ⁱ90% o más de cepas positivas; < 90% o más de cepas negativas; V: 1-89% de cepas positivas; S: sensible; R: resistente; ND: no disponible; D: diferentes resultados informados. Los resultados de los pruebas de oxidación fueron registrados luego de 3 días de incubación. Los números muestran representaciones geométricas del complejo *B. cepacia*.

Recuadro 7-7 Características para la diferenciación de *Ralstonia* y *Cupriavidus*

Característica	<i>Ralstonia</i>	<i>Cupriavidus</i>
Flagelos	Polar, 1-4	Peritricos
Colistina (discos de 10 µg)	Resistente	Sensible
Ácido a partir de hidratos de carbono	Positivo	Negativo

B. pickettii y *B. solanacearum* eran similares entre sí y diferentes de las otras cinco especies de *Burkholderia* con nombre en esa época.⁶²⁴ En 1995, Yabuuchi y cols. propusieron la transferencia de *B. pickettii*, *B. solanacearum* y *Alcaligenes eutrophus* al nuevo género *Ralstonia* y *R. pickettii* sirvió como especie tipo.⁶²⁵ Con posterioridad, se agregaron varias especies nuevas o nuevas combinaciones al género *Ralstonia*. El análisis comparativo de secuencias de rDNA 16S indica ahora que existen dos sublinajes distintos dentro del género *Ralstonia*. El primero, llamado linaje de *Ralstonia eutropha*, está formado por *R. basileensis*, *R. campinensis*, *R. eutropha*, *R. gilardii*, *R. metallidurans*, *R. oxalatica*, *R. pauculus*, *R. respiraculi* y *R. taiwanensis*. El segundo es el linaje de *Ralstonia pickettii*, formado por *R. insidiosa*, *R. mannitolitica*, *R. pickettii*, *R. solanacearum* y *R. syzygii*. Esta separación está apoyada por diferencias fenotípicas. Los miembros del linaje de *R. eutropha* tienen flagelos peritricos, no producen ácidos a partir de la glucosa y son sensibles a la colistina, a diferencia de los miembros de *R. pickettii*, que tienen uno o más flagelos polares, producen ácido a partir de varios hidratos de carbono y son resistentes a la colistina (véase recuadro 7-7).^{175,763} Vaneechoutte y cols. propusieron reclasificar las especies del linaje de *R. eutropha* en el nuevo género *Wautersia*.⁷⁶³ Más tarde, algunos experimentos de hibridación de DNA-DNA y una evaluación de las características fenotípicas, los cocientes con base en DNA y secuencias de genes rRNA 16S demostraron que *Wautersia eutropha*, la especie tipo del género *Wautersia*, es un sinónimo ulterior de *Cupriavidus necator*, la especie tipo del género *Cupriavidus*. Por lo tanto, todos los miembros del género *Wautersia* fueron reclasificados en el género *Cupriavidus*.⁷³²

Ralstonia pickettii fue establecida para un grupo de cepas clínicas⁶⁰⁹ y también resultó que incluye cepas de los grupos Va-1 y Va-2 de los CDC, consideradas dos biovariedades diferentes de *R. pickettii*.³⁴⁰ Poco antes, King y cols.³⁹⁵ comunicaron que *R. ("Pseudomonas") pickettii* contenía varias biovariedades, que incluían las cepas aisladas originariamente del St. Thomas Hospital, Londres,^{579,580} que habían sido designadas "Pseudomonas thomasi", aunque el nombre nunca fue publicado con validez. En 1994, Pickett⁷⁶² señaló que es necesario reconocer que *R. pickettii* tiene tres biovariedades designadas biovariedad Va-1, biovariedad Va-2 y biovariedad 3/thomasi. De Baere y cols.¹⁷⁵ confirmaron luego mediante hibridación de DNA-DNA que *R. pickettii* biovariedad 3/thomasi era una especie separada y propusieron el nombre *Ralstonia mannitolitica*, más tarde corregida a *Ralstonia mannitolitica*.⁴⁴⁹

B. pickettii pocas veces se asocia con infecciones humanas, pero se ha informado como causa de infecciones hospitalarias, que incluyen bacteriemia e infecciones urinarias. En 1983, cinco lactantes en la sala de cuidados especiales de neonatología de un hospital en Chicago fueron colonizados por *B. pickettii* luego de la aspiración endotraqueal con solución salina a

partir de un preparado comercial en frascos ampolla en dosis unitarias de 5 mL. Posteriormente, otros cuatro hospitales comunicaron la colonización respiratoria de lactantes y adultos por *B. pickettii* luego del uso de la misma marca comercial de frascos ampolla de solución salina.¹⁰⁷ Este brote demuestra la capacidad de *B. pickettii* para sobrevivir y crecer en solución salina "estéril" comercial a pesar de la reglamentación pertinente de la Food and Drug Administration (FDA) y programas de la compañía para identificar esta contaminación. Han ocurrido brotes hospitalarios más recientes con soluciones de cuidados respiratorios contaminadas,⁴¹⁸ soluciones de heparina,⁴⁸⁷ solución salina "estéril" para inyección,¹²¹ agua destilada^{342,485} y un sistema de irrigación con agua contaminado.⁶¹⁹ También se han informado pseudobrotes debidos a tapas de frascos de hemocultivo contaminadas,⁷³ y agua salpicada desde una pileta.²⁹⁸ Sólo existen algunas comunicaciones de infección primaria causada por *R. pickettii*, que incluyen un caso de osteomielitis vertebral y discitis en un paciente que recibió hemodiálisis prolongada,⁷⁹⁹ bacteriemia en un receptor de trasplante medular⁸¹⁴ y meningitis en un ranchero presumiblemente sano,²⁹⁷ en el cual no se pudo hallar una fuente contaminante obvia de infección.

R. pickettii tiene un crecimiento lento y produce sólo colonias puntiformes en placas de agar sangre después de 24 horas. Todas las cepas son ureasa positivas y algunas cepas pueden ser catalasa negativas. La motilidad es débil o tardía y es posible que no sea detectable. La biovariedad Va-1 puede ser separada de la Va-2 por la oxidación de lactosa y maltosa. En el cuadro 7-9 se presentan características bioquímicas adicionales.

R. mannitolitica es el nombre dado a microorganismos clasificados antes como *R. pickettii* biovariedad 3/thomasi (véase explicación anterior).¹⁷⁵ Se ha aislado en esputos de pacientes con fibrosis quística^{143,220} y en un caso de meningitis recurrente y otro de hemoperitoneo.⁷⁶² Puede distinguirse de todas las especies de *Ralstonia* descritas por su acidificación de D-arabitol y manitol y su falta de reducción de nitrato y de alcalinización de tartrato.

Se han aislado cepas de *R. insidiosa* del medioambiente y de muestras clínicas humanas, que incluyen secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística.^{133,763} No se han aislado cepas de *R. solanacearum* ni de *R. syzygii* de muestras clínicas humanas. En el cuadro 7-9 se detallan las características para la identificación de especies de *Ralstonia* de origen humano.

El género *Cupriavidus* está compuesto por especies anteriores de *Ralstonia* que son asacarolíticas, sensibles a la colistina y móviles, con flagelos peritricos (recuadro 7-7) e incluye: *C. basileensis*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. metallidurans*, *C. necator* (especie tipo que antes era *Ralstonia eutropha*), *C. oxalaticus*, *C. pauculus*, *C. respiraculi* y *C. taiwanensis*.^{752a}

C. gilardii (antes *Ralstonia gilardii*) recibió ese nombre en honor de G. L. Gilardi, un microbiólogo norteamericano que contribuyó mucho a nuestro conocimiento de los bacilos gram-negativos no fermentadores. Es fenotípicamente similar a *Alcaligenes faecalis* y fue denominado similar a *A. faecalis* por Gilardi. Es un bacilo asacarolítico no fermentador gram-negativo que es móvil por medio de flagelos peritricos,⁷⁶² aunque en la descripción original de Coenye y cols. fueron descritos como móviles por medio de un único flagelo polar.¹³⁴ Son catalasa y oxidasa positivos. No reducen nitrato ni nitrito. Pueden diferenciarse de *A. faecalis* por la ausencia de reducción de nitrito y la falta de crecimiento en acetamida y en NaCl al 6,5%. En los seres humanos el microorganismo se ha aislado en el aparato respiratorio, un forúnculo, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula ósea y sangre.^{134,792}

Cuadro 7-9 Características de *Ralstonia* y *Cupriavidus* y no fermentadores fenotípicamente similares^a

PRUEBA	RALSTONIA				CUPRIAVIDUS				ALCALIGENES			BORDETELLA
	<i>R. pickettii</i> Biotariedad VA-1	<i>R. pickettii</i> Biotariedad VA-2	<i>R. mannitolítica</i> Biotariedad Mthomasii	<i>R. insularis</i>	<i>C. glauca</i>	<i>C. pasteurii</i>	<i>C. respirans</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>A.</i>	<i>B.</i> <i>bronchiseptica</i>	
Oxidasa	D ⁺	D ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Catalasa	D ⁺	D ⁺	V (87) ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lipasa	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	
Glucosa OF	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Maltosa OF	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lactosa OF	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Xilosa OF	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Sacarosa OF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Adonitol OF	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	
Martitol OF	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lactosa al 10%	V (81) ^c	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrato reducido	+ (87) ^c	+ (100) ^c	(20) ^c	+	V ^d	-	V	+	-	-	+ (100) ^e	
Nitrato reducido	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	+	+	-	
Gelatina	V (77) ^c	V (40) ^c	(80) ^c	-	-	-	-	ND	(4) ^c	-	-	
Esculina	-	-	-	ND	-	-	ND	+	-	-	-	
Ureasa	+	+	+	V	-	++	-	-	-	-	++	
Colistina, 10 µg	R	R	R	R	S	S	S (97) ^c	S	S (100) ^c	S	S (96) ^c	
Deferoxamina ^f	S	S	R	ND	R	R	ND	ND	S	S	R	
PYR ^g	+	+	+	+	-/+ débil	+	+	ND	-	-	-	
Crecimiento en agar de MacConkey	+ (77) ^c	+	+	ND	ND	(90) ^c	+ (90) ^c	ND	+	+	+	
Crecimiento a 42 °C	V (26) ^c	V (60) ^c	+ (60) ^c	ND	+	V (68) ^c	V (68) ^c	-	V (67) ^c	V (46) ^c	-	
Crecimiento en NaCl al 6,5%	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	+	-	
Crecimiento en acetamida	-	-	-	ND	-	-	-	ND	+	+	-	
Utilización de malonato	+	+	+	ND	V	ND	ND	ND	+	+	+	
Pigmento antracilo	V (36) ^c	ND	V (33) ^c	ND	-	-	-	ND	-	-	-	

^aExcepción donde se muestran datos de las referencias (18,19,20,21,22).^bDe Burre y cols. (18) comunican estas reacciones como positivas; *Mannitolítica* y cols. (20) comunican estas reacciones como negativas.^cLa reacción de catalasa para *R. pickettii* a menudo es débil o negativa (Schreckengost P; observación personal).^dDatos tomados de la referencia (20).^eDatos tomados de la referencia (21).^fDatos tomados de la referencia (22).^gProcedimiento descrito en la referencia (23).^hDatos tomados de la PYR de referencia (24).ⁱ4: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; los números muestran el porcentaje de cepas que dan reacciones positivas; S: sensible; R: resistente; ND: no disponible; ++: reacción positiva fuerte; D: diferentes resultados comunicados; OF: oxidación-fermentación.

C. pauculus (antes *Ralstonia paucula* y grupo IV c-2 de los CDC) es un bacilo gramnegativo asacarolítico oxidasa positivo que es móvil por medio de flagelos peritricos y fuertemente ureasa positivo. Por lo tanto, se asemeja fenotípicamente a *Alcaligenes*, *Bordetella* y *Oligella ureolytica*, de los cuales debe ser diferenciado (véase cuadro 7-9). La mayoría de las comunicaciones de infección humana han sido casos de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos.^{13,22,24,52,56,491,501,525,611,660,736,837} También existen dos casos de peritonitis luego de diálisis peritoneal ambulatoria continua, uno asociado con septicemia⁵³² y uno con una infección mixta por IVc-2 y *Alcaligenes faecalis*;²⁹¹ y un caso de tenosinovitis de la mano luego de una mordedura de gato.⁴²² En el último caso no está claro si la fuente del agente infeccioso fue la mordedura del gato o el agua corriente utilizada para lavar la lesión.

C. respiraculi (antes *Ralstonia respiraculi*) se ha aislado del aparato respiratorio de pacientes con fibrosis quística, aunque las cepas no crecieron en BCSEA.¹⁴² Las características que diferencian a *C. respiraculi* de otras especies de *Cupriavidus* se presentan en el cuadro 7-9.

C. taiwanensis (antes *Ralstonia taiwanensis*) también ha sido aislado del esputo de un paciente con fibrosis quística.¹¹⁸ Es un bacilo gramnegativo no sacarolítico que es oxidasa, catalasa, nitrato y esculina positivo. En el cuadro 7-9 se proporcionan otras características bioquímicas.

GÉNERO PANDORAEA

En 2000, Coenye y cols. describieron un género nuevo, *Pandoraea* (que se refiere a la caja de Pandora de la mitología griega) de no fermentadores gramnegativos aislados fundamentalmente de los espitos de pacientes con fibrosis quística y del suelo.¹³³ Originalmente, este género contenía cinco especies con nombre (*P. apista*, *P. norimbergensis*, *P. phenomenon*, *P. pulmonicola* y *P. sputorum*) y una especie genómica sin nombre.¹³³ Hace poco, se agregaron tres genotipoespecies de *Pandoraea* nuevas (aún sin nombre), antes clasificadas como grupo 2 oxidante débil de los CDC (WO-2).¹⁶⁶ Las especies de *Pandoraea* se han aislado principalmente de las secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística, pero también se han encontrado en otras muestras clínicas, que incluyen sangre y tejido pulmonar.^{371,507,718} Se ha comunicado la diseminación epidémica de *P. apista* de un paciente índice a otros cinco pacientes con fibrosis quística que participaron en campamentos invernales o que habían sido hospitalizados.²⁹¹ En la actualidad, se desconoce la prevalencia, la transmisibilidad de un paciente a otro y la repercusión clínica de estos microorganismos en pacientes con fibrosis quística porque los métodos de identificación manuales y automatizados utilizados en la mayoría de los laboratorios no son satisfactorios para identificar las especies de *Pandoraea*.^{136,807} En general, estas especies crecen bien en un medio selectivo para *B. cepacia* y, por lo tanto, pueden ser confundidas como miembros del complejo *B. cepacia*. Las especies de *Pandoraea* crecen bien en BAP después de una incubación de toda la noche a 35 °C. Las colonias aisladas aparecen circulares, convexas, semiopacas, enteras y lisas y tienen 0,5 a 1 mm de diámetro. La hemólisis es variable. Todas las especies son móviles, tienen flagelos polares y son positivas para crecimiento en agar de MacConkey, producción de catalasa y alcalinización de citrato. Todas las especies son negativas para reducción de nitrato; desnitrificación; producción de indol; gelatina, esculina e hidrólisis de Tween; lisina y ornitina descarboxilasa; y arginina dihidrolasa, β -galactosidasa y actividad de DNasa. No se produce ácido a partir de manitol, lactosa,

sacarosa, maltosa o fructosa base OF. Las cepas producen ácido débil o son negativas en glucosa OF.^{133,166} Para conocer las características que diferencian *Pandoraea* de microorganismos fenotípicamente similares véase el cuadro 7-8.

GÉNERO INQUILINUS

Inquilinus limosus es una bacteria gramnegativa inmóvil con forma de bastón que mide 1,5 a 2 μ m de ancho por 3,5 μ m de largo. Crece a 35 y 42 °C, pero poco a 25 °C. Forma colonias no pigmentadas y muy viscosas en medios no selectivos. El crecimiento en agar de MacConkey es muy leve después de 3 días. Es resistente a la polimixina B y lipasa positiva, lo que lo hace parecer fenotípicamente similar al complejo *B. cepacia* (cuadro 7-8).^{156,296} Todas las cepas son positivas para oxidasa, catalasa, β -glucosidasa, fosfatasa, prolina aminopeptidasa, pitrolidionilaminopeptidasa y producción de acetofina y negativas para lisina, arginina, ornitina, desnitrificación, indol, citrato y utilización de glucosa.¹⁵⁶ Todas las cepas han sido recuperadas de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística. La patogenicidad se desconoce.

GÉNERO LAUTROPIA

Lautropia mirabilis es un coco gramnegativo anaerobio facultativo y móvil que fermenta glucosa, fructosa, sacarosa y manitol; reduce nitrato y nitrito; y produce reacciones positivas para oxidasa, ureasa y, a veces débilmente, catalasa.²⁴⁰ La caracterización filogenética sobre el análisis de secuencias del gen rRNA 16S ubica la especie en el subgrupo β de *Proteobacteria*, separada de todos los otros géneros descritos, pero más estrechamente relacionada con *Burkholderia*.²⁴⁰ Es interesante señalar que la composición celular de ácidos grasos de *L. mirabilis* es más similar a la composición celular de ácidos grasos de *Acidovorax delafieldii*, *Comamonas terrigena* y el grupo oxidante débil 1 de los CDC (WO-1).¹⁶³ La morfología cocoide y la capacidad para fermentar la glucosa separa *L. mirabilis* de *C. terrigena*, *A. delafieldii* y WO-1 y de los miembros del grupo *Burkholderia*. *L. mirabilis* muestra una morfología celular extremadamente polimorfa. Se observan al menos tres morfologías de colonias: 1) colonias planas, secas y circulares en cultivos jóvenes, 2) formas más grandes, rugosas, onduladas y crateriformes con la incubación prolongada y 3) colonias lisas, brillantes, elevadas, redondeadas y mucoides. El diámetro de las colonias varía entre puntiformes y más de 5 mm, y las colonias suelen ser adherentes al agar.²⁴⁰ *L. mirabilis* ha sido recuperado de sitios bucales y respiratorios superiores,²⁴⁰ del esputo de un paciente con fibrosis quística,²⁶ y de las cavidades bucales de niños infectados por HIV.¹⁰⁰ Su potencial patogénico se desconoce.

Familia Comamonadaceae

GRUPO rRNA III

Willems y cols. han propuesto que los microorganismos pertenecientes al grupo rRNA III sean reconocidos como una nueva familia de bacterias: *Comamonadaceae*.⁸⁰⁶

GRUPO ACIDOVORANS

Este grupo consiste en microorganismos antes denominados *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas testosteroni* y *Comamonas terrigena*. En 1987 Tamaoka²⁸⁰ propuso ubicar a los microorganismos conocidos como *Pseudomonas acidovo-*

rans y *P. testosteroni* en el género *Comamonas*, junto con la especie *C. terrigena*. Con posterioridad, *C. acidovorans* fue colocado en un género nuevo *Delfia* como la especie tipo *D. acidovorans*.³⁹⁷ Todos son móviles por medio de un penacho polar de hasta seis flagelos, con la característica definida de tener una longitud de onda larga (3,0 µm entre la parte superior de las ondas adyacentes). No se produce ácido en el medio OF glucosa y, por lo tanto, estos microorganismos son agrupados entre las pseudomonas alcalinas (véase cuadro 7-6). Como grupo, los comamonadales tienen una distribución geográfica amplia y son saprófitos frecuentes del suelo y el agua. Se los aisló en fuentes animales, productos alimenticios, equipamiento hospitalario y muestras clínicas humanas, pero pocas veces tienen importancia clínica. *D. acidovorans* es el que se aísla con mayor frecuencia en las muestras clínicas en este grupo. Puede distinguirse con facilidad de los otros pseudomonadales alcalinos debido a la producción de un ácido débil o una reacción neutra en fructosa OF y manitol OF. Es acetumida positivo y reduce el nitrato sin producción de gas. Es indol negativo, pero la mayoría de las cepas producen un color anaranjado en el medio con el agregado del reactivo de Kovacs (el denominado indol naranja) debido a la producción de ácido antranílico a partir de triptona (véase lámina en color 7-2C).⁴⁰⁶ La reacción de indol naranja también se puede demostrar agregando una gota de reactivo de Kovacs a colonias que crecen sobre la superficie de placas de agar sangre. Cuando la prueba de indol se realiza con extracción de xileno y con el agregado de reactivo de Ehrlich, estas mismas cepas producen un color amarillo intenso en el medio de prueba. *D. acidovorans* ha sido aislado en distintas muestras clínicas y suele considerarse no patógeno. Las cepas halladas en pacientes internados de la University of Illinois se aislaron en esputo, orina, uréteres derecho e izquierdo de riñones trasplantados, líquido de preservación renal, raspados corneanos de un paciente que se había sometido a numerosas cirugías oculares previas y de sangre de un paciente con tuberculosis. Se han publicado casos de *D. acidovorans* asociado con bacteriemia relacionada con catéteres,^{103,104,209} otitis supurada,⁶¹⁸ infección de las vías urinarias,¹¹³ infecciones oculares^{431,715} y peritonitis en un paciente sometido a diálisis peritoneal ambulatoria continua.⁴⁵⁵ También se describió un caso de endocarditis por *D. acidovorans* en un adicto a drogas intravenosas de 42 años.³³⁸

C. testosteroni se aísla con poca frecuencia en el laboratorio clínico, a pesar de su amplia distribución ambiental. Barbaro y cols.,⁴¹ en una revisión de 18 casos de infecciones por *C. testosteroni*,⁴¹ informaron que el microorganismo se encuentra más a menudo en asociación con anomalías anatómicas del aparato digestivo; la más frecuente es la perforación apendicular. Otras comunicaciones previas publicadas describen a *C. testosteroni* como causa de sepsis,³⁵ infección relacionada con catéter venoso central⁴³² y meningitis en un paciente con colesteatoma recurrente.²³ Coenye recuperó *C. testosteroni* de las secreciones respiratorias de dos pacientes con fibrosis quística.¹³⁶

En realidad, *C. terrigena* comprende tres grupos separados genotípicamente. *C. terrigena* grupo DNA 1 conserva el nombre *C. terrigena*, mientras que *C. terrigena* grupo DNA 2 (que contiene *Aquaspirillum aquaticum* y algunas cepas del grupo 10 de E. Falsen [EF]) recibe el nombre *C. aquatica* y *C. terrigena* grupo DNA 3 (que incluye algunas cepas que con anterioridad se clasificaban dentro del grupo 10 de EF) recibe el nombre *C. kerstersii*.⁷⁹³ *C. terrigena* no se considera un patógeno humano, aunque Sonnenwirth informó el aislamiento de *C. terrigena* de dos hemocultivos de un paciente con endocar-

ditis; sin embargo, el papel del microorganismo como patógeno en este paciente es incierto.⁷⁹⁶

GRUPO FACILIS-DELAFIELDII

Willems y cols. han propuesto un nuevo género, *Acidovorax*, que contiene las tres especies siguientes: *Acidovorax facilis* (antes *Pseudomonas facilis*), *Acidovorax delafieldii* (antes *Pseudomonas delafieldii*) y *Acidovorax temperans* (para varias ex cepas de *Pseudomonas* y *Alcaligenes*).⁸⁰⁷ Estas tres especies forman un grupo separado dentro del complejo rRNA grupo III. Dos de las especies, *A. delafieldii* y *A. temperans*, han sido aisladas de muestras clínicas; sin embargo, no existe ninguna información referente a la importancia clínica de estos microorganismos.^{200,307} Es probable que *A. delafieldii* sea el mismo que el grupo WO-1 de los CDC y que *A. temperans* sea igual al grupo WO-1A de los CDC.⁸⁰² Las especies de *Acidovorax* son oxidasa positivas, móviles y utilizan hidratos de carbono en forma oxidativa. Para otras características diferenciales, consúltase el informe publicado por Willems y cols.⁸⁰⁷

Familia Caulobacteraceae

GRUPO rRNA IV

Todas las especies del grupo rRNA IV han sido transferidas al nuevo género *Brevundimonas* (que significa bacteria con flagelos de longitud de onda corta).⁶⁷³

GRUPO BREVUNDIMONAS-DIMINUTA

El género *Brevundimonas* incluye nueve especies de las cuales sólo dos, *B. diminuta* y *B. vesicularis*, se encuentran en muestras clínicas humanas. Estas especies están agrupadas con los pseudomonadales alcalinos porque son no reactivas o sólo débilmente reactivas en la mayoría de los hidratos de carbono (véase cuadro 7-6). Este grupo se caracteriza por la presencia de un único flagelo polar apretadamente enrollado (longitud de onda de 0,6 a 1,0 µm). *B. vesicularis* tiene crecimiento lento y suele requerir 48 horas de incubación para observar las colonias en agar sangre de carnero, que producen colonias de pigmento amarillo oscuro a anaranjado (véase lámina en color 7-3C). La mayoría de las cepas no crecen en agar de MacConkey. *B. vesicularis* puede ser separado de todas las otras especies de pseudomonadales alcalinos en virtud de una reacción hidrolítica fuerte de la esculina. En la University of Illinois, hemos aislado *B. vesicularis* de líquido de dializado peritoneal, una máquina de diálisis renal, un absceso bucal y una herida del cuero cabelludo. Otros autores han comunicado el aislamiento de esta especie de muestras del cuello uterino,³⁵⁵ sangre^{122,242,342,596,764} y en un caso de botriomicosis, un trastorno granulomatoso supurado crónico y raro que afecta la piel.⁷⁴ *B. vesicularis* también ha sido recuperado de muestras ambientales hospitalarias que incluyen la manguera de una ducha⁴¹³ y una pileta de hidroterapia.²⁵ Existe una comunicación publicada de bacteriemia por *B. diminuta* en un paciente con cirrosis.¹²² *B. diminuta* ha sido aislado en cultivo puro de la sangre de tres pacientes en el University of Illinois Hospital. Un paciente era diabético, otro tenía una neumonía del lóbulo medio derecho y no se obtuvieron antecedentes del tercero. Todas las cepas fueron no pigmentadas, crecieron bien en agar de MacConkey y fueron DNasa positivas con el sistema UNI-N/F (Remel, Lenexa KS). Moss y Kaltenbach informaron que el ácido glutámico es producido por *B. diminuta* pero no por *B. vesicularis* cuando los microorganismos crecen en agar tripticosa soja.⁵¹⁶

Familia Xanthomonadaceae
GRUPO rRNA V
GÉNERO STENOTROPHOMONAS

El género *Stenotrophomonas* fue creado en 1993 para acomodar a *Xanthomonas maltophilia* (antes *Pseudomonas maltophilia*).³⁶¹ Varios estudios recientes han mostrado que existe una diversidad genética considerable dentro de *S. maltophilia* y que esta especie consiste al menos en nueve grupos genómicos.^{146,285} Además, se describieron otras cuatro especies nuevas de *Stenotrophomonas*: *Stenotrophomonas africana*,^{199a} *Stenotrophomonas nitritireducens*,²²¹ *Stenotrophomonas acidaminiphila*²⁴ y *Stenotrophomonas rhizophila*.³¹⁰ Se propuso *S. africana* para una única cepa aislada en LCR. Fenotípicamente, se determinó que era casi idéntico a *S. maltophilia*, salvo en la propiedad de ser negativo para la asimilación de *cis*-aconitato.^{199a} Sin embargo, sobre la base de análisis moleculares extensos, Coenye y cols. han determinado que *S. africana* es una cepa de la especie *S. maltophilia*; por lo tanto, no se permite el nombre de especie *S. africana*.¹⁴³ De las especies restantes, sólo *S. maltophilia* se asocia con infección en seres humanos.

S. maltophilia es un bacilo móvil, tiene flagelos multitrícos polares y puede distinguirse con facilidad de otros pseudomonadales en virtud de ser lisina positivo y DNasa positivo y oxidasa negativo (véase cuadro 7-10). *S. maltophilia* son sensibles a colistina y polimixina B. Esta propiedad puede utilizarse para distinguir *S. maltophilia* de *B. cepacia*, que también es lisina positivo pero es resistente a colistina y polimixina B y DNasa negativo. *S. maltophilia* ataca enérgicamente la OF maltosa pero suele ser negativo o sólo débilmente positivo en OF glucosa en 24 horas. Las colonias pueden aparecer amarillo pálidas o gris lavanda en medio de agar sangre (véase lámina en color 7-3D). Hemos observado pocas cepas de *S. maltophilia* que son lentamente oxidasa positivas, pero todas tienen los otros rasgos bioquímicos característicos de *S. maltophilia*. Los estudiantes de microbiología deben saber que se pueden recuperar algunas cepas raras con características aberrantes de las muestras clínicas.

S. maltophilia es ubicua y puede ser aislada de casi cualquier sitio clínico. En ocasiones, produce infecciones oportunistas y está surgiendo como un patógeno hospitalario importante.^{391,488,520} El sitio más frecuente de aislamiento de *S. maltophilia* es el aparato respiratorio, aunque en la mayoría de los pacientes estas cepas no parecen tener importancia clínica. En los últimos años se ha comunicado una incidencia creciente de *S. maltophilia* en algunos centros de referencia en fibrosis quística.^{4091,560,577,749} y se ha observado una asociación entre colonización por *S. maltophilia* y daño pulmonar.^{40,577} Se demostró que el uso de medios selectivos aumenta las tasas de aislamiento de *S. maltophilia* de los esputos de pacientes con fibrosis quística.^{181,384} En los pacientes que no tienen fibrosis quística, se informó que *S. maltophilia* causa un amplio espectro de enfermedades, como neumonía,²⁹⁷ bacteriemia,^{16,227,407,416,501,519,597,676} endocarditis,²⁹³ infecciones relacionadas con el catéter,²⁸⁸ colangitis,⁵⁶⁶ infecciones urinarias,⁷⁶⁹ meningitis^{567,597} e infecciones graves de heridas, sobre todo en pacientes con cáncer.⁷⁷⁰ Morrison y cols.⁵³¹ estudiaron el espectro de enfermedades clínicas en pacientes con infecciones hospitalarias por *S. maltophilia* e informaron tanto una tasa creciente de aislamiento hospitalario como una tasa de mortalidad bruta del 43% en todos los pacientes en los que se cultivó el microorganismo. Los factores de riesgo asociados con mortalidad en los pacientes con aislamiento de *S. maltophilia* son los siguientes: paciente en unidad de cuidados intensivos, edad superior a los 40 años y una fuente pulmonar para el aislado de *S. maltophilia*.⁵³¹ Denton y Kerr escribieron una revisión extensa de las infecciones asociadas con *S. maltophilia*.¹⁸⁵

Otra característica importante en la incidencia creciente de infecciones por *S. maltophilia* puede ser el perfil singular de sensibilidad a los antibióticos del microorganismo. *S. maltophilia* es intrínsecamente resistente a la mayoría de los fármacos antipseudomónicos de uso frecuente, entre ellos los aminoglucósidos y muchos β -lactámicos, que incluyen los eficaces contra *P. aeruginosa*.^{511,564,768} Por lo tanto, la colonización puede ser favorecida por el uso de un tratamiento antipseudomónico

Cuadro 7-10 Características de *S. maltophilia* y complejo *B. cepacia*

PRUEBA	<i>S. MALTOPHILIA</i>	COMPLEJO <i>B. CEPACIA</i>
Oxidasa	-	+ (93)
Motilidad	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+
Glucosa OF	A o débil	A
Maltosa OF	A	A
Lactosa OF	V (86)	A
Manitol OF	-	A
Reducción de NO ₃	V (42)	V (37)
NO ₃ a gas	-	-
Arginina	-	-
Lisina	+	V
Hidrólisis de esculina	+	V (67)
ONPG	+ (93)	V (79)
DNasa	+	-
Polimixina B	S	R
Pigmento	Gris, amarillo leve, lavanda	Gris, verde amarillento, amarillo

Datos de las referencias^{27,280}.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; A: reacción débil; débil, débil débil; S: sensible; R: resistente; ND: no disponible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

de amplio espectro. Cabe señalar que *S. maltophilia* es intrínsecamente sensible a trimetoprim-sulfametoxazol, un fármaco que no tiene ninguna actividad contra *P. aeruginosa* o la mayoría de las otras especies de *Pseudomonas*.^{125,219} Además del problema de la resistencia intrínseca, existen problemas relacionados con las pruebas de sensibilidad de *S. maltophilia*. Algunos métodos automatizados (p. ej., Vitek Legacy; bioMérieux, Hazelwood, MO) tienen un software programado que impide la comunicación de los resultados de sensibilidad si se sabe que el microorganismo de prueba es *S. maltophilia*. Se pueden observar parámetros limítrofes en las pruebas de dilución en agar y microdilución, y han ocurrido lecturas de falsa sensibilidad con los ensayos de difusión con discos de aminoglucósidos (deben ser uniformemente resistentes) y ciprofloxacina.^{210,264} Algunos estudios sobre el uso de la prueba E (explicados en el capítulo 17) para pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *S. maltophilia* han señalado la presencia de microcolonias diminutas o una nube de crecimiento translúcida dentro del área de inhibición que si es omitida podría conducir a resultados de falsa sensibilidad.^{342A,30} Para saber más, el lector puede consultar la revisión de Robin y Janda.⁶³⁰

Familia *Sphingomonadaceae*⁴⁵⁴

GÉNERO *SPHINGOMONAS*

El género *Sphingomonas* fue descrito por Yabuuchi y cols. en 1990⁷²⁷ y fue corregido por Takenuchi y cols. en 1993.⁷²⁸ Los microorganismos de este género son bacilos no esporulados gramnegativos que tienen un único flagelo polar cuando son móviles. Son amarillos, aerobios estrictos y producen catalasa. Las bacterias pertenecientes al género *Sphingomonas* son ubicuas en el suelo, el agua y los sedimentos, y se sabe que las cepas aisladas de estos ambientes descomponen los compuestos aromáticos y, por lo tanto, se espera que se las utilice como un remedio biológico para el medioambiente.³⁹ Actualmente, se sabe que los miembros del género *Sphingomonas* pueden dividirse en cuatro grupos filogenéticos, cada uno de los cuales representa un género diferente. En consecuencia, se han creado tres géneros nuevos: *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopyxis*, además del género *Sphingomonas* para acomodar los cuatro grupos filogenéticos.⁷²⁷ El género corregido *Sphingomonas* contiene al menos 23 especies, de las cuales sólo se cree que *S. paucimobilis*, designada como especie tipo y *S. parapaucimobilis* tienen importancia clínica.

S. paucimobilis, antes conocido como *Pseudomonas paucimobilis* y como grupo III-1 de los CDC, es la especie más común hallada en muestras clínicas humanas. Es un bacilo móvil gramnegativo con un flagelo polar. Sin embargo, pocas células son activamente móviles en cultivo de caldo, lo que hace que la motilidad sea una característica difícil de demostrar. La motilidad se presenta a 18 °C a 22 °C pero no a 37 °C.²⁶⁰ La reacción de oxidasa es positiva, aunque Gilardi ha comunicado que sólo el 90% de las cepas son oxidasa positivas.²¹⁸ Las colonias que crecen en medio de agar sangre tienen pigmento amarillo; sin embargo, esta especie es de crecimiento lento y sólo pueden observarse colonias pequeñas después de 24 horas de incubación. El crecimiento ocurre a 37 °C, pero no a 42 °C, y el crecimiento óptimo ocurre a 30 °C.²⁶⁰ Las cepas aisladas son fuertemente positivas para la hidrólisis de esculina y producen una zona de crecimiento inhibido alrededor de un disco de vancomicina (30 µg) colocado en agar sangre (Schreckenberger P; observación personal). En el cuadro 7-11 se muestran otras características bioquímicas. *S. paucimobilis* ha sido aislado de distintas muestras clínicas, como sangre; LCR; orina; de heridas, vagina y cuello uterino; y del medio-

ambiente hospitalario.^{323,612} También se ha comunicado bacteriemia y peritonitis adquiridas en la comunidad en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria prolongada.⁵¹² Existen algunas comunicaciones de infecciones hospitalarias por *S. paucimobilis* por contaminación de líquidos de hemodiálisis,⁹⁶ contaminación de un sistema de agua hospitalario,¹⁷⁵ contaminación durante el procesamiento in vitro de médula ósea para trasplante⁴²⁶ y sepsis relacionada con catéteres.^{177,345,661,662} También existe una comunicación de bacteriemia por *S. paucimobilis* acompañada por shock séptico en un paciente quemado.¹⁹¹ La mayoría de las cepas son sensibles a tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos; su sensibilidad a otros agentes antimicrobianos, incluidas las fluoroquinolonas, varía.^{217,345,614}

Las características celulares y de las colonias de *S. parapaucimobilis* son similares a las de *S. paucimobilis*. Se diferencia de este último por el ennegrecimiento del papel de acetato de plomo suspendido sobre agar-hierro de Kligler, la capacidad para crecer y alcalinizar el medio de citrato de Simmons y una reacción de desoxirribonucleasa extracelular negativa.⁶²⁷ Se han aislado cepas en muestras clínicas de esputo, orina y vagina.⁶²⁷

Familia *Oceanospirillaceae*

GÉNERO *BALNEATRIX*

Balneatrix es un género nuevo que consiste en una única especie: *B. alpica*.¹⁷⁰ Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1987 durante un brote de neumonía y meningitis en personas que concurren a balnearios de aguas termales (37 °C) en el sur de Francia.^{102,170,344} Se produjeron 35 casos de neumonía y dos casos de meningitis. Las cepas identificadas en ocho pacientes fueron aisladas en sangre, LCR y esputo, y una cepa fue aislada del agua. La bacteria se describe como bacilos gramnegativos, rectos o curvos, móviles por un solo flagelo polar, aerobios estrictos, que crecen en una amplia gama de temperaturas (20 °C a 46 °C). Las colonias tienen 2 a 3 mm de diámetro, son convexas y lisas. El centro de las colonias es amarillo pálido después de 2 a 3 días y pardo pálido luego de 4 días. El microorganismo crece en agar chocolate y agar tripticasa soja pero no en agar de MacConkey. Es oxidasa positivo y no fermentador pero utiliza de forma oxidativa glucosa, manosa, fructosa, maltosa, sorbitol, manitol, glicerol e inositol. Se produce indol y el nitrato es reducido a nitrito. La gelatina se hidroliza débilmente y la lecitinasa es positiva. No se utilizan los siguientes sustratos: arginina, lisina, ornitina, ureasa, esculina, acetanida, almidón y ONPG (cuadro 7-11).^{102,170} Se comunica que *B. alpica* es sensible a la penicilina G y a todos los otros antibióticos β-lactámicos y los aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, sulfamidas, trimetoprim, ofloxacina y ácido nalidíxico. Es resistente a clindamicina y vancomicina.¹⁰²

Familia *Oxalobacteraceae*

GÉNERO *MASSILIA*

El género *Massilia* consiste en una sola especie, *M. timonae*, que es un bacilo gramnegativo aerobio estricto y activamente móvil (con flagelos polares laterales y únicos). La Seola y cols.⁴²³ describieron la cepa tipo como oxidasa negativa y arginina dihidrolasa positiva; sin embargo, Lindquist y cols. comunicaron que la cepa tipo y otras cuatro aisladas en humanos daban reacciones de oxidasa positivas y arginina negativas.⁴⁴³ Las colonias aparecen amarillas pálidas, son definitivamente tenaces en medios de agar y tienden a formar películas sobre la superficie del medio líquido.⁴²³ Se produce ácido de forma oxi-

Cuadro 7-11 Características claves de los pseudomonadales con pigmento amarillo

PRUEBA	PSEUDOMONAS			SPHINGOMONAS			"AGROBACTERIUM"		MASSILIA		GRUPOS DE LOS CDC	
	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. oryzae/habitans</i> ^a	<i>S. parapaucimobilis</i> ^a	<i>S. paucimobilis</i> ^a	Grupo <i>anacallis</i> ^a	<i>B. alpicola</i> ^a	<i>M. timonae</i> ^a	O-1 ^b	O-2 ^c			
Oxidasa	-	-	+(94)	+	+	+	+	V (77)	+			
Motilidad	+	+	+(92)	+	+	+	+	+	+(20)			
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	-(10)	-	V (50)	-	+	V (40)	(10)			
Glucosa OF	A	A	A	A	A	A	Debil	Debil	V (84)			
Xilosa OF	A	A	A	A	A	ND	A	-	-			
Maltosa OF	A	A	A	A	A	A	A	-	A			
Manitol OF	A	A	-	-	-	A	-	-	-			
Inulol	-	-	-	-	-	+	-	-	-			
Esculina	+	-	+	+	+	-	+	+	V (64)			
ONPG	+	-	+	+	V (30)	-	ND	ND	ND			
DNasa	-	-	+	-	-	-	+	ND	ND			
Citrato	+	+	-	+	-	ND	+	-	-			
Acetato de H ₂ S plomo	V (12)	+	-	+	-	-	ND	+	+			
3-cetolactosa	ND	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	ND			
Lipasa	ND	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND			
Polimixina B	S	S	S(89)	V	ND	S	S	ND	ND			
Pigmentos	Amarillo mate	Amarillo mate	Amarillo profundo	Amarillo profundo	Amarillo	Amarillo	Paja	Amarillo	Amarillo			
Flagelos	Multiflora	Polar único	Polar único	Polar único	Polar único	Polar único	Polar único	1-2 polares	1-2 polares			

^aDatos basados de la referencia⁴⁶.

^bDatos basados de las referencias^{44,45}.

^cDatos basados de las referencias^{44,45}.

^dDatos basados de la referencia⁴⁷.

^eDatos basados de la referencia⁴⁸.

^f 90% o más de cepas positivas; V: 11-39% de cepas positivas; S: sensible; A: reacción débil; ND: no disponible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

^aDatos tomados de la referencia¹⁰.
^bDatos tomados de las referencias^{11,12,13}.
^cDatos tomados de las referencias^{14,15}.
^dDatos tomados de la referencia¹⁶.
^eDatos tomados de la referencia¹⁷.
^f90% o más de cepas positivas; - 90% o más de cepas negativas; V: 11-90% de cepas positivas; ND: no disponible; OF: oxidación fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

dativa a partir de algunos hidratos de carbono. Lindquist y cols. informaron que cuando crecían en medio OF sin agregado de hidratos de carbono, las cepas producían una reacción definitivamente alcalina. En consecuencia, una reacción neutra en un tubo con hidratos de carbono era interpretada como débilmente positiva para la producción de ácido.⁴⁴³ En el cuadro 7-11 se señalan otras reacciones bioquímicas. Se ha aislado en una herida quirúrgica, LCR, el fémur de un paciente de 29 años con osteomielitis y en la sangre en otros tres pacientes.^{423,443,697} *M. timonae* es sensible a la mayoría de los antibióticos y se comunicó resistencia a ampicilina, cefalotina y aztreonam.^{423,697}

GÉNERO HERBASPIRILLUM

Este género consiste en pequeñas bacterias espiraladas de las plantas herbáceas que tienen semillas. Las especies de *Herbaspirillum* son bacilos gramnegativos, generalmente curvos y a veces helicoidales. Las células individuales tienen 0,6 µm a 0,7 µm de ancho y 1,5 µm a 5,0 µm de largo y presentan uno a tres o más flagelos sobre uno o ambos polos.³⁶ Mediante estudios de hibridación molecular se ha demostrado que un grupo de cepas aisladas en muestras clínicas antes descrito como EF-1 pertenece al género *Herbaspirillum* y es designado como una nueva especie sin nombre, *Herbaspirillum* especie 3.³⁶ El microorganismo es oxidasa positiva y ureasa positiva; la catalasa es débil o variable. Otras reacciones se muestran en el cuadro 7-12. Se han aislado en el aparato respiratorio, heces, orina, oído, ojo y sitios de heridas.³⁶ No existen datos sobre sensibilidad a los antibióticos.

Familia Alteromonadaceae

GÉNERO SHEWANELLA –GRUPO PRODUCTOR DE SULFURO DE HIDRÓGENO

En 1985 MacDonell y Colwell propusieron el nuevo género *Shewanella*, compuesto por tres especies: *S. putrefaciens* (antes *Pseudomonas putrefaciens*, *Alteromonas putrefaciens* y grupo

1b de los CDC), *S. hanedai* y *S. benthica*.⁴⁰⁴ En la actualidad, existen al menos 22 especies incluidas en el género *Shewanella*, la mayoría de las cuales se asocian con hábitats acuáticos y marinos; sin embargo, la especie tipo, *S. putrefaciens*, ha sido aislada en muestras clínicas humanas. Los CDC reconocen dos biotipos de *S. putrefaciens* sobre la base del requerimiento de NaCl para crecimiento, oxidación de sacarosa y maltosa, y la capacidad de crecer en agar para *Salmonella-Shigella* (SS).⁴⁰² Owen y cols.³⁵³ han mostrado que los microorganismos identificados como *S. putrefaciens* comprenden al menos cuatro grupos genómicos bien separados (I-IV). Sobre la base de las propuestas taxonómicas de Nozue y cols.³³⁰ y Simidu y cols.,⁶⁹³ las cepas que pertenecen al grupo genómico IV de Owen (sinónimo de biotipo 2 de los CDC) deben identificarse como *S. algae* (corregido a *S. algae*).⁷⁴⁶ Khashe y Janda⁷⁹² han comunicado que *S. algae* es la cepa humana predominante aislada en muestras clínicas (77%), mientras que *S. putrefaciens* (biotipo 1 de los CD) representa la mayoría de las cepas aisladas en no humanos (89%). *S. algae* requiere NaCl para su crecimiento, mientras que *S. putrefaciens*, no (cuadro 7-13). Las cepas de *S. putrefaciens* y *S. algae* son oxidasa positivas y móviles por medio de flagelos polares. Se distinguen fácilmente porque son los únicos no fermentadores que producen sulfuro de hidrógeno en medios KIA y TSI. Todas las cepas son positivas para ornitina descarboxilasa, nitrato reductasa y DNasa. Las colonias producen un pigmento naranja tostado en medio de agar sangre. Aunque su aislamiento clínico es infrecuente, *S. putrefaciens* y *S. algae* han sido asociados con úlceras cutáneas,^{17,119,176,180,195,558,532} infecciones óticas,^{213,234,784} infecciones oculares,⁹² artritis y osteomielitis,^{436,690} bacteriemia,^{81,145,357,394,464,558,668,780} endocarditis infecciosa¹⁶⁹ y peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria continua.¹⁵⁷ Varias cepas estudiadas en el laboratorio de microbiología de la University of Illinois han sido aisladas en heces, úlceras sacras por decúbito, úlceras de los miembros inferiores, bilis, humor vítreo y sangre. Es probable que

Cuadro 7-12 Pseudomonadales curvos			
PRUEBA	LARIBACTER HONGKONGENSIS ^a	GRUPO DE LOS CDC O-3 ^b	HERBASPIRILLUM ESPECIE 3 ^c
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+	+ o débil	ND
Motilidad	+	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	+	V (38)	ND
Glucosa OF	–	A	A
Xilosa OF	–	A	A
Manitol OF	–	–	A
Arginina	+	–	ND
Urea	+	–	ND
NO ₃ a NO ₂	+	V (8)	ND
Indol	–	–	ND
Esculina	–	+	–
Citrato	–	–	+
Pigmento	–	–	–
Flagelos	Bipolares	Polar único	1-3 polares
^a Datos tomados de la referencia ²¹¹ . ^b Datos tomados de la referencia ⁴⁰¹ . ^c Datos tomados de la referencia ³⁶ . +: 90% o más de cepas positivas; –: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; S: sensible; A: reacción ácida; ND: no disponible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.			

Cuadro 7-13 Pseudomonadales halófilos, sulfuro de hidrógeno-positivos o ambos

PRUEBA	SHEWANELLA ^a		ALISHEWANELLA ^a	HALOMONAS ^a	CDC ^a
	<i>S. putrefaciens</i>	<i>S. algae</i>	<i>A. fetalis</i>	<i>H. venusta</i>	Grupo de no fermentadores halófilos 1
Oxidasa	+	+	+	+	+
Motilidad	+ p. 1-2	+ p. 1-2	-	+ pe	+ pe
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	+	+	+
Crecimiento en NaCl al 6,5%	-	+	+	+	+
H ₂ S (extremo TSI)	+ (93)	+ (100)	-	ND	-
Crecimiento a 42 °C	-	+	+	ND	V (17)
Glucosa OF	Débil	-	-	+	V (83)
Maltosa OF	-	-	-	+	V (67)
Lactosa OF ^b	-	-	-	-	-
Manitol OF	-	-	-	V (80)	V (67)
Reducción de NO ₃	V (80)	+	+	+	V (33)
NO ₃ a gas	-	-	ND	ND	-
Ornitina	+	+	ND	-	-
Hidrólisis de esculina	-	-	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	-	-
DNasa	+	+	ND	ND	ND

^aDatos tomados de las referencias^{286,322,362}.
^bDatos tomados de la referencia⁷⁷.
^cDatos tomados de la referencia⁷⁰.
^dDatos no publicados de los CDC.
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; A: reacción ácida; Débil: acción débil. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas; S: sensible; R: resistente; ND: no disponible; p: flagelos polares; pe: flagelos peritricos; OF: oxidación-fermentación.

muchas de las infecciones que se informaron causadas por *S. putrefaciens* hayan sido provocadas por *S. algae*.^{195,277} En general, las shewanellas son sensibles a la mayoría de los antibióticos eficaces contra bacilos gramnegativos, salvo penicilina y cefalotina.^{217,280} Algunas investigaciones recientes han señalado que las CIM medidas de *S. algae* a penicilina, ampicilina y tetraciclina eran más altas que las CIM correspondientes de *S. putrefaciens*.^{292,277}

GÉNERO ALISHEWANELLA -GRUPO HALOFÍLICO

Alisewanella fetalis es un bacilo gramnegativo halófilico que crece a temperaturas de entre 25 °C y 42 °C, con un crecimiento óptimo a 37 °C. Se requiere NaCl para su crecimiento. Puede soportar concentraciones de NaCl de hasta un 8%, pero no crece en NaCl al 10%, lo que ayuda a diferenciar esta especie de *S. algae*, que puede crecer en NaCl al 10%.²⁷⁸ Además, a diferencia de *S. algae*, es positivo para hidrólisis de esculina. Es oxidasa positivo y catalasa positivo y asacarolítico. No produce H₂S en el extremo de TSI y KIA. En el cuadro 7-13 se proporcionan otras reacciones. Ha sido aislado de un feto humano en la necropsia; sin embargo, su asociación con infección clínica es incierta.²⁷⁸

Familia Halomonadaceae

GÉNERO HALOMONAS

Halomonas venusta fue descrito al principio como *Alcaligenes venustus*,⁵² pero más tarde fue transferido al género nuevo *Deleya*, como *Deleya venusta*, por Baumann y cols.⁵³ En 1996, Dobson y Franzmann propusieron combinar el género *Deleya* en un género más ampliamente definido, *Halomonas*.¹⁹³ Von Graevenitz y cols. fueron los primeros en

comunicar una infección humana causada por *H. venusta* en una herida provocada por la mordedura de un pez.²⁸¹ Estos autores informaron que el microorganismo creció en los agares BAP y de MacConkey y se presentó como colonias mucoides e incoloras. Se produjeron reacciones positivas con nitrato, urea y esculina. En el cuadro 7-13 se proporcionan otras reacciones bioquímicas. Se notifica que *H. venusta* es sensible a la mayoría de los antibióticos.²⁸¹

El grupo 1 de no fermentadores halófilos de los CDC comprende seis cepas fenotípicamente similares recibidas por los CDC entre 1971 y 1998 que son semejantes a *H. venusta* salvo por la hidrólisis de esculina y la composición celular de ácidos grasos. Cinco de estas cepas se aislaron en hemocultivos humanos, la sexta se identificó en el cultivo de una herida de cadera (CDC: datos no publicados).

Familia Methylobacteriaceae

GÉNERO METHYLOBACTERIUM

Las especies de *Methylobacterium* son bacterias gramnegativas de color rosado que tienen la capacidad de utilizar metano en forma facultativa.²⁷⁷ Se reconocen 14 especies: *M. aminovorans*, *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. lusitanum*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodium*, *M. suomiense*, *M. thiocyanatum* y *M. zatmanii*) y otras biovariedades no asignadas sobre la base del tipo de asimilación de carbono, el tipo electroforético y el agrupamiento por homología de DNA-DNA.^{231,277,278,247} *M. mesophilicum*, antes clasificado como *Pseudomonas mesophilica* y *Vibrio extorquens*, es la especie aislada más a menudo de muestras clínicas humanas. Se comunica que los microorganismos aislados son oxidasa positivos y móviles; sin embargo, la reacción de oxi-

Cuadro 7-14 Características claves de los pseudomonadales con pigmento rosado*

PRUEBA	ESPECIES DE METHYLOBACTERIUM	ESPECIES DE ROSEOMONAS
Oxidasa	+	+
Motilidad	+	V
Crecimiento en agar de MacConkey	-	+
Glucosa OF	V	V
Metanol OF	+	-
Reducción de NO ₃	V	V
Hidrólisis de almidón	+	+
Urea	+	+
Las colonias aparecen oscuras cuando son expuestas a la luz UV de onda larga	+	-
Morfología de las colonias	Secas, coral	Mucoides, rosadas
Morfología con tinción de Gram	Bacilos vacuolados	Bacilos cocoides

*Datos tomados de las referencias^{290,300}.
+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; OF: oxidación-fermentación.

das puede ser débil y puede ser difícil demostrar la motilidad. En nuestra experiencia, todas las cepas esperadas han parecido inmóviles. Otras reacciones claves son pruebas positivas para catalasa, ureasa y amilasa (cuadro 7-14). Se pueden observar características diferenciales adicionales en el artículo de Urakami y cols.⁷⁴⁷ Las cepas aisladas tienen un crecimiento lento en los medios ordinarios y el mejor crecimiento ocurre en agar de Sabouraud, agar carbón con buffer y extracto de levadura o agar de Middlebrook 7H11.²⁵⁰ El crecimiento óptimo ocurre de 25 °C a 30 °C. Las colonias son secas y tienen color rosado o coral con luz incandescente (lámina en color 7-3E). Bajo luz ultravioleta, las colonias aparecen oscuras, debido a la absorción de la luz ultravioleta. Aunque es clasificada como un bacilo gramnegativo, esta especie a menudo no se tiñe bien o puede mostrar resultados variables en la tinción de Gram. Las células individuales contienen vacuolas grandes, sin tinción que proporcionan a este microorganismo un aspecto microscópico singular⁷⁰⁴ (véase lámina en color 7-3F). Se informó que *M. mesophilicum* causa úlceras cutáneas crónicas,⁴²¹ infección de catéteres centrales,⁴⁶³ bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos,^{47,231,254,300,704} sinovitis⁴⁵⁰ y peritonitis en un paciente que recibe diálisis peritoneal ambulatoria continua.⁴⁵³ También se informó el aislamiento en lavados bronquiales²²² y en la córnea de un paciente que recibió corticosteroides.²⁰⁶ Los aislados recuperados de pacientes en el University of Illinois Hospital han sido de sangre, tejido de la pierna y una herida apendicular. En un paciente inmunodeprimido, se comunicó un caso de bacteriemia y fiebre debidos a *M. zatmanii*.³⁰⁷ El agua corriente ha sido implicada como posible modo de transmisión para metilobacterias en el entorno hospitalario porque se ha comunicado que muestran resistencia a la cloración.^{304,324} Para conocer más sobre este tema véase la revisión de Truant y cols.⁷⁴⁴

GÉNERO ROSEOMONAS

Roseomonas es un género recientemente propuesto de bacterias con pigmento rosado que se asemejan fenotípica y genotípicamente a las especies de *Methylobacterium* pero que son separables de estas últimas por su incapacidad para oxidar metanol, asimilar acetamida o por la falta de absorción de la luz UV de onda larga.⁴²⁶ Los miembros del género son bacilos cocoides gramnegativos pletóricos no fermentadores y de tin-

ción débil, que aparecen en pares o cadenas cortas, principalmente con cocos y sólo algún bacilo ocasional (véase lámina en color 7-3G). Crecen en agar sangre de camero al 5%, agar chocolate, agar carbón con buffer y extracto de levadura (BCYE), agar de Sabouraud y, casi siempre (91%), en agar de MacConkey. El crecimiento ocurre a 25 °C, 35 °C y habitualmente 42 °C y aparece como colonias puntiformes, rosadas pálidas, brillantes, elevadas, no fragmentadas y a menudo mucoides después de 2 a 3 días de incubación a 35 °C (lámina en color 7-3H). Todas las cepas son débilmente oxidasa positivas (a menudo después de 30 segundos) u oxidasa negativas, catalasa positivas y ureasa positivas (véase cuadro 7-14). El género *Roseomonas* fue descrito inicialmente en 1993 para incluir tres especies con nombre, *R. gilardii*, *R. cervicalis* y *R. fauriae*, y tres genomoespecies sin nombre (genomoespecies 4, 5 y 6).⁶²⁶ Hace poco, Han y cols. propusieron una especie nueva, *Roseomonas mucosa* y una nueva subespecie, *R. gilardii* subespecie *rosea* (en diferenciación de *R. gilardii* subespecie *gilardii*).²⁹⁰ Se han informado especies de *Roseomonas* en varias comunicaciones de casos únicos de infecciones de sangre o relacionadas con catéteres.^{5,173,462,625,698,719} También se publicó un caso de osteomielitis vertebral causado por especies de *Roseomonas*⁵¹³ y dos casos de peritonitis, uno debido a *R. gilardii*⁶⁶⁴ y otro debido a *R. fauriae*⁶⁴ en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua. En comunicaciones de casos múltiples alrededor del 60% de las cepas aisladas fueron de sangre con un 20% de heridas, exudados y abscesos, y alrededor del 10% de sitios genitourinarios.^{173,438,717} En el University of Illinois Hospital, hemos aislado 21 cepas de bacterias con pigmento rosado en muestras clínicas, principalmente sangre; 16 de éstas se ajustan a la descripción de *Roseomonas* y 5 fueron identificadas como *Methylobacterium*. Hemos observado que las *Roseomonas* crecen muy bien en agar de Sabouraud y producen colonias mucoides rosadas claras (a veces líquidas). Los microorganismos no aparecen negros cuando se los visualiza bajo luz ultravioleta.

Especies sin nombre

Se incluyen a continuación algunos microorganismos con características de pseudomonadales y que carecen de nombre oficial.

- **Grupo 2 similar a *Pseudomonas*.** Es un grupo no clasificado de microorganismos similares a *Pseudomonas* que había sido incluido en el grupo IVd de los CDC. Las cepas son oxidasa positivas y móviles. Se comunica que las colonias en agar sangre tienen una consistencia pegajosa y es difícil eliminarlas.²⁵⁰ Otras características identificadoras son crecimiento en agar de MacConkey; oxidación de glucosa, xilosa, manitol y lactosa; hidrólisis de urea; y reacciones negativas para indol, nitrato, hidrólisis de esculina y oxidación de sacarosa y maltosa.¹³⁹ Son similares a *B. gladioli* pero no oxidan dulcitol ni inositol.⁸⁰² La mayoría de las cepas (66%) son resistentes a la colistina.²⁴⁹ En casos clínicos se aisló en muestras del aparato respiratorio, sangre, líquido cefalorraquídeo, heces, orina y en líquido de diálisis ("dializado").^{250,270,393,408}
- **Grupo WO-1 de los CDC.** Se trata de la designación dada a un grupo de bacilos gramnegativos débilmente oxidativos aislados primariamente de muestras clínicas. Estos bacilos oxidan manitol y glucosa, a menudo débilmente y a veces en forma tardía (3 a 7 días) y reducen el nitrato. La mayoría de las cepas son móviles, con uno o dos flagelos polares; sin embargo, la motilidad suele ser tardía en medio para motilidad o se detecta sólo mediante un preparado húmedo. Las cepas suelen ser oxidasa y catalasa positivas. Algunas cepas producen pigmento soluble (amarillo, tostado, ámbar, verde oliva o pardo). Otras características diferenciales se pueden hallar en el artículo de Hollis y cols.³¹⁴ Es probable que las cepas CDC WO-1 que oxidan xilosa y son citrato positivas sean *Acidovorax delafieldii*, mientras que las cepas WO-1 A que son xilosa negativas y citrato negativas sean *Acidovorax temperans*.³⁰² Las cepas caracterizadas por los CDC se han aislado en sangre (33%), LCR (10%), orina, pulmón, heridas y algunas fuentes ambientales.³¹⁴
- **Grupo 1c de los CDC.** Los miembros del grupo 1c de los CDC son bacilos gramnegativos delgados cortos a largos y móviles con uno o dos flagelos polares. Los microorganismos crecen bien en los agares de MacConkey, SS y habitualmente estrictamente; oxidan glucosa y maltosa; reducen nitrato a nitrito sin gas; producen H_2S en papel de acetato de plomo (casi siempre fuerte); son arginina dihidrolasa positivos; son ureasa y citrato variables; son negativos para la hidrólisis de esculina y gelatina; y crecen bien a 25 °C, 35 °C y habitualmente 42 °C. La mayoría de las cepas aisladas provienen de fuentes humanas, que incluyen orina, esputo, sangre y otros sitios.³⁰² No existen datos de sensibilidad a los antibióticos.
- **Grupos O-1, O-2 y O-3 de los CDC.** Los grupos O-1, O-2 y O-3 de los CDC son bacilos gramnegativos fenotípicamente similares, móviles y por lo general oxidasa positivos. Los grupos O-1 y O-2 tienen pigmento amarillo y se asemejan muy estrechamente al grupo amarillo de *Agrobacterium* y a las especies de *Sphingomonas* (cuadro 7-11). Estos microorganismos crecen poco o en absoluto en agar de MacConkey, suelen hidrolizar la esculina, pero por otra parte son inactivos. Todos son móviles, aunque puede ser difícil demostrar la motilidad. Los microorganismos O-1 aparecen como bacilos gramnegativos uniformemente cortos, los microorganismos O-2 aparecen como bacilos ligeramente pleomorfos, algunas células aparecen delgadas en la porción central con extremos engrosados y las células O-3 aparecen como bacilos curvos delgados, intermedios a ligeramente largos con extremos aguzados (en forma de hoz).^{164,802} Los microorganismos O-3 constituyen el único grupo en el cual no se produce pigmento de crecimiento amarillo y es el único grupo de bacilos predominantemente curvos (cuadro 7-12). La tinción de Gram de las colonias después de 18-24 horas de cultivo en agar-infusión de corazón muestra bacilos curvos delgados, intermedios a ligeramente largos con extremos aguzados (en forma de hoz) que a veces forman rosetas.¹⁶⁴ La mayoría de las cepas de O-3 crecen bien en placas de CAMPY CVA (agar para *Campylobacter* con cefoperazona, vancomicina y anfotericina B) en condiciones microaerófilas, lo que crea la posibilidad de una identificación errónea de los microorganismos O-3 como *Campylobacter*.¹⁶⁴ Las cepas de los tres grupos O han sido de distintas fuentes clínicas. Se informó un caso de neumonía asociada con el grupo O1 complicada por una fistula broncopulmonar y bacteriemia.⁶⁰⁷ Sólo se han comunicado datos de sensibilidad a los antibióticos para el grupo O-3. Todas las cepas evaluadas fueron sensibles a los aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol e imipenem. Se observó resistencia a la mayoría de los β -lactámicos y una sensibilidad variable para cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina y amoxicilina-clavulanato.¹⁶⁴
- **Grupo amarillo de *Agrobacterium*.** Los microorganismos de este grupo están representados por bacilos gramnegativos delgados, intermedios a largos que producen un pigmento de crecimiento insoluble amarillo y se asemejan más estrechamente a *Sphingomonas paucimobilis* y microorganismos grupo O-1 y O-2 de los CDC. El crecimiento en agar de MacConkey varía, la motilidad ocurre a través de un único flagelo polar, y la oxidasa y la catalasa son positivas; oxidan glucosa, xilosa, lactosa, sacarosa y maltosa, pero no manitol. Las reacciones a los hidratos de carbono pueden ser débiles, tardías o ambas.⁸⁰² Una reacción de 3-cetolactona positiva y una reacción de lipasa y DNasa negativas diferencian este microorganismo de *S. paucimobilis* (cuadro 7-11). Las cepas se aislaron en sangre y líquido peritoneal.^{112,324,802}
- **OFBA-1.** OFBA-1 es un bacilo móvil gramnegativo intermedio a largo no clasificado con uno o dos flagelos polares que tiene la propiedad inusual de producir ácido en medio de base OF sin hidratos de carbono; de ahí el acrónimo "OFBA", que significa "OF Base Acid". El microorganismo se asemeja más estrechamente a *P. aeruginosa* desde el punto de vista bioquímico debido a la β -hemólisis, el crecimiento a 42 °C, la presencia de arginina dihidrolasa, la reducción de nitrato a gas y la utilización de la mayoría de los hidratos de carbono.^{783,802} A diferencia de *P. aeruginosa*, es negativo para la producción de pioocianina y pioverdina y la hidrólisis de acetamida. Se ha aislado en sangre, úlceras de las piernas, heridas abdominales, lavado bronquial e infección del túnel de un catéter en un paciente en diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{783,802}

Laribacter hongkongensis

Sobre la base de la afiliación filogenética, esta bacteria pertenece a la familia *Neisseriaceae* y es un bacilo no esporulado anaerobio facultativo. En la tinción de Gram los microorganismos aparecen como bacilos gramnegativos con forma de gaviota o espiralados. Crece en agar sangre de carnero como colonias grises no hemolíticas de 1 mm de diámetro después de 24 horas de incubación a 37 °C en aire ambiente. El crecimiento también ocurre en agar de MacConkey y a 25 °C a 42 °C. No se observa ningún refuerzo del crecimiento con CO_2 al 5%. La mayoría de las cepas son móviles con flagelos polares. Todas las cepas son oxidasa, catalasa, ureasa y arginina dihidrolasa positivas y reducen nitrato, pero no fermentan, oxidan ni asimilan

ningún hidrato de carbono (cuadro 7-12).^{112,136} *L. hongkongensis* ha sido aislado en la sangre y el líquido pleural de un paciente de 54 años con cirrosis¹³⁶ y de las deposiciones de pacientes con diarrea extrahospitalaria.^{124,112,813} Woo y cols. han comunicado una asociación entre *L. hongkongensis* y diarrea extrahospitalaria, la ingesta de pescado y el viaje;⁸¹³ sin embargo, no se ha demostrado un papel causal.²¹⁵ *L. hongkongensis* se ha notificado en países de Asia (China y Japón), Europa (Suiza), África (Túnez) y América Central (Cuba), lo que sugiere que la bacteria se encuentra en todo el mundo.⁸¹³ Sin embargo, en el momento en que se escribe este libro, no se ha comunicado su aislamiento en América del Norte.

Microorganismos móviles con flagelos peritricos

Familia Alcaligenaceae

Esta familia incluye los géneros de relevancia clínica *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Kerstersia* y *Oligella*.^{182,217} Los miembros de la familia *Alcaligenaceae* son bacilos gramnegativos que suelen ser oxidasa positivos, crecen en agar de MacConkey y son móviles por medio de flagelos peritricos. Las características bioquímicas que diferencian a los miembros de esta familia, así como otros ciertos fermentadores con características bioquímicas similares, se detallan en los cuadros 7-15 y 7-16.

GÉNERO ALCALIGENES

La taxonomía del género *Alcaligenes* está estrechamente entrelazada con la del género *Achromobacter*, y ahora varias especies de *Alcaligenes* han sido reclasificadas como especies de *Achromobacter*.¹²³ *A. faecalis* es el miembro de *Alcaligenaceae* aislado con mayor frecuencia en el laboratorio clínico. Los miembros de esta especie provocan reacciones alcalinas fuertes en todos los medios con hidratos de carbono. La mayoría de las cepas forman colonias características con un borde delgado de propagación irregular (véase lámina en color 7-4A). Algunas cepas (antes denominadas *A. odorans*) producen un olor frutal característico (a veces descrito como de manzanas verdes) y un cambio de color verdoso en el medio de agar sangre. Una característica bioquímica clave de esta especie es su capacidad para reducir nitrito pero no nitrato. *A. faecalis* existe en el suelo y en el agua y ha sido aislado de muchos tipos de muestras clínicas. Es una causa rara de otitis aguda, infección de las vías urinarias y bacteriemia.¹⁶⁶ La mayoría de las infecciones son oportunistas y se adquieren por elementos húmedos, como nebulizadores, respiradores y líquidos para lavado. A menudo se encuentra en cultivos mixtos, sobre todo en muestras de úlceras diabéticas de los pies y los miembros inferiores y su importancia clínica es difícil de determinar.

GÉNERO ACHROMOBACTER

El género *Achromobacter*, descrito en 1981 por Yabuuchi y Yano,⁸²⁶ contenía al principio una única especie: *Achromobacter xylosoxidans*. Sobre la base de estudios taxonómicos, Yabuuchi y cols. transfirieron las especies *Alcaligenes rhizlandii* y *Alcaligenes piechaudii* al género *Achromobacter* y propusieron la transferencia de *Alcaligenes denitrificans* al género *Achromobacter* como *Achromobacter xylosoxidans* subespecie *denitrificans*.⁸²³ lo que creó así automáticamente una segunda subespecie, *Achromobacter xylosoxidans* subespecie *xylosoxi-*

dans. Sin embargo, la reclasificación de *Alcaligenes denitrificans* como una subespecie de *Achromobacter xylosoxidans* contradijo la investigación previa que mostraba que los dos taxones son especies distintas.⁷³⁵ En concordancia, Coenye y cols. propusieron que *Alcaligenes denitrificans* fuera reclasificado como *Achromobacter denitrificans*.¹⁴⁶ En este texto, trataremos estos microorganismos como especies separadas, refiriéndonos a ellas como *Achromobacter xylosoxidans* y *Achromobacter denitrificans*, respectivamente. A los fines de la identificación, las especies de *Achromobacter* pueden ser divididas en las especies asacarolíticas y sacarolíticas de acuerdo con su capacidad para oxidar OF glucosa (cuadros 7-15 y 7-16).

Especies asacarolíticas de Achromobacter. *A. piechaudii* fue descrito por primera vez en 1986.³⁹⁹ Puede distinguirse de otras especies de *Alcaligenes* por sus capacidades para reducir nitrato pero no nitrito y crecer en cloruro de sodio al 6,5% (véase cuadro 7-15). Aunque se informó que esta especie ha sido aislada principalmente de material clínico humano, sólo existen raras comunicaciones de un posible papel patogénico para ella. Se informó un caso de secreción ótica crónica en un varón con diabetes⁵⁷¹ y un caso de bacteriemia recurrente en asociación con un catéter intravenoso en un anciano inmunosuprimido.³⁷⁹

Las cepas de *A. denitrificans* se encuentran en el suelo, pero en ocasiones se hallan en muestras clínicas humanas. Se han comunicado aislamientos en tubos de recolección de sangre, sangre, oído, LCR y orina.⁷⁴⁰ Se aisló un microorganismo bioquímicamente similar a *A. xylosoxidans* subespecie *denitrificans*, conocido como grupo similar a *Alcaligenes* 1, de sangre, absceso encefálico, orina, lavado bronquial, articulación de la rodilla y agua, lo que sugiere que puede tener mayor potencial para producir una infección humana. Puede ser diferenciado de *A. denitrificans* por la composición celular de ácidos grasos, la falta de crecimiento en agar SS, la falta de alcalinización de tartrato y acetamida, y una reacción de ureasa positiva (cuadro 7-15).³⁰²

Hace poco, Coenye y cols.¹⁴⁶ describieron dos especies nuevas de *Achromobacter* asacarolítico: *A. insolitus* y *A. spanius*, las cuales pocas veces se encuentran en muestras clínicas humanas. Ambas son oxidasa y catalasa positivas y reducen nitrato sin formación de gas. Ambas son asacarolíticas y desde el punto de vista bioquímico es difícil separar una de otra y de otras especies de *Achromobacter* y de *Alcaligenes faecalis*.¹⁴¹ *A. rhizlandii* es un comensal del suelo y no se sabe si es patogénico para los seres humanos.³⁸⁶

Especies sacarolíticas de Achromobacter. *A. xylosoxidans* se distingue fácilmente del género *Alcaligenes* y las especies asacarolíticas de *Achromobacter* por la acidificación de glucosa y xilosa OF (de ahí el nombre de la especie). Ha sido aislado de muchos tipos de muestras, principalmente de sangre,^{4,200,265,795} pero también de LCR, lavados bronquiales, orina, pus y heridas.^{353,779,740} Puede ser un patógeno oportunista del que se ha comunicado que produce infecciones hospitalarias, entre ellas neumonía, bacteriemia y meningitis, en pacientes con enfermedad subyacente.^{510,626,718} Se informó que *A. xylosoxidans* coloniza al aparato respiratorio de niños intubados y de pacientes con fibrosis quística y que la colonización de estos últimos se asocia con una exacerbación de los síntomas pulmonares.^{201,657}

Holmes y cols. separaron los acromobacteres en seis grupos (A–F) sobre la base de los patrones genéticos.³¹⁸ *Achromobacter* grupos A, C y D constituyen una única especie y se observó que eran idénticos a *Ochrobactrum anthropi*.³²⁴ *Achromobacter* grupos B y E constituyen biotipos de un género nuevo único y especies que aún no han recibido nom-

Cuadro 7-15 Características claves de *Alcaligenes*, *Achromobacter* asacarolíticos, *Kerstersia*, *Bordetella* y especies relacionadas^a

PRUEBA	ALCALIGENES	ACHROMOBACTER		CDC	KERSTERSIA	BORDETELLA				OLIGELLA	CUPRIAVIDUS	
	<i>A. faecalis</i>	<i>A. denitrificans</i>	<i>A. piechaudii</i>	Grupo I similar a <i>alcaligenes</i> ^{b,c}	<i>K. gyiorum</i> ^d	<i>B. trematum</i> ^e	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>O. ureolytica</i>	<i>C. pauculus</i>	<i>C. gilardii</i> ^f
Oxidasa	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	V	+	+	+	+	V (84)	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	V (79)	+	ND
Glucosa OF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xilosa OF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NO ₃ a NO ₂	—	+	+	+	—	V (66)	—	—	+ (92) ^b	+	V (11) ^b	—
NO ₃ a N ₂	—	+	—	+	—	V (11)	—	—	—	V (58)	—	—
NO ₂ a N ₂	+	+	—	+	—	ND	—	—	—	V (63)	—	—
Urea	—	V (31)	—	V (75)	—	—	—	—	++	++	++	—
PAD	—	—	—	ND	ND	ND	V (15)	—	V (25)	+	V (7)	ND
Acetamida	+	V (45)	V (42)	—	—	V (89)	+	+	—	V (11)	—	—
NaCl al 6,5%	+	—	+	V (13)	V	ND	—	—	—	—	—	—
Malonato	+	+ ^g	V (29) ^g	ND	—	+	+	—	+	ND	ND	ND
Flagelos	pe	pe	pe	pe	ND	pe	pe	pe	pe	pe	pe	1-2 p

^aA menos que se afirme otra cosa, los datos provienen de la referencia²⁴⁹.^bPorcentaje positivo derivado de la referencia^{80,12}.^cSimilar a *A. denitrificans*, puede ser diferenciado por la incapacidad para crecer en agar SS.^dDatos tomados de la referencia¹⁴⁰.^eDatos tomados de la referencia¹⁵⁵.^fDatos tomados de la referencia¹³⁴.^gDatos tomados de la referencia¹⁹⁹.

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; pe: flagelos peritricos; p: flagelos polares; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son los porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-16 Características claves de las especies de *Ochrobactrum*, *Rhizobium* y *Achromobacter* sacarolíticas^d

PRUEBA	OCHROBACTERUM	RHIZOBIUM	AGROBACTERIUM	ACHROMOBACTER			OFBA-1 ^d
	<i>O. anthropi</i> <i>O. intermedium</i> ^b	<i>R. radiobacter</i>	" <i>Agrobacterium</i> grupo amarillo" ^h	Grupo B	Grupo E	Grupo F	<i>A. xylosoxidans</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+, pe	+, pe	+, p, 1-2 ^e	+, p, L	+, p, L	+	+, pe
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	+	+	+	—	+
Glucosa OF	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa OF	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa OF	—	+	+	—	—	—	+
Manitol OF	V (50)	+	—	+	—	+	+
Adonitol OF	+	+	—	—	—	+	ND
Dulcitol OF	+	+	—	—	—	+	ND
ONPG	—	+	V (40) ^f	+	+	—	—
NO ₃ a NO ₂	+(98)	V (84)	V (40) ^f	+(100) ^g	+(100) ^g	+	+(100) ^g
NO ₃ a N ₂	+(91)	— (8)	ND	+(100) ^g	+(100) ^g	ND	+(100) ^g
NO ₂ a N ₂	+(99) ^f	V (38) ^g	—	+(100) ^{g,h,i}	+(100) ^{g,h,i}	—	ND
Urea	+	+	—	+	+	+	V (50)
PAD	+	+	—	ND	ND	ND	+
Acetamida	—	—	ND	—	—	ND	V (66)
Esculina	V (40)	+	+	+	+	+	—
Pigmento	—	—	Amarillo	—	—	—	—

^aA menos que se afirme otra cosa; los datos provienen de la referencia²⁴⁹^bSe ha sugerido que la resistencia a la colistina diferencia *O. intermedium* (resistente a la colistina) de *O. anthropi* (sensible a la colistina).⁷⁷¹^cDatos tomados de la referencia⁷²⁴.^dDatos tomados de la referencia⁷⁸³.^eMóviles a temperatura ambiente, inmóviles a 37 °C.⁷²⁴^fDatos tomados de la referencia⁷²⁷.^gDatos tomados de la referencia⁸⁰².^hCuando se evalúa a las 48 horas de incubación, es posible que la reducción de nitritos sólo se observe en medios que contienen ≤ 0,01% de nitritos.ⁱHolmes comunica una reducción de nitritos negativa para *Achromobacter* grupo E.³²⁷

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas positivas; V: 11-89% de cepas positivas; pe: flagelos peritricos; p: flagelos polares; L: flagelos laterales; ND: resultados no disponibles. Los números entre paréntesis son los porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

bre.^{317,318,322} *Achromobacter* grupo F es genéticamente distinto de los grupos B y E.^{317,318} Las pruebas bioquímicas útiles para la separación de *Achromobacter* grupos A-F de bacterias fenotípicamente similares han sido comunicadas por Holmes y cols.³²⁷ *Achromobacter* grupos B y E pueden ser separados de *O. anthropi* por las propiedades de ser *O*-nitrofenol-galactósido (ONPG) positivo y esculina positivo y por no producir ácido a partir de adonitol y dulcitol.³²² Los *Achromobacter* grupo F son similares a *O. anthropi* salvo en que no producen gas a partir de nitrato y no crecen en agar de MacConkey (véase cuadro 7-16). *Achromobacter* grupo B ha sido aislado en la sangre de pacientes con septicemia^{317,321,363} y en un paciente con endocarditis de válvula protésica.⁴⁹⁵ También se han aislado *Achromobacter* de los grupos grupos E y F en la sangre.^{317,318}

GÉNERO BORDETELLA

En la actualidad, el género *Bordetella* comprende ocho especies, cuatro son móviles con flagelos peritricos (*B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. trematum* [cuadro 7-15] y cuatro son inmóviles (*B. holmesii*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. petrii* [cuadro 7-21]). Las tres especies humanas más frecuentes, *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, no pueden ser diferenciadas genotípicamente mediante estudios de biología de DNA y es probable que sean subespecies o cepas de una sola especie con diferentes adaptaciones del huésped.⁵⁶⁹ Sin embargo, desde el punto de vista fenotípico se comportan de modo muy diferente; *B. bronchiseptica* es móvil por medio de flagelos peritricos y crece fácilmente en medios comunes, mientras que tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* son inmóviles. *B. pertussis* requiere medios especiales para su crecimiento, en tanto *B. parapertussis* crece en agar sangre, agar chocolate y agar de MacConkey. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son los agentes etiológicos de la tos ferina (coqueluche) y se explican en detalle en el capítulo 9, con los bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales.

Las colonias de *B. bronchiseptica* crecen bien en agar sangre y agar de MacConkey y en 24 horas aparecen como colonias blancas, translúcidas e incoloras de alrededor de 1,5 mm de diámetro. En tinción de Gram, los microorganismos se presentan como cocobacilos pequeños. Tienen la característica bioquímica definida de convertir rápidamente el agar urea de Christensen (véase lámina en color 7-2A). Otras características diferenciales se muestran en el cuadro 7-15. *B. bronchiseptica* se encuentra en el aparato respiratorio de animales mamíferos domésticos y salvajes como perros, gatos, conejos, roedores, cerdos y cerdos ("bronchiseptica" deriva de la palabra griega *brachys*, que significa "tráquea"). Es una cepa aislada con poca frecuencia en el laboratorio clínico y sólo se han publicado algunos casos de infecciones humanas.²⁴¹ Pedersen y cols.⁵⁷⁰ comunicaron el aislamiento de sólo 12 cepas de *B. bronchiseptica* de un total de 565 no fermentadores, todos los cuales fueron de muestras respiratorias obtenidas de pacientes que no tenían infecciones. La mayoría de los casos asintomáticos han sido en cuidadores de animales que presentaron síntomas similares a los de la tos ferina leve. Ghosh²⁴¹ comunicó un caso de septicemia y bronconeumonía mortal inducida por *B. bronchiseptica* en un paciente alcohólico desnutrido, lo que indica que el microorganismo puede ser virulento en determinadas circunstancias. Woolfrey y Moody revisaron 25 casos de infección humana por *B. bronchiseptica* asociada con sinusitis, traqueobronquitis, neumonía aguda, neumonía con septicemia, septicemia y tos ferina.⁸¹⁸ Para los casos de tos ferina, es probable que *B. bronchiseptica* actúe como colonizador y no como

causa. Se ha comunicado que origina neumonía en pacientes con SIDA,^{8,178,181,203,234,456,498,534,816} leucemia aguda,²⁶⁴ fibrosis quística⁷⁸⁷ y traumatismo torácico⁶¹³ y luego del trasplante de médula ósea^{54,126} y del trasplante cardíaco.¹¹⁷ Existen dos comunicaciones de bronquitis causada por *B. bronchiseptica*; una en una mujer anciana⁵⁷⁶ y otra en un paciente inmunodeprimido.⁴⁹⁷ La mayoría de las cepas de *B. bronchiseptica* son sensibles a casi todos los antibióticos, con excepción de ampicilina, cefamandol y cefoxitina.²⁶⁶

B. avium es un patógeno de las aves que produce coriza o rinotraqueítis en aves de corral, sobre todo en pavos.³⁸⁷ Similar a las especies del complejo *B. bronchiseptica*, *B. avium* muestra un fuerte tropismo por el epitelio ciliado de las vías aéreas superiores.

Bordetella hinzii, denominada antes *Acaligenes faecalis* tipo II o similar a *B. avium*, ha sido aislada del aparato respiratorio de pollos y pavos en distintas partes del mundo. En los seres humanos se ha aislado en la sangre^{149,378} y el esputo,^{232,758} con reiterada recuperación de la bacteria en el esputo de un paciente con fibrosis quística.²³¹ *B. hinzii* también ha sido aislado de múltiples muestras biliares recogidas en 6 meses de un receptor de un trasplante hepático con colangitis.²⁷ *B. hinzii* son móviles y oxidasa positivos y deben distinguirse de los microorganismos fenotípicamente similares, como se muestra en el cuadro 7-15.

Las cepas de *B. holmesii* han sido aisladas principalmente en sangre humana.^{280,444,494,508,535,683,731,801} Shepard y cols. analizaron en los CDC las historias clínicas de 30 pacientes con bacteriemia por *B. holmesii* cuyos cultivos fueron remitidos a estos centros para su identificación. De los 26 pacientes de los que se dispuso de datos, 22 (85%) estaban anatómicamente asplénicos. *B. holmesii* fue el único microorganismo aislado de las muestras de sangre en 25 (96%) de los 26 pacientes.⁶⁸³ A pesar de las comunicaciones iniciales de que *B. holmesii* no causa enfermedad respiratoria, los pacientes pueden estar infectados o colonizados por *B. holmesii* en la nasofaringe. Un científico del Massachusetts State Laboratory Institute comunicó el aislamiento de *B. holmesii*, pero no de *B. pertussis*, de 32 muestras nasofaríngeas recogidas en un período de 3 años de pacientes con síntomas similares a los de la tos ferina.^{494,381} Loeffelholz y cols. demostraron que *B. holmesii* daba resultados positivos fuertes con su ensayo de PCR para *B. pertussis* IS481, lo que confundía la confiabilidad diagnóstica de estos ensayos.⁴⁵⁴ Russell y cols. comunicaron un caso de neumonía intersticial y lobular con progresión a la fibrosis pulmonar causada por *B. holmesii*.⁶⁵² Se informa que *B. holmesii* es sensible a amikacina, ampicilina, cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, gentamicina, mezlocilina, trimetoprim-sulfametoxazol, imipenem, ciprofloxacina y piperacilina-tazobactam.⁷³¹ *B. holmesii* era clasificado antes como del grupo NO-2 de los CDC, es inmóvil y oxidasa negativo, lo que lo vuelve fenotípicamente similar a especies de *Acinetobacter* y al grupo NO-1 de los CDC (cuadro 7-21). Se amplían las características morfológicas y fenotípicas en el apartado "Microorganismos inmóviles y oxidasa negativos".

B. petrii es inmóvil y oxidasa positivo. Sólo ha sido aislado del medioambiente y es el único miembro del género capaz de crecimiento anaerobio.⁷⁸⁶

B. trematum es oxidasa negativo y móvil con flagelos peritricos. El crecimiento ocurre en agar de MacConkey y se utiliza malonato. En el cuadro 7-15 se detallan otras reacciones bioquímicas. Las cepas han sido aisladas de infecciones óticas y heridas de seres humanos, pero no de las muestras respiratorias.⁷⁵⁵ Dorittke y cols. describieron el aislamiento de un "mi-

croorganismo similar a *B. avium*” en un paciente con otitis media crónica, donde la cepa respectiva (LMG 13506) fue reclasificada más tarde como *B. trematum*.^{197,755} Daxboeck y cols. informaron el aislamiento de *B. trematum* de una úlcera de pie diabético; sin embargo, no hubo pruebas de un papel causal del microorganismo en la infección del pie.¹⁷²

GÉNERO KERSTERSIA

Coenye y cols. describieron un género nuevo, *Kerstersia* gen. nov. que consiste en una única especie *K. gyiorum* (del griego *gyion*, que significa “miembro”: se refiere al hecho de que la mayoría de las cepas fueron aisladas en heridas humanas de las piernas).¹⁴⁰ Se presentan como pequeñas células cocoides gramnegativas (1-2 µm), células cocoides que se presentan aisladas, de a pares o en cadenas cortas. En agar nutriente, las colonias son planas o ligeramente convexas, con bordes lisos y un color que varía del blanco al pardo claro. El crecimiento ocurre a 28 °C a 42 °C, la motilidad es dependiente de la cepa y todas las cepas son asacarolíticas. Todas las cepas son catalasa positivas, pero son negativas para oxidasa, arginina, lisina y ornitina descarboxilasa, β-galactosidasa, gelatinasa, amilasa, ureasa, DNasa, reducción de nitrato y nitrito, e hidrólisis de esculina (cuadro 7-15). Las cepas se han aislado de distintas muestras humanas, que incluyen heces, esputo, y heridas de piernas y tobillos. La patogenicidad se desconoce.¹⁴⁰

GÉNERO OLIGELLA

El género *Oligella* consiste en dos especies: *O. urethralis* (antes *Moraxella urethralis* y grupo M-4 de los CDC) y *O. urealytica* (antes grupo IVe de los CDC).⁶⁴⁴

Las colonias de *O. urealytica* se observan primero como de crecimiento lento en medio de agar sangre, y producen colonias puntiformes después de 24 horas pero colonias grandes después de 3 días de incubación. Las colonias son blancas, opacas, enteras y no hemolíticas. Las cepas de *O. urealytica* se asemejan fenotípicamente a las especies de *Achromobacter* asacarolíticas, *B. bronchiseptica* y *Cupriavidus pauculus*, en que son asacarolíticas, oxidasa positivas y móviles por medio de flagelos peritricos. Difieren de las especies de *Achromobacter* por su capacidad para hidrolizar rápidamente la urea en agar urea de Christensen. En el cuadro 7-15 se muestran otras características diferenciales. La mayoría de las cepas han sido aisladas en orina humana, a menudo de pacientes con catéteres permanentes durante tiempos prolongados. Se comunicó un caso de bacteriemia en un paciente con uropatía obstructiva.⁶³² También se informó bacteriemia por *O. urealytica* en un paciente con SIDA⁴⁷⁷ y en un niño de 18 meses con neumonía.⁴²⁷ *O. urealytica* fue aislado de un paciente en el University of Illinois Hospital que se presentó con una herida facial con impétigo y celulitis facial. Suele ser sensible a la mayoría de los antibióticos, aunque existe una comunicación de una cepa altamente resistente que demostró resistencia in vitro a penicilinas, cefalosporinas, imipenem, meropenem, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol, pero que era sensible a los aminoglucósidos, tetraciclina y levofloxacina.⁴²⁷

O. urethralis es similar a las especies de *Moraxella* porque es una bacteria gramnegativa cocobacilar, oxidasa positiva e inmóvil. Las colonias son más pequeñas que las de *M. osloensis* y son opacas a blancuzcas. *M. urethralis* y *M. osloensis* comparten otras similitudes bioquímicas, como acumulación de ácido poli-β-hidroxibutírico y falta de hidrólisis de urea, pero pueden diferenciarse sobre la base de la reducción de

nitrito, el crecimiento a 42 °C y la alcalinización de formato. itaconato, prolina y treonina (todos positivos en *O. urethralis*, negativos en *M. osloensis*).⁵⁹¹ También se puede utilizar la composición celular de ácidos grasos para diferenciar ambas especies.⁸⁰² Las características bioquímicas que ayudan a diferenciar *O. urethralis* de las especies de *Moraxella* se muestran en el cuadro 7-19. Como su nombre lo indica, *O. urethralis* se aísla más a menudo de muestras uretrales y se lo considera un comensal del aparato genitourinario; sin embargo, en raros casos puede conducir a urosepsis.⁶⁰⁶ Hubo un caso de artritis infecciosa por *O. urethralis* que imitó clínicamente a una artritis gonocócica.⁴⁹⁹

Familia Rhizobiaceae

El único miembro de importancia médica de la familia *Rhizobiaceae* es el género *Rhizobium*. Sin embargo, los miembros de este género son fenotípicamente similares a las especies de *Achromobacter* sacarolíticas y a *Ochrobactrum anthropi*, de los cuales deben ser diferenciados. Las características útiles para separar estos microorganismos se presentan en el cuadro 7-16.

GÉNERO RHIZOBIUM (ANTES AGROBACTERIUM)

El ex género *Agrobacterium* contenía varias especies de patógenos de las plantas que aparecen en los suelos de todo el mundo.³⁸⁵ Como resultado de una gran cantidad de estudios comparativos, se reconocieron cuatro especies de *Agrobacterium*: *Agrobacterium radiobacter* (antes *A. tumefaciens* y grupo Vd-3 de los CDC), *Agrobacterium rhizogenes* (antes transferido al género *Sphingomonas* como *S. rosa*),^{728a} *Agrobacterium vitis*⁵⁵² y *Agrobacterium rubi*.⁶⁶⁶ La separación de las especies fenotípicamente indistinguibles *A. tumefaciens* y *A. radiobacter* se basó en la presencia de un plásmido inductor de tumores de las plantas, presente en *A. tumefaciens* y ausente en *A. radiobacter*. Algunos estudios genéticos mostraron que las dos especies eran las mismas, y se propuso rechazar el nombre *A. tumefaciens* y designar *A. radiobacter* como especie tipo para el género *Agrobacterium*.⁶⁶⁶ Young y cols.^{834,835} propusieron una descripción corregida del género *Rhizobium* para incluir a todas las especies de *Agrobacterium*. Según esta propuesta las nuevas combinaciones son *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi* y *R. vitis*.⁸³⁴ Farrand y cols. han presentado pruebas a partir de comparaciones clásicas y moleculares que apoyan la conclusión de que las agrobacterias biovariedades 1 y 3 son lo suficientemente diferentes de los miembros del género *Rhizobium* para justificar la retención del género *Agrobacterium*.²¹⁶ Sin duda, no se ha escrito aún el capítulo final sobre la clasificación de *Agrobacterium radiobacter* y es probable que la controversia continúe durante algunos años; sin embargo, según los objetivos de este texto hemos decidido aceptar los argumentos establecidos por Young y cols.⁸³⁵ y referirnos a esta bacteria como *Rhizobium radiobacter*.

Las pruebas bioquímicas claves utilizadas para diferenciar *R. radiobacter* de las especies estrechamente relacionadas *Ochrobactrum anthropi* se muestran en el cuadro 7-16. Las características claves para este grupo de microorganismos son una reacción de ureasa rápida y una prueba positiva para fenilalanina desaminasa. Las colonias de *R. radiobacter* crecen en condiciones óptimas a 25 °C a 28 °C, pero también a 35 °C. Se presentan circulares, convexas, lisas y no pigmentadas a beige claras en agar sangre. Las colonias pueden tener aspecto húme-

do y se tornan muy mucoides y rosadas en agar de MacConkey con una incubación prolongada (lámina en color 7-4B). En ocasiones, *R. radiobacter* se aísla de muestras clínicas, pero sólo rara vez se lo relaciona con infección humana. En casos de infección humana comunicada, se ha aislado más a menudo *Reizobium* en sangre,^{68,94,202,205,207,224,288,475,598,603,635,808} seguida por líquido de diálisis peritoneal,^{294,633,635} orina,^{7,635} y líquido ascítico.⁶¹⁰ La mayoría de los casos ocurrieron en pacientes con catéteres transcutáneos o prótesis biomédicas implantadas, y el tratamiento eficaz a menudo requiere la extracción del dispositivo.^{68,202,205,207,224,288,598,603,635,808} Lai y cols. examinaron los registros médicos de 13 pacientes con infecciones por *R. radiobacter* durante el período 1996-2002. Diez (76%) tenían un proceso maligno hematológico o un cáncer de órgano sólido subyacente. Seis (46%) presentaron neutropenia febril durante el curso de la infección. El 44% de las infecciones fueron bacteriemias relacionadas con catéteres y el 92% fueron intrahospitalarias.⁴²⁰ También se comunicaron dos casos de endoftalmitis por *R. radiobacter* ulterior a la extracción de cataratas.^{503,526} La sensibilidad a los antibióticos varía y requiere pruebas individuales para cada aislamiento. Lai y cols. comunicaron que todas las cepas evaluadas en su serie eran sensibles a cefepima, piperacilina-tazobactam, carbapenémicos y ciprofloxacina.⁴²⁰

Familia Brucellaceae

GÉNERO OCHROBACTERUM

Ochrobacterium anthropi es el nombre dado a especies de "Achromobacter" ureasa positivas designadas antes como grupo Vd-1 y Vd-2 de los CDC y *Achromobacter* grupos A, C y D de Holmes y cols.^{327,328} Sin embargo, los estudios ulteriores han mostrado que el biogrupo C y algunas cepas que pertenecen al biogrupo A constituyen un grupo de hibridación de DNA-DNA homogéneo separado de *O. anthropi* que ha recibido la designación de especie nueva de *Ochrobacterium intermedium*.⁷¹ Ambas especies de *Ochrobacterium* están estrechamente relacionadas con especies de *Brucella* y *Ochrobacterium intermedium* ocupa una posición filogenética intermedia entre *O. anthropi* y *Brucella*.⁷⁷¹ Las dos especies comparten propiedades fenotípicas idénticas. Son oxidasa positivas, sacarolíticas y móviles por medio de flagelos peritricos. Se observa un buen crecimiento en medios de rutina en 24 horas. Las colonias tienen alrededor de 1 mm de diámetro y se presentan circulares, bajas, lisas, brillantes y enteras. Las cepas observadas por los autores crecen fácilmente en agar de MacConkey y tienen apariencia mucosa. Las pruebas clave útiles para distinguir *O. anthropi* de microorganismos relacionados incluyen la incapacidad para hidrolizar urea, la incapacidad para hidrolizar esculina y una prueba de ONPG negativa. Otras pruebas bioquímicas útiles para diferenciar *O. anthropi* de especies de *Brucella* y de las especies sacarolíticas de *Achromobacter* se encuentran en el cuadro 7-16. No existe ninguna prueba bioquímica que separe *O. intermedium* de *O. anthropi*; sin embargo, se ha sugerido que se puede utilizar la resistencia a la colistina (polimixina E) y a la polimixina B para separar *O. intermedium* de *O. anthropi* (sensible).⁷⁷¹ Se informó un caso de infección hepática piógena debido a *O. intermedium*;⁵⁰⁵ no obstante, debido a la estrecha similitud fenotípica entre *O. anthropi* y *O. intermedium*, es posible que ciertas infecciones que se atribuyeron a *O. anthropi* en realidad hayan sido causadas por *O. intermedium*.

Ahora todas las cepas de *O. anthropi* fueron aisladas en muestras clínicas humanas (*anthropi* deriva del griego y significa "de ser humano"). Las cepas han sido aisladas predomi-

nantemente de sangre, heridas, aparato urogenital u orina, aparato respiratorio, oídos, heces, un ojo y LCR.^{18,46,86,113,328,474,765} Las comunicaciones recientes de sepsis relacionada con catéteres venosos centrales causadas por *O. Anthropi* son muy preocupantes.^{6,128,272,286,383,401,655,714} El aislamiento de este microorganismo de la sangre debe plantear la sospecha de una infección relacionada con un catéter venoso central. Existe una comunicación de shock séptico luego de una infusión venosa periférica de una solución contaminada con *O. anthropi*³⁸⁸ y una comunicación de bacteriemia hospitalaria en cinco receptores de trasplante de órganos luego de la infusión de globulina antitrombocítica contaminada.²¹⁴ Se informaron dos casos de endocarditis infecciosa debida a *O. anthropi*.^{473,637} Se comunica que *O. anthropi* es sensible a aminoglucósidos, carbenicilina, fluoroquinolonas, imipenem, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, pero resistente a otros antimicrobianos.^{65,249,383,780}

Microorganismos inmóviles y oxidasa positivos

Familia Flavobacteriaceae

Vandamme y cols. notificaron que ninguna de las especies establecidas de flavobacterias se relaciona estrechamente con las especies tipo de *F. aquatile*; por lo tanto, propusieron incluir los microorganismos genéricamente mal clasificados *F. balustinum*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum*, *F. meningosepticum* y *F. scopthalmum* en un género nuevo: *Chryseobacterium*, con *C. gleum* como especie tipo.⁷⁵² Los mismos autores informaron que *Flavobacterium breve* representaba un taxón genético distinto y propusieron el nombre *Empedobacter brevis* para esta especie.⁷⁵² Además, se observó que *Flavobacterium odoratum* comprendía dos especies diferentes, renombradas *Myroides odoratus* y *Myroides odoratimimus*.⁷⁵¹ Algunos investigadores franceses que trabajaban junto con el grupo de Vandamme en Bélgica publicaron una descripción corregida de la familia *Flavobacteriaceae* y una clasificación y descripción corregidas del género *Flavobacterium*.⁶² En el recuadro 7-8 se presenta un esquema de la clasificación y la nomenclatura actual de los miembros de importancia médica de la familia *Flavobacteriaceae*.²³⁷

Cabe señalar que ninguna de las especies restantes de *Flavobacterium* se encuentran en muestras clínicas humanas y ninguna es indol-positiva, característica que ha sido sinónimo del género *Flavobacterium* en el pasado. En el cuadro 7-17 se describen las características diferenciales claves de los miembros de importancia clínica de la familia *Flavobacteriaceae* y bacterias relacionadas. La mayoría de las especies producen colonias de pigmento amarillo en medio de agar sangre y todas son oxidasa positivas. Todas las especies son inmóviles y negativas para reducción de nitrato y la mayoría no crecen en agar de MacConkey. La mayoría de las especies (salvo *Weeksella virosa*) son resistentes a la polimixina, una propiedad que comparten con el grupo pseudomallei en otra parte de este capítulo. Sólo explicaremos mejor los miembros de importancia clínica de las *Flavobacteriaceae*. Los dilemas taxonómicos de *Flavobacterium* y *Sphingobacterium* han sido revisados con detalle en otros sitios.^{62,685,752,822}

CHRYSEOBACTERIUM, EMPEDOBACTER Y GRUPOS SIN NOMBRE DE LOS CDC

Estas ex especies de *Flavobacterium* se presentan naturalmente en el suelo, el agua, las plantas y los productos alimenticios. En el medioambiente hospitalario existen en los siste-

Recuadro 7-8 Descripción de los miembros de importancia médica de la familia *Flavobacteriaceae***Género I. *Flavobacterium***

Género tipo que consiste en 29 especies aisladas de ambientes acuáticos. No se asocia con muestras clínicas humanas

Género IV. *Bergeyella*

B. zoohelcum

Género V. *Capnocytophaga*

C. ochracea

C. canimorsus

C. cynodegmi

C. gingivalis

C. granulosa

C. haemolytica

C. sputigena

Género VII. *Chryseobacterium*

C. gleum

C. balustinum

C. defluvii

C. indologenes

C. indoltheticum

C. joostei

C. meningosepticum^a

C. miricola

C. scophthalmum

Género X. *Empedobacter*

E. brevis

Género XV. *Myroides*

M. odoratus

M. odoratimimus

Género XXIII. *Weeksella*

W. virosa

C. gleum y el grupo IIb de los CDC están tabulados en forma individual en el cuadro 7-17. El grupo IIb es genéticamente heterogéneo e incluye cepas de *C. indologenes*, *C. gleum* y probablemente otras genomoespecies. Se necesitarán más estudios de hibridación de DNA-DNA para resolver este problema. La separación fenotípica entre *C. indologenes* y *C. gleum* ha sido difícil; sin embargo, la producción de ácido a partir de xilosa y el crecimiento a 41 °C son regularmente positivos en los grupos de DNA agrupados alrededor de la cepa tipo de *C. gleum*.⁷⁴⁸ En el cuadro 7-17 se pueden hallar otras características que separan a los miembros de este grupo de microorganismos.

C. meningosepticum (antes *Flavobacterium meningosepticum* y grupo IIa de los CDC)^a es la especie que más se asocia con enfermedad importante en los seres humanos. En los adultos se informó que causa neumonía, endocarditis, infecciones de heridas, bacteriemia posoperatoria y meningitis casi siempre en pacientes con enfermedad subyacente grave.^{32,67,124,150,228,293,305,440,476,550,628,684,735,798}

Aunque sólo rara vez se encuentra meningitis neonatal es importante diagnosticar la enfermedad con exactitud porque las epidemias pueden ocurrir en salas de recién nacidos y se ha comunicado una mortalidad de hasta un 55%.⁷⁸⁰

C. indologenes (antes *F. indologenes* y grupo IIb de los CDC) es la cepa que con más frecuencia se aísla en humanos, aunque pocas veces reviste importancia clínica.⁷⁸⁰ Se ha documentado que produce bacteriemia en pacientes hospitalizados con una enfermedad subyacente grave, aunque la mortalidad es relativamente baja incluso entre los pacientes que han recibido antibióticos sin actividad contra *C. indologenes*.³⁴¹ Las infecciones hospitalarias debidas a *C. indologenes* han sido relacionadas con el uso de dispositivos permanentes durante la internación.^{343,346,540} Se han comunicado raros casos de neumonía, meningitis, piomiositis, queratitis y bacteriemia.^{276,341,343,461} En el laboratorio de microbiología del University of Illinois Hospital *C. indologenes* fue aislado principalmente en heridas y en cultivos traqueales; en un neonato que nació por cesárea fue aislado en la sangre. El lactante no tenía sepsis y más tarde fue dado de alta del hospital.

Empedobacter brevis (antes *Flavobacterium breve*) y los grupos IIe, IIg, IIh sin nombre de los CDC pocas veces se aíslan de material clínico y se sabe poco acerca de su participación en enfermedades clínicas. Janknecht y cols. comunicaron un brote de endoftalmítis por *E. brevis* en una serie de pacientes en los que se realizó extracción de cataratas el mismo día por el mismo cirujano, lo que sugiere que la fuente de la infección pudo provenir de algo desde la lente hasta el proceso de esterilización.³⁵⁸ Se notificó un caso de meningitis causado por el grupo IIe de los CDC⁷⁹⁰ y también se comunicaron las características fenotípicas de varias cepas de importancia clínica de los grupos IIc y IIg.^{311,313}

Es difícil la elección apropiada de los antibióticos eficaces para el tratamiento de las infecciones por criseobacterias. Las especies de *Chryseobacterium* son intrínsecamente resistentes a muchos antibióticos utilizados a menudo para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas (aminoglucósidos, antibióticos β-lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol), pero suelen ser sensibles a los agentes utilizados para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias grampositivas (rifampicina, clindamicina, eritromicina, espafloxacin, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina).^{217,707,780} Aunque los primeros investigadores recomendaron la vancomicina para el tratamiento de una infección grave por *C. meningosepticum*,^{296,599} algunos estudios recientes han mostrado una

^a Nota del autor en el momento de la impresión: *Chryseobacterium meningosepticum* ha sido trasladado recientemente a un género nuevo con el nombre *Elizabethkingia meningoseptica*.

mas de agua y sobre superficies húmedas. Se distinguen con facilidad de otros no fermentadores por su capacidad para producir indol en caldo de triptófano (véase lámina en color 7-2C). A menudo, la reacción de indol es débil y difícil de demostrar; por lo tanto, se debe utilizar el método de Ehrlich más sensible (ya explicados en este capítulo). *C. indologenes* se reconoce con facilidad por la producción de colonias amarillo oscuras (lámina en color 7-4C). *C. meningosepticum*, por el contrario, produce colonias con un pigmento amarillo muy pálido que pueden no ser evidentes en el examen inicial a las 24 horas. Las colonias de *Empedobacter brevis* son amarillo pálido. La producción de pigmento puede aumentar incubando el cultivo durante otras 24 horas a temperatura ambiente. En general, las especies de *Chryseobacterium* crecen poco, o en absoluto, en agar de MacConkey y se considera que oxidan la glucosa, aunque la mayoría de las cepas fermentan lentamente la glucosa después de la incubación prolongada. Desde el punto de vista microscópico, las células de *C. meningosepticum*, *C. indologenes* y grupos IIe, IIh y IIi son más delgadas en su porción central que en su porción periférica e incluyen formas filamentosas; las células IIh son significativamente más pequeñas que las de otras especies. Cabe señalar que los resultados de las pruebas (p. ej., DNasa, indol, urea, hidrólisis de almidón) en este grupo dependen de la elección del medio, los reactivos y la duración de la incubación.⁵⁸² *Chryseobacterium indologenes*,

Cuadro 7-17 Características clave de las no fermentadoras indol positivas

PRUEBA	CHRYSEOBACTERIUM			GRUPOS DE LOS CDC ^a						WEEKSIIA	BERGEYELLA	EMPEDOBACTER
	<i>C. meningosepticum</i> ^b	<i>C. gleum</i> ^b	<i>C. indologenes</i> ^b	IIb ^c	IIc ^d	IIf ^e	Ilg ^e	IIh ^e	IIi ^e	<i>W. virosa</i> ^b	<i>B. zoohelcum</i> ^b	<i>E. brevis</i> ^b
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Motilidad	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Crecimiento en agar de MacConkey	V (26)	V (50)	—	V (54)	—	—	+	—	—	V (79)	—	—
Glucosa OF	+	+	+	+	+	D ^e	—	+	+	—	+	V (80)
Manitol OF	+	—	V (10)	V (10)	—	—	—	—	—	—	—	—
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ a NO ₂	—	V (67)	V (14)	V (22)	+	—	—	—	—	—	—	—
NO ₂ a N ₂	ND	+	—	V (20)	+	—	+	—	—	—	—	—
Gelatina	+	+	+	V (78)	V (20)	—	—	D ^e	—	—	—	+
Almidón	V (8)	+	+	+	ND	+	ND	+	V (14)	—	—	V (40)
Esculina	+	+	+	V (70)	+	—	—	+	+	ND	ND	—
ONPG	+	+	V (41)	V (57)	ND	ND	ND	—	+	ND	ND	—
DNasa	+	V (17)	V (7)	ND	ND	—	ND	V (78)	—	V (13)	—	+
Urea	—	+	V (10)	V (14)	—	—	—	—	—	—	+	—
Penicilina	R	R	12% S	ND	ND	S	ND	67% S	57% S	S	S	R
Polimixina	R	R	3% S	ND	ND	S	ND	22% S	R	S	R	R
Pigmento	Amarillo pálido	Amarillo-naranja	Amarillo-naranja	Amarillo-naranja	Ocre a amarillo claro	—	—	—	— o amarillo	Marrón claro	—	Amarillo pálido

^aDatos tomados de las referencias^{249,802}.^bPorcentaje de positivos derivado de la referencia²⁴⁹.^cPorcentaje de positivos derivado de la referencia⁸⁰².^dDatos tomados de la referencia³¹³.^eGilardi²⁴⁹ informa glucosa negativo; Weyant⁸⁰² informa glucosa positivo o positivo tardío.^fGilardi²⁴⁹ informa gelatina positivo; Weyant⁸⁰² informa gelatina negativo.

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; pe: flagelos peritricos; p: flagelos polares; S: sensible; R: resistente; ND: resultados no disponibles; D: diferentes resultados comunicados; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son los porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

mayor actividad in vitro de minociclina, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y quinolonas.^{67,223,707} Otro elemento que complica la elección del tratamiento antibiótico apropiado es el hecho de que los valores críticos de CIM para resistencia y sensibilidad de las criseobacterias no han sido establecidos por el Clinical Laboratory Standards Institute (antes, National Committee for Clinical Laboratory Standards) y los resultados de las pruebas de difusión con discos han resultado poco fiables para predecir la sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Chryseobacterium*.^{2,114,223,782} Se ha demostrado que el Etest es una alternativa posible al método de dilución estándar en agar para evaluar cefotaxima, ceftazidima, amikacina, minociclina, ofloxacina y ciprofloxacina, pero no piperacilina.³⁴⁰ El tratamiento definitivo para las cepas de importancia clínica debe estar guiado por los patrones de sensibilidad individual obtenidos mediante un método de determinación de la CIM tras una noche de incubación.

WEEKSELLA Y BERGEYELLA

El género *Weeksellia* originario contenía dos especies: *W. virosa* (antes grupo IIf de los CDC) y *W. zoohelcum* (antes grupo IIj de los CDC).^{330,331} Vandamme y cols. mostraron que estas dos especies representan taxones genéticos separados y, por lo tanto, propusieron la reclasificación de una de estas especies, *W. zoohelcum*, como *Bergeyella zoohelcum*.⁷⁵² Ambas especies son oxidasa positiva, no crecen en agar de MacConkey y son no pigmentadas, no sacarolíticas e indol positivas. Además, comparten la característica inusual de ser sensibles a la penicilina, lo que permite diferenciarlas con facilidad de los géneros relacionados (véase cuadro 7-17). *W. virosa* (derivada de la palabra latina "viscoso") forma colonias mucoides y pegajosas difíciles de extraer del agar. Al principio se observa que las colonias son no pigmentadas, pero una mayor incubación puede conducir a una pigmentación marrón clara. *W. virosa* es ureasa negativo y sensible a la polimixina B. Ha sido recuperado fundamentalmente del aparato urogenital en mujeres, pero aún no existen pruebas de que pueda desempeñar algún papel patológico.^{330,480,616,617} Existe una comunicación de España de peritonitis espontánea causada por *Weeksellia virosa*.⁷⁰

Una característica diferencial clave de *B. zoohelcum* es la producción de una reacción de ureasa intensa en agar urea de Christensen. Forma colonias pegajosas que al principio son no pigmentadas pero puede formar colonias tostadas a amarillas con la incubación prolongada. Es sensible a la penicilina, pero resistente a la polimixina B. *B. zoohelcum* es parte de la flora bucal y nasal normal de perros y gatos.⁶⁶⁵ Por lo tanto, no es sorprendente que la mayoría de las cepas aisladas en seres humanos hayan sido el resultado de una mordedura de esos animales.^{331,506,615,689,802} Ha sido causa de septicemia por infecciones cutáneas graves en pacientes ancianos que permitieron que un gato durmiera arriba de sus piernas^{406,536} y de neumonía en un paciente expuesto a un perro que era portador de este microorganismo.²⁸² Existe una comunicación de meningitis debida a *B. zoohelcum* luego de numerosas mordeduras de perro.⁸³

GÉNERO MYROIDES

Vancanneyt y cols.⁷⁵¹ determinaron que el microorganismo antes clasificado como *Flavobacterium odoratum* consistía en un grupo heterogéneo que comprendía dos especies distintas para las que propusieron los nombres *Myroides odoratus* y *Myroides odoratimimus*. Las células de ambas especies son

bacilos gramnegativos de 0,5 µm de diámetro y 1 a 2 µm de longitud. Pueden aparecer varios tipos de colonias, pero la mayoría de ellas tienen pigmento amarillo y forman colonias difusas que se propagan y que pueden confundirse con la morfología de colonias de una especie de *Bacillus* (lámina en color 7-4D). La mayoría de las cepas producen un olor frutal característico (similar al de *A. faecalis*). *Myroides* crece en la mayoría de los medios, incluido agar de MacConkey. El crecimiento ocurre a 18 °C a 37 °C pero no a 42 °C. Son asacarolíticas pero son oxidasa, catalasa, ureasa y gelatinasa positivas. No se produce indol y se reducen los nitritos (pero no los nitratos) (cuadro 7-18). No hay ninguna prueba fenotípica de rutina para diferenciar las dos especies de *Myroides* y sus diferencias están limitadas a las pruebas de asimilación y la composición celular de ácidos grasos.⁷⁵¹ Los microorganismos identificados como *M. odoratus* fueron hallados principalmente en orina, pero también se encontraron en muestras de heridas, esputo, sangre y oído.^{329,828} La infección clínica por especies de *Myroides* es excepcional; sin embargo, se han informado casos de fascitis necrosante rápidamente progresiva y bacteriemia³⁴⁷ y celulitis recurrente con bacteriemia.^{36,275} La mayoría de las cepas son resistentes a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, aztreonam y carbapenémicos.³²⁹

Familia Sphingobacteriaceae

SPHINGOBACTERIUM Y PEDOBACTER

Las esfingobacterias tienen pigmento amarillo, son oxidasa positivas e inmóviles. Se diferencian de criseobacterias y weekselas por su falta de producción de indol a partir de triptófano y se separan de las especies de *Myroides* por su capacidad para producir ácido en OF glucosa. Las especies actuales de *Sphingobacterium* son *S. multivorum* (antes *Flavobacterium multivorum*, grupo IIk-2 de los CDC), *S. spiritivorum* (incluye especies antes designadas *Flavobacterium spiritivorum*, *F. yabuuchiae* y grupo IIk-3 de los CDC), *S. antarcticum*, *S. faecium*, *S. thalophilum* y especies sin nombre *Sphingobacterium* genomoespecies 1 y 2.^{237,333,687,729,822} Las especies *Sphingobacterium S. heparinum* y *S. piscium* han sido ubicadas en un nuevo género *Pedobacter* como *P. heparinus* y *P. piscium*.⁷¹³ El género *Pedobacter* contiene varias especies de bacterias productoras de heparinasa halladas en el suelo, el limo activado o los peces, pero no en fuentes humanas. *S. multivorum* y *S. spiritivorum* son las dos especies aisladas más a menudo de muestras clínicas humanas. Puede distinguirse del microorganismo similar *Sphingomonas paucimobilis* (antes IIk-1) por la falta de motilidad y resistencia a la polimixina B. En el cuadro 7-18 se muestran otras características diferenciales de estas bacterias. *S. multivorum* ha sido aislado de distintas muestras clínicas, pero sólo pocas veces se ha asociado con infecciones graves, como peritonitis y septicemia.^{25,190,226,326,601} Sangre y orina han sido las fuentes más frecuentes para el aislamiento de *S. spiritivorum*.^{324,483,743} *S. thalophilum* se ha aislado de heridas, sangre, ojo, abscesos e incisión abdominal.⁸⁰² Una prueba de nitrato positiva y el crecimiento a 42 °C diferencia *S. thalophilum* de otras especies de *Sphingobacterium*. El microorganismo antes conocido como *Sphingobacterium mizutaii* ha sido transferido al género *Flavobacterium*,^{237,333} pero está incluido en las esfingobacterias en el cuadro 7-18 porque es indol negativo y se asemeja fenotípicamente a las especies de *Sphingobacterium*. *F. mizutaii* ha sido aislado de muestras de sangre, LCR y heridas y puede diferenciarse de las especies de *Sphingobacterium* por su falta de crecimiento en agar de MacConkey y su falta habitual de actividad de ureasa.⁸⁰² En general, las especies de *Sphingobacterium* son resis-

Cuadro 7-18 Características claves de *Myroides*, *Sphingobacterium* y *Flavobacterium mizutaii*^a

PRUEBA	MYROIDES	SPHINGOBACTERIUM			FLAVOBACTERIUM
	<i>M. odoratus</i> , <i>M. odoratimimus</i>	<i>S.</i> <i>multivorum</i>	<i>S.</i> <i>spirativorum</i>	<i>S.</i> <i>thalpophilum</i>	<i>F.</i> <i>mizutaii</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+
Motilidad	-	-	-	-	-
Crecimiento en agar de MacConkey ^b	V (91)	+	V (46)	+	-
Glucosa OF	-	+	+	+	+
Mitol OF	-	-	+	-	-
Indol	-	-	-	-	- ^c
NO ₃ a NO ₂	-	-	-	+	-
NO ₃ a N ₂	V (46)	ND	ND	ND	+
Gelatina	+	-	-	V (86)	-
Amilón	-	V (79)	-	+	-
Esculina	-	+	+	+	+
ONPG	ND	+	+	+	+
DNasa	+	-	+	+	-
Ureasa	+	+	+	+	-
Penicilina	19% S	R	R	R	R
Polimixina	R	R	R	R	R
Pigmento	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo

- 90% o más de cepas positivas; - 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; S: sensible; R: resistente; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son los porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

^a Datos tomados de las referencias^{249,802}.

^b Crecimiento en agar de MacConkey de la referencia⁸⁰².

^c Se puede observar un color rosado muy débil en la capa de xileno.⁸⁰²

sensibles a los aminoglucósidos y a la polimixina B, mientras que son sensibles in vitro a las quinolonas y a trimetoprim-sulfametoxazol. La sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos varía y requiere pruebas individuales para cada cepa aislada.⁷⁰⁷

Familia Moraxellaceae

La familia Moraxellaceae, como se construye actualmente, contiene tres géneros: *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*.^{237,577}

GÉNERO MORAXELLA

Varias características claves nos hacen sospechar que un no fermentador desconocido puede pertenecer al género *Moraxella*. Después de 24 horas en agar sangre, las colonias tienden a ser pequeñas y puntiformes (habitualmente menos de 0,5 mm de diámetro), con poco crecimiento o ninguno en agar de MacConkey. Las células bacterianas aparecen como pequeños diplococos o diplobacilos gramnegativos en los preparados teñidos con Gram con tendencia a resistir la descolonización.¹⁶⁹ Tanto las reacciones de citocromo oxidasa como de catalasa son positivas (la primera descarta las especies de *Acinetobacter*, la última descarta las especies de *Kingella*). La incapacidad de las especies de *Moraxella* para formar ácido a partir de hidratos de carbono también elimina a la mayoría de las especies de *Neisseria* de la consideración. La mayoría de las especies de *Moraxella* son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de penicilina. Se puede utilizar el examen de microscopio de Gram teñidos con Gram preparados desde la zona externa de inhibición alrededor del disco de sensibilidad a la penicilina

para distinguir las especies de *Neisseria* (que retienen su morfología cócica) de las especies de *Moraxella* (que producen formas pleomorfas alargadas; véase lámina en color 7-4E y F).¹⁰⁶ Todas las especies de *Moraxella* son inmóviles.

Las especies de *Moraxella* de importancia clínica son *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. osloensis*, *M. atlantae* (grupo M-3 de los CDC) y *M. catarrhalis*. Este último se analiza junto con las especies patógenas de *Neisseria* en el capítulo 11. Los grupos M-2 y M-4 de los CDC han sido nombrados *Psychrobacter phenylpyruvicus* y *Oligella urethralis*, respectivamente y se describen más adelante en esta sección. Los grupos M-5 y M-6 de los CDC han sido colocados en el género *Neisseria*, aun cuando su aspecto microscópico es el de bacilos gramnegativos. El grupo M-5 ha sido designado *Neisseria weaveri*³¹⁶ y el grupo M-6 se ha denominado *Neisseria elongata* subespecie *nitroreducens*.²⁷³ Es difícil distinguir estas especies, junto con otras especies de *Moraxella* descritas recientemente, como *M. canis*³⁵⁹ y *M. lincolnii*,⁷⁵³ de las especies establecidas de *Moraxella*. Las especies animales incluyen *M. bovis*, aislado en ganado sano y en otros animales, entre ellos, caballos, *M. boevei* y *M. caprae* (cabras), *M. caviae* (cobayos), *M. cuniculi* (conejos) y *M. ovis* (ovejas).

En el cuadro 7-19 se proporcionan algunas pruebas diferenciales útiles para la identificación de las especies de *Moraxella* de importancia clínica. *M. atlantae*, *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens* son similares en muchas de sus características. El crecimiento de *M. atlantae* es estimulado por sales biliares y desoxicolato de sodio, mientras que *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens* no lo son. Sólo *M. lacunata* licua la gelatina, mientras que *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens* reducen nitrato a nitri-

to.^{81,585} Puede ser difícil la separación entre *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens* que no se propaga, porque la hidrólisis de gelatina (con cualquier método) y la licuefacción de la porción inclinada de Loeffler puede llevar más de una semana. En algunos casos, el análisis de ácidos grasos puede ayudar a determinar la especie.⁸⁰² Como muchas cepas de *Moraxella* tienen requerimientos nutricionales algo especiales y las reacciones bioquímicas suelen ser negativas o ambiguas, muchos laboratorios deciden referirse a los miembros de este grupo como "especies de *Moraxella*".

Las especies de *Moraxella* constituyen la flora normal sobre las superficies mucosas y se considera que tienen bajo potencial patogénico. Se presentan más a menudo en el aparato respiratorio y menos en el aparato genital y, en ocasiones, producen infección sistémica. *M. lacunata*, que desde comienzos de siglo pasado se sabe que produce conjuntivitis, tiene requerimientos nutricionales especiales y necesita medios enriquecidos sin peptona o el agregado de ácido oleico o suero de conejo para contrarrestar un efecto proteolítico tóxico. Además de la conjuntivitis, se informó que esta especie causa queratitis, sinusitis crónica y endocarditis.^{524,627,741} *M. nonliquefaciens* también puede requerir suplementos de suero para un crecimiento óptimo. Es parte de la flora normal de las vías aéreas altas en el ser humano y a menudo se lo aísla en la cavidad nasal. Ha sido aislado en sangre, ojo, LCR, vías aéreas bajas y otros sitios locales^{80,271,741} y se ha asociado con endoftalmitis^{204,425,453} y artritis séptica.³⁶⁸ Se han aislado cepas mucoides atípicas de *M. nonliquefaciens* de muestras de esputo de tres pacientes con enfermedad pulmonar crónica.¹⁷¹ *M. osloensis* suele aislarse de muestras clínicas y no requiere suplementos para el crecimiento. En general, no es patogénico cuando se lo aísla de seres humanos; sin embargo, se han comunicado casos de sinusitis, conjuntivitis, bronquitis, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, meningitis, endocarditis, infección de catéter venoso central y septicemia.^{89,218,290,640,678,720} *M. atlantae* crece lentamente en medio de cultivo y produce colonias con tendencia a formar una zona de propagación después de 48 horas de incubación.⁸¹ Constituyen una causa rara de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos.^{88,174}

M. canis es una especie nueva que reside en las vías aéreas altas de perros y gatos. En humano han sido aislado en sangre,³⁵⁹ en ganglios linfáticos⁷⁶¹ y en una herida por mordedura de perro.³⁵⁹ *M. canis*, *M. catarrhalis*, *M. cuniculi*, *M. caviae* y *M. ovis* pertenecen a las moraxelas cocoides, las cuales, a diferencia de las moraxelas bacilares, muestran actividad de DNasa. Las cepas de *M. canis* se asemejan a *M. catarrhalis* en la tinción de Gram; sin embargo, la morfología de sus colonias en agar sangre de carnero se asemeja más estrechamente a la de los miembros de las enterobacterias (colonias grandes y lisas).³⁵⁹ Algunas cepas también pueden producir colonias muy viscosas que semejan colonias de *Klebsiella pneumoniae*.³⁵⁹ La producción de un pigmento pardo en agar de Mueller-Hinton que contiene almidón también es típica de la mayoría de las cepas de *M. canis*.³⁵⁹ *M. lincolnii* ha sido aislado principalmente del aparato respiratorio de seres humanos.⁷⁵³

La mayoría de las cepas de *Moraxella* son sensibles a penicilina y sus derivados, cefalosporinas, tetraciclinas, quinolonas y aminoglucósidos.^{217,641,707} Sólo se ha comunicado rara vez la producción de β -lactamasa en especies de *Moraxella* distintas de *M. catarrhalis*.^{368,524,641} Debido a la naturaleza de requerimientos especiales de muchas especies de *Moraxella* y la pre-visibility del perfil antibiótico, las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, salvo por las pruebas de β -lactamasa, no suelen realizarse en casos clínicos.

GÉNERO *PSYCHROBACTER* Y GRUPOS DE OXIDANTES EUGÓNICOS (EO) DE LOS CDC

Las especies de *Psychrobacter* de importancia clínica son *P. immobilis* y *P. phenylpyruvicus* (antes *Moraxella phenylpyruvica*).⁸²

***Psychrobacter phenylpyruvicus*.** *P. phenylpyruvicus* es tanto urea positivo como fenilalanina desaminasa positivo, características que ayudan a distinguirlo de las especies de *Moraxella* y *Oligella urethralis* (cuadro 7-19). Los trabajadores de laboratorio deben estar conscientes de que *P. phenylpyruvicus* puede asemejarse fenotípicamente a las especies de *Brucella*; han existido varias comunicaciones de especies de *Brucella* mal identificadas como *P. phenylpyruvicus* en los sistemas de identificación comerciales.^{42,50,573} La diferenciación entre *P. phenylpyruvicus* y especies de *Brucella* requiere microscopia (*Brucella* son cocobacilos diminutos) y pruebas para la acidificación de xilosa y glucosa.^{584,588} *P. phenylpyruvicus* es asacarolítico, mientras que las especies de *Brucella* utilizan xilosa y habitualmente glucosa cuando se utiliza un método suficientemente sensible para detectar la acidificación de glucosa.⁵⁸⁴ *P. phenylpyruvicus* es una causa rara de infecciones en los seres humanos, pero se informó que produce endocarditis,^{284,742} peritonitis¹¹¹ y una lesión fulgurante del pie.³⁹³

***Psychrobacter immobilis*, *Paracoccus yeei* (EO-2) y grupos EO-3 y EO-4 de los CDC.** La clasificación de este grupo de oxidantes eugónicos y cepas sacarolíticas de *Psychrobacter immobilis* es incompleta. Los miembros de este grupo son bacilos gramnegativos (que a veces parecen gramvariables) aerobios, cocoides a cortos, gruesos o ligeramente gruesos que crecen, a veces poco, en agar de MacConkey. Todos son fuertemente oxidasa positivos, inmóviles e indol negativos y utilizan glucosa, xilosa y lactosa⁵¹⁷ (véase cuadro 7-20). Daneshvar y cols.¹⁶⁷ propusieron el nombre *Paracoccus yeei* (más tarde cambiado a *yeei* de acuerdo con el código internacional para la nomenclatura bacteriana)²¹³ para el ex grupo EO-2 de los CDC. Los grupos EO-3 y EO-4 aún no tienen nombre. *P. yeei* crece tanto en agar sangre como en agar de MacConkey y se presenta como colonias no pigmentadas mucoides a muy mucoides después de 48 horas de incubación (lámina en color 7-4G). *P. yeei* también tiene una morfología celular definida con forma de O en el examen con tinción de Gram debido a la presencia de células vacuoladas o teñidas periféricamente (lámina en color 7-4H).⁵¹⁷ Esta morfología en O no se observa en *P. immobilis* o cepas EO-3 o EO-4. Las cepas EO-3 y EO-4 tienen un pigmento amarillo no difusible definido que no se observa en *P. immobilis* o *P. yeei*.⁵¹⁷

La mayoría de las cepas de *P. immobilis* crecen levemente o en absoluto a 35 °C y crecen mejor a 20 °C.³⁴⁹ *P. immobilis* está dividido en cepas sacarolíticas y asacarolíticas. Las cepas sacarolíticas tienen todas las características de las cepas asacarolíticas (cuadro 7-20), salvo en que se oxida glucosa, xilosa y lactosa, pero no sacarosa ni maltosa. Las cepas asacarolíticas son fenotípicamente similares a *P. phenylpyruvicus*. El diagnóstico de *P. immobilis* puede confirmarse mediante estudios de transformación, perfil de ácidos grasos celulares y temperaturas de crecimiento óptimas < 35 °C.^{517,802} Muchas cepas tienen un olor semejante al agar alcohol feniletílico (PEA) (rosas)³⁴⁹ y son resistentes a la penicilina pero sensibles a la mayoría de los otros antibióticos.^{259,452}

Los cuatro grupos han sido recuperados de muestras clínicas. *P. yeei* se aisló de distintas infecciones de heridas humanas y sangre.^{167,229} Se comunicó que EO-3 causó peritonitis en un paciente en diálisis peritoneal continua.¹⁵⁵ EO-4 fue aislado en sangre, orina y un seno paranasal, pero se desconoce la impor-

Cuadro 7-19 Características claves de *Moraxella*, *Oligella urethralis* y especies similares a *Moraxella*

PRUEBA	MORAXELLA							PSYCHROBACTER	OLIGELLA	NEISSERIA		GRUPO DE BACILOS 1 DE GILARDI ^{1,h}
	<i>M. atlantae</i> ^o	<i>M. canis</i> ^{o,b,c}	<i>M. catarrhalis</i> ^o	<i>M. lacunata</i> ¹	<i>M. lincolni</i> ^{o,d}	<i>M. nontliquefaciens</i> ^o	<i>M. osloensis</i> ^o	<i>P. phenylpyruvicus</i> ^o	<i>O. urethralis</i> ^o	<i>N. weaveri</i> ^{2a,c}	<i>Elongata subespecie nitroreducens</i> ^{o,d,e}	
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	-	-	-	V(10)	V(70)	V(86)	+	V(45)	V(54)	+
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa OF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V(23)	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PAD	-	-	V(68)	V(17)	ND	-	V(14)	+	+	V(71)	-	+
Gelatina	-	-	-	V(42)	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ reducido	-	+	+(92)	+	-	+	V(24)	V(68)	-	-	+	-
NO ₂ reducido	-	V	V(86)	-	V	-	-	-	+	+	+	-
DNasa	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina	S	S	R	S	S	S	92% S	73% S	S	S	S	S
Forma celular	CB	C	C	CB	CB	CB	CB	CB	CB	R	R	R

^aDatos tomados de la referencia⁸⁰².
^bDatos tomados de la referencia³⁵⁹.
^cM. canis produce un pigmento pardo cuando crece en agar de Mueller-Hinton que contiene almidón.³⁵⁹
^dDatos tomados de la referencia⁷³³.
^eDatos tomados de la referencia¹¹.
^fDatos tomados de la referencia²⁷³.
^gN. elongata subespecie elongata es catalasa negativo, glucosa negativo y nitrato negativo y nitrito positivo. N. elongata subespecie glycolytica es catalasa positivo, débilmente glucosa positivo o glucosa negativo, nitrato negativo y nitrito positivo. N. elongata subespecie nitroreducens es catalasa negativo y débilmente glucosa positivo o glucosa negativo y reduce nitrato y nitrito.^{11,316}
^hDatos tomados de la referencia³¹⁵.
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; S: sensible; R: resistente; ND: resultados no disponibles; C: coco; CB: cocobacilo; B: bacilo; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-20 Características claves de *Psychrobacter immobilis*, *Paracoccus yeei*, EO-3, EO-4 y EF-4b^a

	PSYCHROBACTER	PARACOCUS	GRUPOS DE LOS CDC		
	<i>P. immobilis</i>	<i>P. yeei</i> (EO-2)	EO-3	EO4	EF-4B
Oxidasa	+	+	+	+	+
Motilidad	—	—	—	—	—
Crecimiento en agar de MacConkey	V(40)	V(64)	+	V(67)	V(65)
Glucosa OF	— ^b	+	+	+	+
Xilosa OF	— ^b	+	+	+	—
NO ₃ a NO ₂	V(40)	+	—	—	+
Crecimiento a					
25 °C	+	V(73)	+	+	V(88)
35 °C	V(40)	+	+	+	+
42 °C	V(20)	V(36)	V(14)	—	V(69)
Células con forma de O	—	+	—	—	—
Pigmento amarillo	—	—	+	V(83)	—
Olor	Similar a la rosa	—	—	—	Palomita de maíz

^aDatos de la referencia⁸⁰².^bLas cepas de *P. immobilis* sacarolíticas comparten todas las características de las cepas asacarolíticas enumeradas aquí excepto en que oxidan glucosa, xilosa y lactosa, pero no sacarosa ni maltosa.⁸⁰²

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

tancia clínica de estas cepas.⁸⁰⁰ Se comunicó que un caso de infección ocular y un caso de meningitis del lactante fueron causados por *P. immobilis*.^{259,452}

Grupo EF-4b de los CDC. EF-4b junto con EF-4a fueron designados originariamente grupo de fermentadores eugónicos 4 (EF-4); sin embargo, EF-4b no fermenta la glucosa, no hidroliza la arginina y no produce gas a partir de nitrato, lo que lo separa de las cepas fermentadoras de glucosa designadas como grupo EF-4a de los CDC (véase cap. 9). Las cepas EF-4b son bacilos cocoides a cortos inmóviles y oxidasa y catalasa positivos. Las colonias en las placas de cultivo son no pigmentadas y se comunica que huelen como las palomitas de maíz. La mayoría de los cultivos provienen de infecciones humanas luego de mordeduras de perros y gatos.⁸⁰² La sensibilidad a los antibióticos se asemeja a la de EF-4a.

Familia *Neisseriaceae*

GÉNERO *NEISSERIA*

Algunas especies de *Neisseria* tienen forma de bacilos en la tinción de Gram y es posible que no sean reconocidas inicialmente. Dos de estas especies son *N. weaveri* y *N. elongata* y ambas deben ser diferenciadas de otros bacilos no fermentadores fenotípicamente similares (véase cuadro 7-19). Los miembros cocoides del género *Neisseria* se describen en el capítulo 11.

Neisseria weaveri se encuentra como flora bucal normal en perros y se asocia con infecciones de heridas humanas resultantes de mordeduras.^{11,44,271,316} También se aisló en sangre,^{11,99} esputo y lavados bronquiales^{11,562} y en líquidos oculares, peritoneal y torácico.¹¹ Existe una comunicación de la infección de una herida en un niño después de ser mordido por un tigre siberiano blanco.⁹⁸ *N. weaveri* aparecen como bacilos rectos aerobios, gramnegativos, anchos, pletóricos, intermedios a grandes de longitud variable, con una tendencia a crecer en cadenas o bacilos más grandes en caldos de cultivos.¹¹ El crecimiento ocurre a 25 °C y 35 °C, y la mayoría de las cepas crecen a

42 °C. Las colonias son blanco grisáceas, con un borde entero, planas, algo brillantes y lisas. *N. weaveri* es inmóvil, fuertemente positivo para oxidasa y catalasa, y negativo para utilización de hidratos de carbono. Se reducen los nitritos, pero no los nitratos, y es débilmente positivo para fenilalanina desaminasa (cuadro 7-19).¹¹ Es sensible a penicilina, colistina y vancomicina.

Se considera que *N. elongata* subespecie *elongata* y *N. elongata* subespecie *glycolytica* son colonizadores transitorios de las vías aéreas altas humanas y del aparato urogenital; sin embargo, se informó que *N. elongata* subespecie *elongata* produce endocarditis humana,^{15,528} y *N. elongata* subespecie *glycolytica* fue aislada de heridas humanas y hemocultivos.^{12,336} La mayoría de las infecciones humanas se deben a *N. elongata* subespecie *nitroreducens*, asociada con distintas infecciones pero más a menudo con bacteriemia y endocarditis.^{194,273,285,309,354,375,409,500,574,592,638,695,716,811} y pocas veces con osteomielitis.^{236,811} Conocido inicialmente como grupo M-6 de los CDC, fue reconocido como una subespecie singular de *N. elongata* llamada “*nitroreducens*” porque reduce los nitratos y los nitritos a aminos sin formación de gas.²⁷³ Otras características del microorganismo son reacciones de catalasa, ureasa e indol negativas; reacción de oxidasa positiva y falta de producción de ácido a partir de hidratos de carbono (cuadro 7-19). *N. elongata* subespecie *nitroreducens* es típicamente sensible a aminopenicilinas, carbenicilina, cefalosporinas, aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y polimixina, y es variadamente sensible a la penicilina.¹⁹⁴

GRUPO 1 DE BACILOS DE GILARDI

Este grupo consiste en bacilos sin requerimientos nutricionales especiales, no oxidativos, gramnegativos, ovales de longitud intermedia y a veces pleomorfos. Las características de cultivo y bioquímicas de este microorganismo son muy similares a las del grupo M-5 de los CDC, ahora denominado

Neisseria weaveri. Todas las cepas del grupo 1 de bacilos de Gilardi son fuertemente positivas en la reacción de fenilalanina desaminasa y producen un color verde profundo en agar inclinado, mientras que las cepas M-5, cuando son positivas, dan una reacción débil a moderada. Todas las cepas M-5 reducen el nitrito al 0,01%, mientras que todas las del grupo 1 de bacilos de Gilardi son negativas.^{249,515} En el cuadro 7-19 se presentan otras características diferenciales. Las cepas del grupo 1 de bacilos de Gilardi han sido aisladas en distintas muestras humanas, que incluyen heridas de piernas, brazos y pies; una lesión bucal; orina y sangre; sin embargo, no se ha determinado aún su potencial patológico.⁵¹⁵

Microorganismos inmóviles y oxidasa negativos

GÉNERO ACINETOBACTER

El género *Acinetobacter* se clasifica actualmente en la familia *Moraxellaceae* y consiste en bacterias que son cocobacilos gramnegativos inmóviles oxidasa negativos.^{237,645} En 1986, Bouvet y Grimont proporcionaron una nueva clasificación que distinguía 12 grupos (genoespecies o especies genómicas) dentro del género *Acinetobacter* sobre la base de la hibridación de DNA-DNA y las características nutricionales.⁷⁶ En 1989, Tjernberg y Ursing⁷⁴⁰ describieron otros tres grupos de DNA codificados 13 a 15; en forma simultánea, Bouvet y Jeanjean⁷⁸ describieron cinco grupos DNA de especies proteolíticas de *Acinetobacter* que numeraron del 13 al 17. Sin embargo, dos de los grupos DNA descritos por Tjernberg y Ursing difieren fenotípicamente de los grupos DNA descritos por Bouvet y Jeanjean. Por lo tanto, diferentes grupos DNA tienen el mismo número, lo que aumenta la confusión que rodea a la subdivisión actual del género. En la actualidad, existen al menos 25 genoespecies descritas dentro del género *Acinetobacter*.^{352,530,531}

La genoespecie 1 es la especie tipo y se la denomina *A. calcoaceticus*. Se aísla principalmente del suelo. La genoespecie 2 se denomina *A. baumannii*; incluye cepas antes denominadas *A. anitratus* variedad *anitratus*. La designación *anitratus* se considera inválida y ya no debe utilizarse. La genoespecie 4 se

denomina *A. haemolyticus*; la genoespecie 5 se denomina *A. junii*; la genoespecie 7 se denomina *A. johnsonii*; la genoespecie 8 se denomina *A. lwoffii* y la genoespecie 12 se denomina *A. radioresistens*. La mayoría de las genoespecies restantes no tienen nombre. Se describió un esquema de las pruebas fenotípicas para *Acinetobacter* genoespecie 1 a 12.⁷⁶ Debido a los problemas para separar las cepas sacarolíticas pertenecientes a los grupos DNA 1, 2, 3 y 13 utilizando pruebas fenotípicas, algunos laboratorios decidieron referirse a los miembros de este grupo como "complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii*" o "*Acinetobacter* sacarolítico". Asimismo, los laboratorios a veces nombran a los miembros no sacarolíticos de este género como "*Acinetobacter* no sacarolíticos" (véase cuadro 7-21).

Un indicio inicial de que una cepa no fermentadora puede pertenecer al género *Acinetobacter* es la morfología en la tinción de Gram; las células cocobacilares gramnegativas a menudo se presentan como diplococos (véase lámina en color 7-5A). Esta similitud en el aspecto con *Neisseria gonorrhoeae* condujo a la designación de género taxonómica arcaica "*Mima*" (imitar). Los estudiantes y los trabajadores del laboratorio también deben conocer el hecho de que las especies de *Acinetobacter* pueden aparecer inicialmente como cocos grampositivos en frotis directos de muestras clínicas y en frotis preparados a partir de frascos de hemocultivos positivos.^{169,292} Después de 24 horas de crecimiento en agar sangre, las colonias tienen entre 0,5 y 2 mm de diámetro, son translúcidas a opacas (nunca pigmentadas) y convexas y enteras. La mayoría de las cepas crecen bien en agar de MacConkey y producen un tinte rosado pálido (véase lámina en color 7-5B). Algunos acinetobacteres que oxidan glucosa pueden causar asimismo un cambio de color del agar infusión de corazón con tirosina o agar-sangre en el cual se incorpora glucosa.^{690,802} También hemos observado este fenómeno en los agares de MacConkey o de Mueller-Hinton con una cepa clínica de *A. baumannii* (lámina en color 7-5C). Se describieron medios diferenciales y selectivos para el aislamiento de especies de *Acinetobacter* de muestras contaminadas.^{335,360} La identificación presuntiva de especies de *Acinetobacter* se puede hacer sobre la base de la falta de acti-

Cuadro 7-21 Características claves de *Acinetobacter*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* y grupos NO-1 y EO-5^a de los CDC

PRUEBA	ACINETOBACTER BAUMANNII	ACINETOBACTER LWOFFII	GRUPO NO-1 DE LOS CDC	BORDETELLA HOLMESII (NO-2)	BORDETELLA PARAPERTUSSIS ^b	GRUPO EO-5 ^c DE LOS CDC
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Motilidad	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en agar de MacConkey	+	+	V(20)	+	+	-
Crecimiento a 42 °C	+	-	V(15)	-	V(18)	-
Glucosa OF	+	-	-	-	-	+
NO ₂ inducido	-	-	+	-	-	-
Gelatina	V	V	-	-	-	-
Urea	V	V	-	-	+	+
Pigmentación	-	-	-	Parda, soluble	Parda, soluble	Pigmento amarillo producido por algunas cepas

^a Siempre cuando se señale, los datos son tomados de la referencia⁸⁰².

^b Crecen lentamente en agar sangre y produce colonias minúsculas, β-hemólisis y un pigmento pardo hidrosoluble.⁸⁰²

^c Datos tomados de la referencia⁶⁰⁵.

+ 90% o más de cepas positivas; - 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

vidad de citocromo oxidasa, la falta de motilidad y la resistencia a la penicilina.

A. baumannii es sacarolítico y acidifica la mayoría de los hidratos de carbono OF; en particular, se hace una identificación definitiva demostrando la producción rápida de ácido a partir de lactosa (concentraciones al 1% y 10%). Por el contrario, *A. lwoffii* es asacarolítico. La geno-especie 7, *A. johnsonii*, también es asacarolítica, pero puede separarse de todas las otras especies de *Acinetobacter* por su falta de crecimiento a 37 °C. Otras características diferenciales de las 12 geno-especies pueden hallarse en el artículo de Bouvet y Grimont.⁷⁶

A. baumannii es la especie hallada con mayor frecuencia en muestras clínicas humanas, seguida de *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, la geno-especie 3 y la geno-especie 6.^{79,373,675,740} *A. johnsonii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens* son especies de *Acinetobacter* no sacarolíticas que se presentan como habitantes naturales de la piel humana.^{79,675} Distintas infecciones humanas causadas por especies de *Acinetobacter* han sido revisadas por Lyons⁴⁶³ e incluyen neumonía (más a menudo relacionada con tubos endotraqueales o traqueostomías),⁹³ endocarditis, meningitis, infecciones de la piel y las heridas, peritonitis (en pacientes que reciben diálisis peritoneal) e infecciones urinarias. También se han comunicado casos esporádicos de conjuntivitis, osteomielitis y sinovitis.²⁶¹ Actualmente se reconoce que las especies de *Acinetobacter* desempeñan una función importante en la colonización y la infección de los pacientes hospitalizados. Fueron implicadas en distintas infecciones hospitalarias, que incluyen bacteriemia, infecciones urinarias y meningitis secundaria, pero su papel predominante es como agentes de neumonía hospitalaria, sobre todo neumonía asociada con el respirador en los pacientes confinados a las unidades de cuidados intensivos.^{60,775}

A. baumannii es la especie responsable más a menudo de las infecciones hospitalarias.^{55,457,775} Se ha establecido un sistema de biotipificación para diferenciar 17 biotipos de *A. baumannii* sobre la base de la utilización de seis sustratos que puede ser útil para los estudios epidemiológicos.⁷⁷ Otras especies, como *A. johnsonii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens*, parecen ser habitantes naturales de la piel humana y también pueden ser comensales en la orofaringe y la vagina.⁷⁹ *A. lwoffii* ha sido más comúnmente asociado con meningitis que con otras especies de *Acinetobacter*.⁶⁹¹ Se ha mostrado que *A. ursingii* produce infecciones del torrente circulatorio en pacientes hospitalizados.^{458,530,532} *A. junii* es una causa rara de infección ocular⁶⁰⁴ y bacteriemia, sobre todo en pacientes pediátricos.^{63,376,442} También se ha comunicado un caso de bacteriemia extrahospitalaria por *Acinetobacter radioresistens* en un paciente HIV positivo.⁷⁷⁶ *A. Schindleri* se aisló de distintas muestras humanas (vagina, cuello uterino, faringe, nariz, oído, conjuntivas y orina), pero en su mayor parte no se considera que tenga importancia clínica.^{530,532}

Las especies de *Acinetobacter* tienden a ser resistentes a distintos antibióticos, aunque una especie, *A. lwoffii*, tiende a ser más sensible que las otras. Existe una resistencia casi universal a penicilina, ampicilina y cefalotina, y la mayoría de las cepas son resistentes al cloranfenicol.^{463,674} Se ha comunicado una sensibilidad variable a las cefalosporinas de segunda y tercera generación y a trimetoprim-sulfametoxazol. Hemos observado una mayor tendencia a la resistencia a los aminoglucósidos entre las especies de *Acinetobacter* en los últimos años y cepas multirresistentes, que incluyen especies de *Acinetobacter* resistentes a los carbapenémicos en brotes hospitalarios.^{74,342,478,815}

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos para las especies de *Acinetobacter* son problemáticas. Swenson y cols. han

mostrado en los CDC que los resultados obtenidos utilizando una dilución estandarizada en microcaldo no concuerdan con los obtenidos con el método estandarizado de difusión con discos para ciertos antibióticos. Los errores muy importantes eran frecuentes con la combinación de la β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasa y el método de dilución en microcaldo mostraba típicamente mayor resistencia.⁷²⁵ En la actualidad, no existe ningún dato que indique cuál es el método que proporciona información de mayor relevancia clínica.

El tratamiento combinado con un aminoglucósido y ticarcilina o piperacilina es sinérgico y puede ser eficaz en las infecciones graves. Para las infecciones por *Acinetobacter* multirresistente, varios estudios han demostrado eficacia clínica del sulbactam combinado con ampicilina o cefoperazona.^{303,361,365,434,563} El único antibacteriano cuya actividad contra *Acinetobacter* multirresistente se ha demostrado es la colistina.^{105,366,435} Para una revisión de las características clínicas, la epidemiología molecular y la sensibilidad a los antibióticos de las infecciones hospitalarias por *Acinetobacter* consúltense las revisiones de Bergogne-Berezin y Towner⁶⁰ y Wisplinghoff y cols.⁸⁰⁹

GRUPO NO-1 DE LOS CDC

Una especie sin nombre de un bacilo gramnegativo no oxidativo con requerimientos nutricionales especiales, designado grupo NO-1 de los CDC (no oxidante-1) ha sido aislada de heridas humanas resultado fundamentalmente de mordeduras de perros o gatos.^{37,312,372} Este microorganismo es inmóvil, oxidasa negativo y asacarolítico. Se presentan como bacilos gramnegativos cocoides de tamaño intermedio que forman pequeñas colonias en agar sangre de carnero. Se asemejan fenotípicamente a las especies de *Acinetobacter*, pero se los puede separar fácilmente por una prueba positiva de reducción de nitrato. También es útil el análisis de los ácidos grasos celulares y ubiquinona para diferenciar NO-1 de las especies de *Acinetobacter*.³¹² En el cuadro 7-21 se presentan otras características fenotípicas. Estos microorganismos son sensibles a distintos antibióticos, como aminoglucósidos, β -lactámicos, tetraciclinas, quinolonas y sulfamidas. Se comunicó que el 50% de las cepas son resistentes a la trimetoprim.³¹²

BORDETELLA HOLMESII (GRUPO NO-2 DE LOS CDC)

B. holmesii era clasificado antes como grupo NO-2 de los CDC y se lo describe como un bacilo gramnegativo, cocoide pequeño y corto, y en ocasiones se observan bacilos más largos de ancho intermedio. Son asacarolíticos, oxidasa negativos, inmóviles, tienen requerimientos nutricionales especiales y producen un pigmento soluble pardo (véase cuadro 7-21).⁸⁰¹ La falta de actividad de oxidasa y la producción de un pigmento soluble pardo diferencian *B. holmesii* de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. avium*; la falta de actividad de ureasa diferencia este especie de *B. paraptussis*. Una reacción de nitrato negativa la diferencia de las cepas NO-1 y la producción de un pigmento soluble pardo la diferencia de las especies de *Acinetobacter*. La información de la importancia clínica de *B. holmesii* y su asociación con enfermedad en seres humanos fue presentada en otra parte de este capítulo con el título "Género *Bordetella*".

GRUPO EO-5 DE LOS CDC

Los microorganismos EO-5 de los CDC son bacilos gramnegativos que oxidan glucosa y tienen un perfil bioquímico

similar a *A. baumannii*.¹⁶⁵ Son inmóviles y oxidasa negativos, pero al contrario de las especies de *Acinetobacter*, no crecen en agar de MacConkey. Algunas cepas producen un pigmento soluble amarillo. El análisis de ácidos grasos celulares también es útil para diferenciar las cepas EO-5 de *Acinetobacter*. Otras características se detallan en el cuadro 7-21. Se han aislado en sangre, líquido peritoneal, aspirado transtraqueal, vesícula biliar y la herida de un brazo.¹⁶⁵ No existen datos sobre sensibilidad a los antibióticos.

PARTE III: CONSIDERACIONES PARA LA RECUPERACIÓN Y LA IDENTIFICACIÓN DE LOS NO FERMENTADORES

Niveles de servicio en la identificación de los no fermentadores

El nivel en el cual se realiza la identificación de la especie de no fermentadores depende del tamaño y del objetivo de cada laboratorio. Los laboratorios de referencia o las universidades y los centros clínicos donde entrenan los estudiantes y residentes, pueden ser necesarios para identificar las especies de todos los no fermentadores de importancia clínica. Los laboratorios que proporcionan servicio fundamentalmente a la comunidad médica pueden estar preparados para identificar sólo las especies más frecuentes y envían los microorganismos raros a un laboratorio de referencia. En el análisis de las muestras bacteriológicas difundidas por los CDC para sus programas de evaluación de rendimiento en microbiología, Griffin y cols.²⁸¹ observaron que los laboratorios donde el volumen de muestras examinadas es pequeño (menos de 80 muestras por semana) tienen en promedio un tasa de errores de alrededor del doble que los laboratorios que analizan más de 1 200 muestras por semana. Estos autores llegaron a la conclusión de que la diferencia en el rendimiento es constante y que un laboratorio no puede corregir siempre ese rendimiento por muchas de las razones que se mencionan en el recuadro 7-9. Recomiendan que los laboratorios limiten el examen a los procedimientos que pueden efectuar bien y que acuerden con un laboratorio de referencia para que se haga cargo del examen de las muestras menos habituales. Los factores que contribuyen a las dificultades en la identificación de los no fermentadores se enumeran en el recuadro 7-9.

Recuadro 7-9 Factores que contribuyen a las dificultades en la identificación de los no fermentadores

1. La mayoría de las especies sólo se encuentran rara vez.
2. Debido a esta poca frecuencia, es posible que el personal de laboratorio no esté familiarizado con muchos de los no fermentadores.
3. Muchos de los medios de cultivo convencionales no son apropiados para la identificación de los no fermentadores.
4. Muchas especies crecen lentamente, la reactividad bioquímica es débil y requiere una experiencia considerable para interpretar resultados ambiguos.
5. El control de calidad de los medios de cultivo puede ser difícil y, debido a su uso infrecuente, su vencimiento es un problema.
6. Los equipos comerciales a menudo tienen baja precisión para la identificación de las cepas de no fermentadores con mayores requerimientos nutricionales especiales y requieren el uso de medios adicionales.

Existen actualmente varios sistemas comerciales para la identificación de los no fermentadores (se explican más adelante),^{315,405,546,556,631,711,791} sin embargo, como estos sistemas dependen del crecimiento bacteriano y de la formación de productos bioquímicos en medios convencionales o en sustratos marginalmente nutritivos, sólo pueden identificarse las especies más activas con un grado aceptable de precisión. La exactitud del rendimiento también mejora con el uso de uno de los varios sistemas automáticos o semiautomáticos de identificación bacteriana, fundamentalmente porque confían en las lecturas automáticas con instrumentos y el registro de los resultados, lo que elimina el sesgo subjetivo intrínseco a la interpretación visual de los parámetros ambiguos. Estos instrumentos tienen la ventaja de hacer identificaciones varias horas antes que las requeridas con los métodos convencionales.

Pautas para la recuperación de los no fermentadores

Teniendo en cuenta la explicación anterior, el director de cada laboratorio debe implementar un enfoque lógico para la identificación de los no fermentadores en su laboratorio. Las siguientes pautas son útiles para la recuperación e identificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores:

1. Salvo por *P. aeruginosa* (y los pocas veces hallados *B. mallei* y *B. pseudomallei*), los no fermentadores tienen bajo grado de virulencia y más a menudo producen infecciones hospitalarias en pacientes debilitados o inmunodeprimidos. Este nicho estrecho de infecciosidad indica que las infecciones serán infrecuentes (salvo por la incidencia relativamente alta de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, como se explicó antes). Sin embargo, como una proporción cada vez mayor de pacientes hospitalizados tiene una enfermedad subyacente grave, se están aislando no fermentadores con una frecuencia creciente en las muestras clínicas y se los debe considerar agentes importantes para muchas enfermedades infecciosas. Los trastornos o las enfermedades específicos que predisponen a los pacientes a infecciones por no fermentadores son los siguientes:
 - a. Procesos malignos (sobre todo del sistema reticuloendotelial) e instrumentación y cirugía: cateterismos (sobre todo del aparato urinario e intravascular permanente), traqueostomía, punción lumbar, diálisis, lavados y colocación de derivaciones y prótesis.
 - b. Tratamientos corticosteroideo, antibiótico, antimetabólico y antioncológico prolongados.
 - c. Enfermedades metabólicas o infecciosas crónicas subyacentes (p. ej., existe una relación evidente entre fibrosis quística e infecciones causadas por *B. cepacia* o *P. aeruginosa* mucoide).
 - d. Quemaduras, heridas abiertas y distintas lesiones exudativas.
2. La mayoría de los no fermentadores tienen su hábitat natural en varios medioambientes que sirven como posibles reservorios para las infecciones humanas:
 - a. Distintos reservorios de agua prevalentes en los hospitales: humidificadores y nebulizadores, baños de agua, soluciones desinfectantes y de irrigación, vías de agua destilada, cremas para manos, lociones corporales, etc. Estas soluciones a menudo entran en contacto directo con las mucosas y otras superficies corporales en el curso del tratamiento del paciente.

- b. Implementos, como equipamiento anestésico, pinzas y termómetros, que pueden ser almacenados en soluciones desinfectantes; estropajos, esponjas y toallas.
 - c. Partes intertriginosas húmedas de la piel, como los espacios interdigitales del pie, la ingle, la axila y la fosa antecubital. Las infecciones de estas fuentes tienden a prevalecer en el verano.
 - d. Distintos animales domésticos que predisponen a los cuidadores a la infección.
3. Algunos no fermentadores tienden a causar infecciones específicas, que se explican en otra parte de este capítulo. Se puede hallar una septicemia casi con cualquier especie; la mayoría de las especies de no fermentadores pueden causar neumonitis o bronquitis, artritis séptica, infecciones urinarias, infecciones de heridas posoperatorias y postraumáticas y conjuntivitis. Algunas especies, sobre todo *Pseudomonas*, pueden producir toxinas citotóxicas y líticas que generan algunas de estas infecciones localmente graves y potencialmente mortales.
 4. Se puede sospechar que las cepas clínicas que son bacilos gramnegativos en la tinción de Gram son no fermentadores si producen colonias pequeñas en agar sangre, crecen poco o no crecen en absoluto en agar de MacConkey, no convierten la porción inclinada ni la profundidad de los medios KIA o TSI y son citocromo oxidasa positivos.
 5. Muchas especies de no fermentadores también tienden a tener ciertos patrones de multiresistencia a los antibióticos. Estos patrones se aprenden a través de la experiencia y pueden proporcionar un indicio inicial de que se está tratando con uno de los no fermentadores o puede señalar un género específico.

Identificación de las especies más frecuentes

Se trata primero la identificación de las tres especies más aisladas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*. La mayoría de las cepas pueden identificarse con facilidad sólo sobre la base de algunas observaciones y pruebas químicas. No sólo la identificación rápida de estos microorganismos comunes proporciona al médico información inmediata, sino que también evita al laboratorio la realización de pruebas secundarias prolongadas y costosas.

Pseudomonas aeruginosa

Más del 95% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas pueden identificarse observando la presencia de las siguientes características primarias:

- Colonias grandes, olor similar a uvas.
- Se produce piocianina.
- Las colonias son oxidasa positivas (dentro de los 10 segundos).

La mayoría de las cepas producen piocianina, un pigmento fenazínico verde hidrosoluble que imparte un color verdoso al medio de cultivo. De hecho, la presencia de piocianina puede ser la única característica necesaria para identificar a *P. aeruginosa*, porque ningún otro no fermentador sintetiza este pigmento. Reyes y cols.⁶²¹ mostraron que el 98% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en su laboratorio producían piocianina en agar Tech³⁹⁸ en 48 horas y sugieren que este agar es una alternativa satisfactoria al uso de esquemas extensos de identi-

ficación cuando se sospecha *P. aeruginosa* (véase lámina en color 7-1G). Estos autores señalan que algunas cepas mucoides de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística es posible que no produzcan pigmento y, por lo tanto, pueden ser malinterpretadas si la producción de pigmento es el único criterio utilizado para la identificación de estas cepas aberrantes. La detección de un olor similar al de las uvas también es un indicio útil cuando se examina el crecimiento en placas de agar. Las colonias son grandes, pueden ser mucoides o secas, y a menudo se propagan (véase lámina en color 7-2F,G,H). Algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden producir pigmentos con otros colores: piorrubina (rojo), piomelanina (pardo a negro) y pioverdina (amarillo).

Se puede visualizar el pigmento de fluoresceína observando el crecimiento en ciertos medios que utilizan una fuente de luz ultravioleta de longitud de onda larga (p. ej., lámpara de Word; véase lámina en color 7-1H). Los medios que contienen proteosa peptona 3 (Difco Laboratorios, Detroit MI) y cationes, como magnesio o manganeso, aumentan la síntesis de fluoresceína. El medio de King B, el medio de Sellers y el agar de Mueller-Hinton también son apropiados para demostrar fluorescencia. El tubo estrangulado para fermentadores gramnegativos (Remel, Lenexa, KS) permite una observación visual del pigmento amarillo y es posible que no sea necesaria la luz ultravioleta. En nuestra experiencia, los medios combinados de fluorescencia-lactosa-desnitrificación (FN o FNL) son menos sensibles para la detección ultravioleta de pigmento de fluoresceína. La fluorescencia puede aumentar si se incuban los cultivos a 20 a 30 °C en lugar de hacerlo a 35 a 37 °C.²⁴⁶ Las siguientes características adicionales son útiles para identificar cepas de *P. aeruginosa* que no producen pigmento:

- Crecimiento a 42 °C.
- Alcalinización de acetamida.
- Desnitrificación de nitratos y nitritos.
- Móviles con flagelo polar y monotrico.

También pueden hallarse variantes que producen colonias mucoides o enanas con reacciones bioquímicas atípicas, lo que a veces dificulta la identificación. Aunque no es necesaria una tinción para flagelos para identificar a la mayoría de las cepas, en estos casos puede ser útil evaluar la morfología flagelar.

En resumen, la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* pueden identificarse con facilidad observando las colonias grandes típicas, con un cambio de color verde azulado en los medios de aislamiento primario, y confirmarse, además, detectando un olor típico similar a uvas. La demostración de pigmento de fluoresceína y actividad de citocromo oxidasa ayuda a la identificación final y no suelen ser necesarias otras pruebas. En el cuadro 7-4 se muestran las características típicas por medio de las cuales se identifica *P. aeruginosa*.

Acinetobacter baumannii

A. baumannii es el segundo no fermentador más frecuente hallado en los laboratorios clínicos, pero sólo con alrededor de un 10% de la frecuencia de *P. aeruginosa*. Las siguientes son las características por medio de las cuales se puede hacer una identificación presuntiva:

- Aparecen como cocos o cocobacilos en la tinción de Gram.
- Crecen bien en agar de MacConkey (las colonias pueden tener una tinción ligeramente rosada, una característica útil cuando está presente).

- No producen citocromo oxidasa.
- Muestran una rápida utilización de la glucosa, con producción de ácido.
- Muestran una rápida utilización de lactosa al 10%, con producción de ácido.
- Son inmóviles.
- Son resistentes a la penicilina.

El indicio inicial es la observación de diplococos pequeños ($1.0 \times 0.7 \mu\text{m}$) en las tinciones de Gram preparadas directamente de materiales clínicos. Cuando las tinciones de Gram se preparan a partir de cultivos de agar o de caldo, las células pueden aparecer más grandes y ser más similares a cocobacilos (véase lámina en color 7-5A). Las especies de *Acinetobacter* son no pigmentadas cuando crecen en agar sangre, una característica útil para diferenciarlas de algunos otros no fermentadores, como cepas inmóviles oxidasa negativas ocasionales de *Burkholderia cepacia*. Sin embargo, las colonias que crecen en agar de MacConkey pueden producir un tinte rosado débil o un azul aciano más profundo cuando se observan en agar-eosina-azul de metileno (véase lámina en color 7-5B). La resistencia a la penicilina ayuda a distinguir *A. baumannii* de especies de *Moraxella* altamente sensibles a la penicilina, que también pueden aparecer como cocobacilos en la tinción de Gram. La mayoría de las cepas de las especies de *Moraxella* son también oxidasa positivas. *A. lwoffii* es asacarolítica y puede diferenciarse de *A. baumannii* porque no produce ácido cuando crece en medios que contienen hidratos de carbono.

Stenotrophomonas maltophilia

S. maltophilia es el tercer no fermentador en frecuencia aislado en los laboratorios clínicos. Las siguientes son las características por medio de las cuales se puede hacer una identificación presuntiva:

- Buen crecimiento en agar sangre o agar de MacConkey.
- No produce citocromo oxidasa.
- Produce ácido en OF maltosa pero puede ser negativo en OF glucosa.
- Citina descarboxilasa positivo.
- DNasa positivo.
- Algunas cepas tienen pigmento amarillo.

El patrón de sensibilidad a los antibióticos también puede ser un indicio para la identificación de *S. maltophilia*, que es típicamente resistente a la mayoría de los antibióticos, incluidos los aminoglucósidos, pero es sensible a trimetoprim-sulfametoxazol y colistina.

Métodos para la identificación que utilizan pruebas convencionales

Si un bacilo gramnegativo no fermentador desconocido no es *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o *Stenotrophomonas maltophilia*, deben determinarse otras características para la identificación de una especie. En la actualidad, se utilizan varios esquemas en los laboratorios clínicos. En muchos de ellos se utilizan híbridos de los procedimientos de prueba usados en los esquemas publicados. El criterio de selección depende en gran parte de la preferencia personal, la experiencia pasada y la disponibilidad local de los medios de culti-

Recuadro 7-10 Consideraciones para seleccionar una prueba convencional

1. Los resultados de reacciones positivas y negativas delineados en el cuadro de identificación deben basarse sobre los procedimientos y las fórmulas mencionados en el manual de procedimientos del laboratorio. Es decir, los medios y los procedimientos deben ser los mismos que los utilizados para generar los resultados en un cuadro de las reacciones utilizadas para la identificación.
2. Todas las reacciones mencionadas en el cuadro de identificación deben estar en un nivel de confianza del 90% o mayor y deben derivar de una base de datos con una cantidad suficientemente grande de microorganismos para ser estadísticamente significativos.
3. Todas las pruebas deben realizarse bajo vigilancia estándar de control de calidad para asegurar que los reactivos, las reacciones y los parámetros estén lo más próximo posible a aquellos sobre los que se basó originalmente el cuadro.

vo requeridos para realizar las distintas pruebas, siempre que se cumplan los criterios enumerados en el recuadro 7-10.

Esquemas de identificación de Weyant (CDC), Gilardi y Pickett

A excepción de los sistemas comerciales, los esquemas diseñados por Pickett,^{581,587,589,590} Gilardi²⁴⁴⁻²⁴⁸ y Weyant y cols.⁸⁰² (de acuerdo con los protocolos de identificación obtenidos originalmente por Elizabeth King en los CDC³⁹⁷) tienen las bases de datos más grandes. Los autores de cada uno de estos tres esquemas de identificación publicaron en forma separada varias puntuaciones de cuadros de identificación individuales, procedimientos y otra información relativa a los no fermentadores. La información se ha vuelto demasiado vasta para incluirla en este libro y es necesario simplificar el material para satisfacer las necesidades de los estudiantes y de los nuevos microbiólogos. Por lo tanto, no comentaremos aquí los cuadros de identificación utilizados en estos esquemas; sólo se explicarán los enfoques singulares diseñados por estos investigadores. Se remite a los lectores interesados a la segunda y tercera edición de este libro o a las referencias citadas donde hallarán una lista completa de los cuadros y protocolos de identificación utilizados en esos sistemas.

Esquema de los CDC-Weyant y cols. En respuesta al problema de cómo identificar a los no fermentadores en el laboratorio clínico sin realizar todas las pruebas que se hacen en un laboratorio de referencia, Weyant y cols.⁸⁰² han publicado una guía de tres partes que incluye: 1) una clave de identificación para los aerobios gramnegativos, 2) un conjunto de 12 cuadros de identificación y 3) un libro de códigos numéricos por medio del cual se pueden relacionar los números de los biotipos derivados con los nombres de las especies. También incluyen procedimientos y fórmulas de medios para todas las pruebas bioquímicas citadas en el manual de identificación. Para interpretar correctamente los resultados de un cuadro de identificación dado, se deben utilizar los mismos procedimientos sobre los cuales se basan las reacciones. El manual se titula *Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria* (Identificación de bacterias aerobias y anaerobias facultativas gramnegativas patógenas inusuales) y está editado por Lippincott Williams & Wilkins.⁸⁰²

Esquema de Gilardi. El enfoque de Gilardi de la identificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores evolucionó duran-

te veinte años a un extenso sistema que se señala en varios protocolos y cuadros detallados incluidos en una serie de publicaciones.²⁴⁴⁻²⁴⁸ No obstante, el sistema no es más complejo que el de los no fermentadores propiamente dichos, y el último enfoque, dirigido a los laboratorios de tamaño pequeño e intermedio, refleja la tendencia progresiva hacia una mayor sencillez y practicidad.²⁴⁷

El enfoque de Gilardi se basa sobre dos principios fundamentales que han hecho práctico su uso en los laboratorios clínicos: 1) los medios y las pruebas se pueden obtener fácilmente en la mayoría de los laboratorios clínicos y a menudo son los mismos que los utilizados para la identificación de otros grupos de bacterias, incluidas las enterobacterias y 2) la identificación de la mayoría de los aislamientos clínicos se puede hacer en dos etapas: la primera, mediante el uso de una serie primaria de medios y reacciones que son suficientes en la mayoría de los casos, y una serie secundaria, disponible cuando la primera es insuficiente.²⁴⁵ Remitimos al lector a las publicaciones citadas en las referencias anteriores para obtener una lista completa de los medios diferenciales y el alcance de las reacciones en las series primaria y secundaria de pruebas que conducen a la identificación de la mayoría de los no fermentadores de importancia clínica.

Esquema de Pickett. Hace más de tres décadas, Pickett fue uno de los primeros en poner algo de orden en la identificación de los no fermentadores.^{581,587,589,590} Su sistema fue ideado para identificar rápidamente los dos no fermentadores aislados más a menudo: *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Pickett recomendó el uso de un inóculo importante preparado en una suspensión acuosa a partir del cultivo bacteriano que desarrolló durante una noche (crecimiento en fase logarítmica) y sembrado en sustratos únicos con buffer para evaluar la acidificación de hidratos de carbono y la alcalinización de amidas y sales orgánicas. El fundamento subyacente al agregado del inóculo importante a los sustratos de prueba diferenciales fue introducir una alta concentración de enzimas preformadas u otros productos metabólicos que podrían ser detectados más rápidamente por el indicador parámetro, lo que permite leer la mayoría de las reacciones dentro de las 24 horas.

Pickett diseñó cuadros de identificación para varios grupos de no fermentadores que son similares al esquema de Weyant-CDC. Estos cuadros fueron publicados en su totalidad en la segunda edición de este libro y no los reproduciremos aquí. También se incluyen en la segunda edición las fórmulas para reactivos y sustratos y una descripción de todos los procedimientos requeridos para realizar las pruebas diferenciales necesarias para cada cuadro de identificación. Los sustratos necesarios para realizar estas pruebas se encuentran disponibles en forma de tabletas deshidratadas de Key Scientific Products (Round Rock, TX) y en la forma reconstituida de Hardy Diagnostics (Santa Maria, CA).

Enfoque práctico de la identificación de los no fermentadores

El enfoque utilizado en este libro fue diseñado por uno de nosotros (P. C. Schreckenberger)⁶⁶⁹ y requiere que se dividan los distintos bacilos no fermentadores de importancia clínica en cuatro grupos funcionales sobre la base de una evaluación inmediata de su motilidad y su capacidad para producir citocromo oxidasa (cuadro 7-22). Una vez logrado el subagrupamiento, se pueden realizar identificaciones definitivas remitiéndose a los cuadros de identificación 7-23 a 7-35 y siguiendo las instrucciones que se proporcionan en ellos. Las pruebas utilizadas en esta guía de identificación son fórmulas bioquí-

micas convencionales y se encuentran disponibles en el comercio en la mayoría de los fabricantes de medios. Obsérvese que al utilizar estos cuadros, una especie dada de un bacilo no fermentador puede aparecer en más de un cuadro porque es posible que el microorganismo particular no sea 100% positivo o negativo para una característica determinada; por lo tanto, se crea cierta redundancia en el esquema de modo que un bacilo desconocido será identificado cualquiera que sea el resultado obtenido con la prueba de cribado variable. Al seguir estos cuadros, el microbiólogo debe poder identificar en forma definitiva más del 95% de los bacilos no fermentadores que se aislarán de las muestras clínicas.

Procesos computarizados

BioBASE (BioBASE, Boston, MA) es un programa computarizado basado sobre DOS para la identificación computarizada de microorganismos.⁵⁰² El sistema le permite al usuario crear y acceder a cientos de bases de datos de microbios y cambiar entre ellas, según las características primarias de los microorganismos aislados por estudiar. Con el software se incluye la base de datos, publicada por Holmes y cols.,³²⁷ que abarca los 66 taxones de no fermentadores identificados utilizando 83 pruebas fenotípicas. La identificación de las bacterias aisladas se puede basar en todas las pruebas seleccionadas o en algunas de ellas.

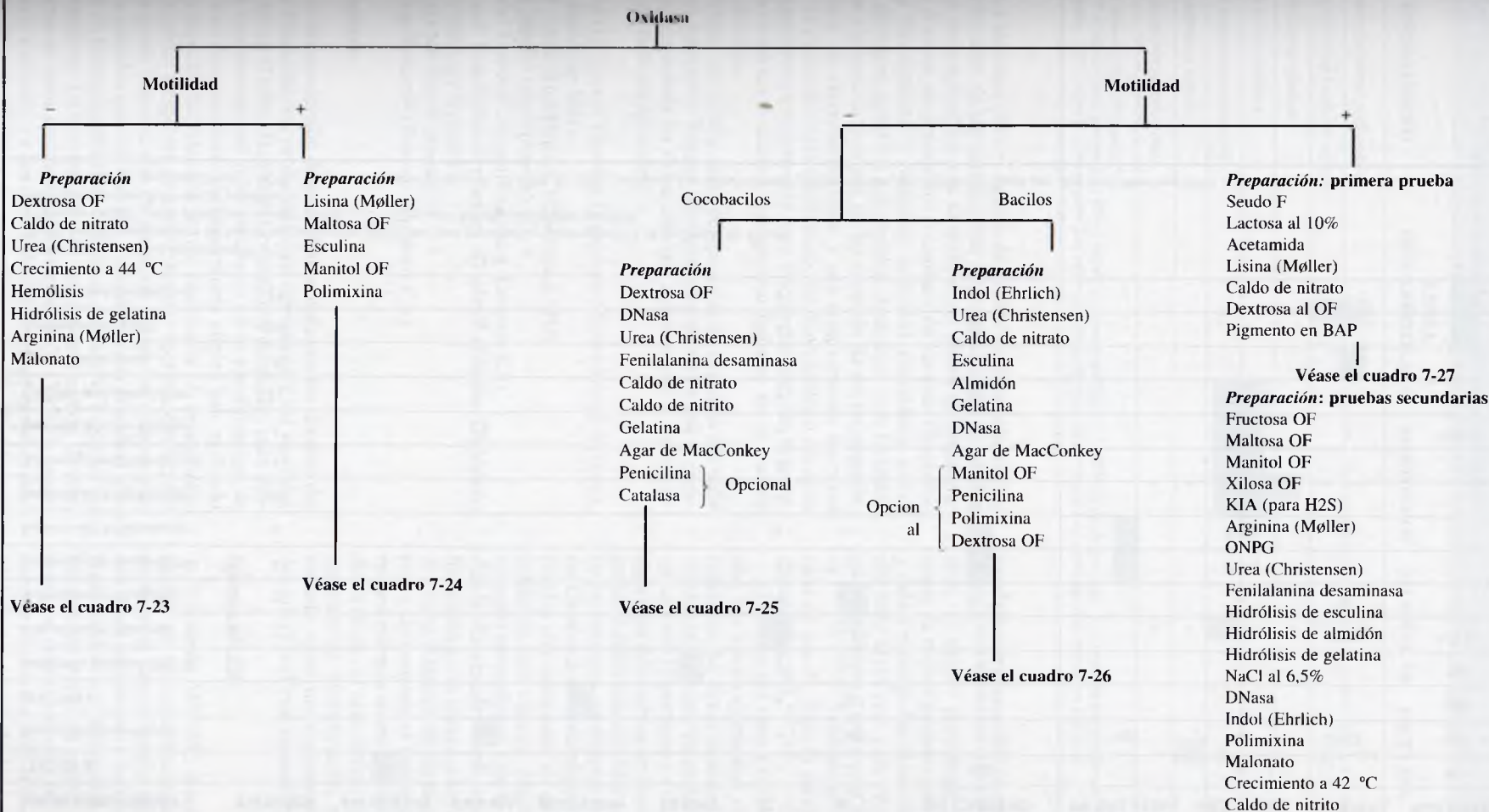
Pibwin (Probabilistic Identification of Bacteria for Windows, "Identificación probabilística de bacterias para Windows"). Este programa proporciona una identificación probabilística de las bacterias desconocidas aisladas por comparación con matrices de identificación de cepas conocidas. El programa tiene tres funciones importantes: 1) la identificación de una cepa desconocida, 2) la selección de pruebas adicionales para distinguir entre posibles cepas si no se logra la identificación y 3) el almacenamiento y la recuperación de los resultados. Para hacerlo el programa utiliza los archivos Excel para almacenar matrices de identificación publicadas o creadas por el usuario. También tiene algunas funciones para evaluar la utilidad de las matrices de identificación y convertir las matrices en diferentes formatos. PIBWIN fue creado por Trevor Bryant, University of Southampton Reino Unido y se puede consultar en <http://www.som.soton.ac.uk/staff/tnb/pib.htm>. Una matriz de identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores que utiliza el programa PIBWIN ha sido ideada por P. C. Schreckenberger y A. P. Schreckenberger. Se puede acceder a la matriz de identificación en www.pschreck.com.

Equipos comerciales

Se han ideado equipos comerciales para la identificación de bacilos no fermentadores. Estos equipos comparten muchas características generales de los sistemas envasados; es decir, su uso es conveniente, tienen un tiempo de conservación muy largo y evitan la necesidad de suministros frescos de medios y reactivos. Los equipos comerciales también proporcionan técnicas estandarizadas precisas y brindan resultados reproducibles iguales o mejores que los procedimientos convencionales, con las excepciones explicadas más adelante en este capítulo.

Los problemas intrínsecos al uso de muchos de los equipos comerciales actualmente disponibles para la identificación de no fermentadores son: 1) la tendencia de los microorganismos que muestran actividad bioquímica débil o tardía a producir reacciones falsas negativas, 2) un diseño menos que óptimo de

Cuadro 7-22 Enfoque práctico de la identificación de los no fermentadores



INSTRUCCIONES PARA EL USO DE LOS CUADROS 7-22 A 7-35

Este enfoque de la identificación de los no fermentadores está ideado para reducir la cantidad de pruebas bioquímicas necesarias para la identificación sobre la base de una evaluación preliminar de las reacciones de oxidasa y motilidad de los microorganismos por identificar. Una vez conocida esta información, se realiza una serie específica de pruebas para completar la identificación del microorganismo. Para los microorganismos que son tanto oxidasa positivos como móviles, se utiliza un enfoque en dos pasos, basado sobre las reacciones obtenidas en una serie de pruebas primarias seguidas por pruebas complementarias que se especifican en los cuadros designados. Según las necesidades y los recursos disponibles, el usuario de esta guía puede desear preparar todas las pruebas incluidas en las series primaria y secundaria siempre que se encuentre un no fermentador móvil y oxidasa positivo para obtener una identificación definitiva en el menor tiempo posible. Como regla general cuando se trabaja con bacilos no fermentadores, se debe utilizar un inóculo importante y las reacciones deben mantenerse 48 horas antes de realizar la lectura final.

PASOS POR SEGUIR

1. Determine la motilidad y las reacciones de oxidasa y siga el diagrama de flujo en el cuadro 7-22.
2. Establezca las pruebas bioquímicas especificadas y diríjase al cuadro indicado para completar la identificación.
3. Para utilizar los cuadros 7-23 a 7-35, comience con la primera prueba mencionada del lado izquierdo del cuadro y ubique el recuadro o los recuadros sombreados en el ángulo superior izquierdo.
4. Si sólo hay un recuadro sombreado y si la reacción dada se equipara con la reacción obtenida con su muestra, lo ha logrado. La identificación del microorganismo se menciona en la misma fila a la izquierda del recuadro.
5. Si están sombreados múltiples recuadros y la reacción es compatible con la de su muestra, utilice las reacciones a la derecha de los recuadros sombreados para determinar la identificación correcta.
6. Si la reacción obtenida con su muestra no es compatible con el recuadro o los recuadros sombreados, prosiga hasta la siguiente columna a la derecha y encuentre el recuadro o los recuadros sombreados en esta columna. Repita los pasos 4 y 5 hasta que alcance una identificación definitiva.
7. Se debe prestar consideración especial a los recuadros sombreados que contienen un signo de reacción variable (V). En estos casos raros, se debe tratar la reacción variable en el recuadro sombreado tanto como compatible y como incompatible.

OF: oxidación-fermentación.

Cuadro 7-23 No fermentadores oxidasa negativos e inmóviles^a

MICROORGANISMO ^b	GENO- ESPECIES	PIGMENTO AMARILLO	UREASA	NITRATO REDUCIDO	PIGMENTO SOLUBLE PARDO	CRECIMIENTO A		HEMÓLISIS SANGRE DE CARNERO	HIDRÓLISIS DE GELATINA	DEXTROSA	ARGININA	MALONATO
						37 °C	44 °C					
CDC EO-5		+	+	-	-	+	-	ND	-	+	-	ND
<i>Bordetella parapertussis</i>		-	+	-	-	+	ND	+	ND	-	ND	ND
CDC NO-1		-	-	+	-	+	ND	-	-	-	-	ND
<i>Bordetella holmesii</i> (NO-2)		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V(35)	V(13)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	4	-	-	-	-	+	-	+	+	V(52)	+	-
Especies de <i>Acinetobacter</i>	6	-	-	-	-	+	-	+	+	V(66)	+	-
Especies de <i>Acinetobacter</i>	10	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Especies de <i>Acinetobacter</i>	3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	V(87)
Especies de <i>Acinetobacter</i>	12	-	-	-	-	+	-	-	-	V(33)	+	+
<i>Acinetobacter junii</i>	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	8/9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Especies de <i>Acinetobacter</i>	11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

^aDatos tomados de las referencias^{26,312,801}.

^bTodos los microorganismos incluidos en este cuadro aparecen como cocobacilos gramnegativos en la tinción de Gram.

^cPigmento soluble pardo producido cuando crecen a 35 °C en agar tirosina infusión de corazón.

^dTambién debe ser dextrosa OF positivo.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-24 No fermentadores, oxidasa negativos e inmóviles

MICROORGANISMO	LISINA						PIGMENTO
	DESCARBOXILASA	MALTOSA OF	MANITOL OF	ESCULINA	POLIMIXINA		
<i>Sinetrophomonas maltophilia</i>	+	+	-	+	S		Lavanda amarillento
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+	V(67)	R		Amarillo
<i>Burkholderia gladioli</i>	-	-	+	-	R		Amarillo
<i>Bordetella trematum</i>	-	-	-	-	ND		Blanco grisáceo
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	+	-	+	V(89)		Amarillo profundo
<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	+	+	S		Amarillo mate
<i>Pseudomonas oryzae</i>	-	+	+	-	S		Amarillo mate

Datos tomados de la referencia²⁴⁹.
 +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; ND: resultados no disponibles; R: resistente; S: sensible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

muchos sistemas para el cultivo de ciertos no fermentadores y la inclusión de algunas pruebas diferenciales que es posible que no sean aplicables a la identificación de los no fermentadores. Aunque en general los miembros de las enterobacterias crecen rápidamente y muestran actividad enzimática activa sobre distintos sustratos que pueden detectarse con facilidad con los equipos, la mayoría de las especies de no fermentadores tienen un crecimiento lento y son relativamente inactivas desde el punto de vista enzimático. El microbiólogo necesita una experiencia considerable para interpretar algunas reacciones incompletas o débiles que pueden hallarse en el uso de estos sistemas.

Teniendo en cuenta estas perspectivas se explican los siete equipos siguientes. Fueron seleccionados debido a que la experiencia acumulada ha delineado sus aplicaciones y limitaciones. Los siete equipos son:

- Tubo Oxi/Ferm® (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville MD).
- API 20E® (BioMérieux, Hazelwood MO).
- API 20NE® (BioMérieux).
- Remel Uni-N/F System® (Remel, Lenexa, KS).
- Crystal Enteric/Nonfermenter System® (Becton Dickinson Microbiology Systems).
- RapID NF Plus® (Remel).
- Biolog System® (Biolog, Hayward CA).

Tubo Oxi/Ferm

En la tercera edición de este libro se incluyen los detalles del diseño funcional, los procedimientos operativos y los sustratos incluidos en el tubo Oxi/Ferm. Los estudios diseñados para evaluar el rendimiento del tubo Oxi/Ferm en la identificación de bacilos no fermentadores de importancia clínica han mostrado que las especies halladas con mayor frecuencia—*P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y especies de *Acinetobacter*—fueron identificadas con un grado bastante alto de precisión cuando se compararon con los métodos convencionales. Sin embargo, la exactitud global cae en forma significativa cuando se consideran todos los no fermentadores. La exactitud global de la identificación de tubo Oxi/Ferm en estos estudios varió entre el 50% y el 95% según la especie evaluada, ya sea que las lecturas fueran tomadas después de 24 o de 48 horas de incubación y de que se utilizaran

pruebas complementarias para obtener las identificaciones correctas.^{20,90,199,308,320,355,411,523,537,543,544,547,554,642,679} En estos estudios, el mayor porcentaje de discrepancias ocurrió con las cepas de requerimientos nutricionales especiales o infrecuentes y más a menudo fue el resultado de reacciones falsas negativas del tubo Oxi/Ferm para citrato, sulfuro de hidrógeno, arginina dihidrolasa, reducción de nitrato, glucosa OF y ureasa.^{308,355,523,537,547} También se observaron problemas en la detección de gas N₂ bajo el revestimiento de cera en la cámara de desnitrificación.^{20,355,679}

El diseño del tubo Oxi/Ferm parece limitar su rendimiento con los microorganismos de crecimiento lento o débilmente reactivos. La aguja inoculadora puede mantener sólo una cantidad relativamente pequeña de inóculo y se ha demostrado que un inóculo importante es esencial para obtener productos bioquímicos detectables de muchos de los no fermentadores. Gran parte de éstos son aerobios estrictos y el medioambiente dentro de las cámaras confinadas en el tubo Oxi/Ferm es posible que no favorezca un crecimiento óptimo. Los microorganismos de prueba son colocados en profundidad en la parte central del medio en cada cámara, donde están mínimamente expuestos al oxígeno atmosférico. Con la falta de crecimiento superficial, es difícil determinar si una reacción negativa refleja inactividad bioquímica o la incapacidad del microorganismo para crecer en el medio. Algunos de los medios en el tubo Oxi/Ferm son incapaces de sostener el crecimiento de las cepas que tienen más requerimientos nutricionales especiales entre los no fermentadores (p. ej., el agar-citrato no se encuentra en la mayoría de los sistemas de identificación para no fermentadores). En cierta medida, estos inconvenientes han obstaculizado la aceptación del tubo Oxi/Ferm en muchos laboratorios clínicos.

Sistema API 20E

El sistema API 20E, diseñado en su origen para la identificación de las enterobacterias, ha sido extendido para incluir también la identificación de bacilos no fermentadores comunes. Para aumentar al máximo el uso de API 20E para los no fermentadores, se agregaron otras seis pruebas para generar un número de perfil de nueve dígitos (recuadro 7-11). Algunos estudios realizados con no fermentadores han mostrado que aunque el sistema API 20E identifica a *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y especies de *Acinetobacter* con una exactitud de hasta

Cuadro 7-25 Identificación de cocobacilos oxidasa positivos e inmóviles^a

MICROORGANISMO	OLOR O ASPECTO CARACTERÍSTICO	DEXTROSA OF	DNASA	UREASA	FENILALANINA DESAMINASA	HIDRÓLISIS DE GELATINA	NITRATO REDUCIDO	CRECIMIENTO EN AGAR DE MACCONKEY	NITRITO REDUCIDO	CATALASA	CRECIMIENTO A 35 °C
<i>Psychrobacter immobilis</i>	Olor de agar PEA (rosas)	+	-	+	+	-	V(86)	V	ND	+	-
EO-2 de los CDC	Células con forma de O ^b	+	-	+	ND	-	+	V(82)	ND	+	+
EO-3 de los CDC	Colonias amarillas (100)	+	-	+	ND	-	-	+	ND	+	+
EO-4 de los CDC	Colonias amarillas (83)	+	ND	+	ND	-	-	+	ND	+	+
<i>M. canis</i>		-	+	-	-	-	+	+	V	+	+
<i>M. catarrhalis</i>		-	+	-	V	-	+	-	+	+	+
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> ^c		-	-	+	+	-	V(89)	+	-	Débil	+
<i>O. urethralis</i>	Células cocoides pequeñas	-	-	-	+	-	-	V(83)	+	+	+
<i>M. lacunata</i>		-	-	-	-	+	+	-	-	Débil	+
<i>M. nontliquefaciens</i>		-	-	-	-	-	+	V(17)	-	+	+
<i>M. osloensis</i>		-	-	-	-	-	V(26)	V(49)	-	Débil	+
<i>M. atlantae</i>	Colonias que se dispersan o se deprimen	-	-	-	-	-	-	+	V(20)	Débil o -	+
<i>M. lincolnii</i>	Bacilos similares a cocos pletóricos	-	-	-	ND	-	-	-	V	+	+

^aDatos tomados de las referencias^{249,349,515,517,753}.^bLos extendidos con tinción de Gram muestran bacilos gruesos cocoides a cortos que a menudo están vacuolados. Las células tienen centros no teñidos pero están teñidas en la periferia y tienen aspecto de O.^cAlgunas especies de *Brucella* pueden ser confundidas con *Psychrobacter phenylpyruvicus* en algunos sistemas de identificación comerciales.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-26 Identificación de bacilos con forma bacilar, oxidasa positivos e inmóviles^a

MICROORGANISMO	COLOR, CARACTERÍSTICA, OLOR O ASPECTO	INDOL	UREASA	REDUCCIÓN DE NITRATO	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	HIDRÓLISIS DE GELATINA	HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	HIDRÓLISIS DE DNASE	CRECIMIENTO EN AGAR DE MACCONKEY	MANITOL OF	DEXTROSA OF	PENICILINA	POLIMIXINA
<i>Sphingoba cterium multivorum</i>	Amarillo pálido	—	+	—	+	—	V(79)	—	V(17)	—	+	R	R
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Amarillo pálido	—	+	—	+	—	—	+	—	+	+	R	R
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Amarillo brillante	—	—	—	+	—	V(51)	—	V(10)	—	+	S(33)	S(89)
<i>Myroides odoratus</i>	Olor frutal verde amarillento	—	+	—	—	+	—	+	V(78)	—	—	S(19)	R
<i>Neisseria weaveri</i>	Colonias blancas grisáceas, catalasa fuertemente +	—	—	—	—	—	—	—	V(42)	—	—	S	S
<i>Neisseria elongata</i> subespecie <i>nitroreducens</i>	Catalasa —	—	—	+	—	—	ND	—	V(20)	—	—	S	S
Grupo I de bacilos de Gilardi	PAD + intensa	—	—	—	—	—	ND	—	+	—	—	S	S
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	Sin pigmento	+	++	—	—	+	—	—	—	—	—	S	R
Grupo IIc de los CDC	Sin pigmento	+	—	+	+	V	ND	ND	—	—	+	ND	ND
<i>Weeksella virosa</i>	Colonias pegadas al agar	+	—	—	—	+	—	V(13)	—	—	—	S	S
<i>Empedobacter brevis</i>	Amarillo pálido	+	—	—	—	+	V(40)	+	+ ^b	—	Tardío	R	R
Grupo IIe de los CDC	Sin pigmento	+	—	—	—	—	+	—	—	—	Tardío	S	S
Grupo IIg de los CDC	Sin pigmento	+	—	—	—	—	ND	—	+	—	—	ND	S
Grupo IIh de los CDC	Sin pigmento	+	— ^b	—	+	—	+	(V78)	— ^b	—	Tardío	S(67)	S(22)
Grupo IIIi de los CDC	ND	+	—	—	+	—	V(14)	—	—	—	Tardío	S(57)	R
<i>Chryseobacterium meningo- septicum</i>	Amarillo pálido	+	—	—	+	+	—	+	V(26)	Tardío	Tardío	R	R
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Amarillo intenso	+	—	—	+	+	+	—	—	—	Tardío	R	R

^aDatos tomados de las referencias^{179a,249,311}.^bDiferentes resultados comunicados, la reacción utilizada aquí es la informada por los CDC^{179a}.

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; ND: resultados no disponibles; R: resistente; S: sensible; PAD: fenilalanina desaminasa; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Nota: *Balneatrix alpica* es amarillo pálido e indol positiva pero no se incluyó en este cuadro por su motilidad (véanse cuadros 7-32 y 7-34).

Cuadro 7-27 Pruebas de cribado para la identificación de especies de no fermentadores oxidasa positivos y móviles

						-	+	Fluorescencia (agar pseudo F bajo luz UV)
					-	+		Lactosa al 10%
			-	+				Acetamida
		-	+					Lisina (Møller)
	-	+						Pigmento en agar sangre
-	+							Gas a partir de nitrato o nitrato
								Dextrosa OF -
Véase cuadro 7-35	Véase cuadro 7-34	Véase cuadro 7-33	Véase cuadro 7-32	Véase cuadro 7-31	Véase cuadro 7-30	Véase cuadro 7-29	Véase cuadro 7-28	

Cuadro 7-28 Identificación de no fermentadores fluorescentes

MICROORGANISMO	ACETAMIDA	CRECIMIENTO A 42 °C	GELATINA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	-	-	+
<i>P. putida</i>	-	-	-
+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o más de cepas negativas.			

Cuadro 7-29 Identificación de no fermentadores fuertemente lactosa positivos (oxidasa +, motilidad +, fluoresceína -)

MICROORGANISMO	LISINA	MANITOL OF	UREASA	ONPG	POLIMIXINA B
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	V(45)	V(79)	R
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	+	V(43)	-	R
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	+	+	+	S
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (Va-3)	-	+	+	-	R
<i>Ralstonia pickettii</i> (Va-1)	-	-	-	-	R
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-		+	S(89)

Datos tomados de la referencia²⁴⁹.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; R: resistente; S: sensible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Nota: *Acinetobacter baumannii* y las especies de *Sphingobacterium* son fuertemente lactosa positivas, pero están excluidas de este cuadro porque son inmóviles (véanse cuadros 7-23 y 7-26).

Cuadro 7-30 Identificación de no fermentadores acetamida positivos (oxidasa +, fluoresceína -, lactosa al 10% -)

MICROORGANISMO	ARGININA	DEXTROSA OF	FRUCTOSA OF	MANITOL OF	NITRATO REDUCIDO	NITRITO A GAS	MALONATO	NITRITO A GAS	INDOL NARANJA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	V(89)	V(68)	V(74)	ND	ND	V(60)	-
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	+	+	V(37)	ND	ND	-	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-	+	V(9)	-	+	ND	ND	V(69)	-
<i>Delftia acidovorans</i>	-	-	+	+(92)	+	ND	ND	-	+
<i>Achromobacter denitrificans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Achromobacter piechaudii</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Oligella ureolytica</i>	-	-	-	-	+	V(63)	-	V(58)	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Bordetella hinzii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bordetella avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Datos tomados de las referencias^{249/258}; datos para alcalinización tomados de la referencia⁴¹⁰.

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; ND: resultados no disponibles; R: resistente; S: sensible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-31 Identificación de no fermentadores lisina positivos

MICROORGANISMO	POLIMIXINA B	DNASA	MANITOL OF
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	R	—	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S	+	—

+: 90% o más de cepas positivas; —: 90% o menos de cepas negativas; R: resistente; S: sensible. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.
Nota: algunas cepas de *S. maltophilia* pueden ser oxidas positivas.

un 99%, sobre todo después de 48 horas de incubación, el rendimiento de otros no fermentadores poco frecuentes muchas veces fue menos que aceptable.^{20,90,199,308,509,537,543,544,554,680,789} Las identificaciones incorrectas ocurrieron menos a menudo debido a reacciones falsas negativas para citrato, licuefacción de gelatina, motilidad, arginina dihidrolasa, ONPG, reducción de nitrato y pruebas de ureasa.^{20,199,308,537} En el estudio específico de Hofherr y cols.,³⁰⁸ el 12,2% de 836 reacciones bioquímicas individuales difirió entre el sistema API y los métodos convencionales (53% involucró el uso de citrato y pruebas de licuefacción de gelatina). En otros casos, no fue posible realizar las identificaciones porque el número de biotipo derivado de la banda 20E no estaba enumerado en el índice de perfiles API.⁶⁸⁰

Sistema API 20NE

El API 20NE es una modificación de la banda API 20E. La construcción de la banda de plástico es la misma que en el sistema 20E; sin embargo, los sustratos han sido modificados para incluir 8 pruebas convencionales y 12 pruebas de asimilación que se basan sobre la observación del crecimiento microbiano en presencia de una fuente única de carbono (véase lámina en color 7-5D). En el recuadro 7-11 se describe el procedimiento quirúrgico y los sustratos incluidos. Las reacciones positivas y negativas son convertidas en un número de biotipo de 7 dígitos y las identificaciones de los microorganismos se hacen a partir de la base de datos computarizada o de una lista de perfiles provista por el fabricante. Los usuarios de este sistema deben observar que la base de datos está construida de acuerdo con las reacciones obtenidas a una temperatura de incubación de 30 °C (en lugar de los 35 °C a 37 °C convencionales) y se toman las lecturas finales después de 48 horas de incubación. Kiska y cols.⁴⁰⁴ evaluaron 150 no fermentadores aislados de pacientes con fibrosis quística y comunicaron una tasa global de identificación correcta del 57%, que incluyó un 43% de *B. cepacia* aisladas. El rendimiento global del API 20NE ha demostrado que es uno de los equipos comerciales de mejor rendimiento para la identificación de no fermentadores.^{19,422,489,785,791}

Sistema Remel N/F

El sistema Remel N/F (antes Unix-N/F), como se describe en el recuadro 7-12 y se muestra en la lámina en color 7-5E, consta de tres componentes:

1. Un tubo GNF estrangulado que detecta fermentación de glucosa y N_2 (por debajo del estrangulamiento) y producción de fluoresceína en la porción inclinada (por encima del estrangulamiento).
2. Un tubo 42P no estrangulado que se utiliza para evaluar el crecimiento a 42 °C y la producción de pigmento de pio-cianina.
3. Una placa Uni-N/F Tek circular que consiste en 11 pozos periféricos sellados en forma independiente, que contienen agar convencional, con la cual se pueden determinar las siguientes características: utilización de glucosa, xilosa, manitol, lactosa y maltosa; asimilación de acetamida; hidrólisis de esculina y urea; actividad de DNasa y de ONPG. Una de las celdas periféricas es un control de crecimiento de hidratos de carbono. Una celda del centro contiene un medio para detectar la producción de indol y sulfuro de hidrógeno.

La placa UNI-N/F está bien construida para evaluar a la mayoría de los no fermentadores; incluye medios que se asemejan estrechamente a las fórmulas convencionales y apoyan el crecimiento de muchas de las cepas que tienen mayores requerimientos nutricionales especiales. La suspensión del microorganismo se inocula en la superficie de los bordes del agar, donde no sólo los microorganismos están expuestos a oxígeno atmosférico, sino que también se puede visualizar directamente el crecimiento de las colonias. Por lo tanto, es posible diferenciar las reacciones negativas en las pruebas debidas a la falta de crecimiento de las debidas a la inactividad bioquímica y el usuario puede determinar directamente si otros microorganismos pueden estar contaminando el inóculo.

La capacidad del sistema Remel N/F para detectar *P. aeruginosa* mediante el uso del tubo GNF estrangulado y el tubo 42P no estrangulado ahorra tiempo. Si el microorganismo de prueba es distinto de *P. aeruginosa*, se entrega una gota de una suspensión importante preparada de la porción inclinada del tubo GNF en cada una de las cámaras periféricas en la placa UNI-N/F Tek y se inocula con un corte la celda central. Se incubaba la placa a 35 °C durante 24 horas y las distintas reacciones se interpretan visualmente.

Alrededor del 90% de *P. aeruginosa* fue identificado por los investigadores con los dos tubos de cribado después de 24 horas de incubación, lo que aumentó hasta un 98% después de 48 horas de incubación.^{20,45,90,411,681,789} La capacidad para detectar *P. aeruginosa* sin utilizar un conjunto completo de pruebas bioquímicas es considerada una ventaja definida por la mayoría de los usuarios. Algunos de los problemas mencionados con el sistema UNI-N/F fueron los siguientes: los tubos de cribado identificaron sólo alrededor de un tercio de las cepas de *P. fluorescens* y *P. putida*, y fue necesario realizar otras pruebas.^{20,45,90,422,681} También se hallaron problemas en la interpretación de la reacción del gas N_2 en el tubo GNF y la prueba de indol.^{20,789} Sólo fue posible realizar un bajo porcentaje de identificación con microorga-

Cuadro 7-32 Identificación de no fermentadores pigmentados^a (oxidasa +, motilidad +, fluoresceína –, lactosa al 10% –, acetamida –, lisina –)

MICROORGANISMO	COLOR	KIA/H ₂ S	FRUCTOSA OF	GAS A PARTIR DE NITRATO	INDOL	MANITOL OF	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	CRECIMIENTO EN NA ₂ CL AL 6,5%
Especies de <i>Roseomonas</i> ^b	Rosado	–	+	–	–	V	–	–
Especies de <i>Methylobacterium</i> ^b	Rosado	–	V(50)	–	–	–	–	–
<i>Shewanella alga</i>	Ocre	+	–	ND	–	–	–	+
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Ocre	+	V	–	–	–	–	–
<i>Massilia timonae</i>	Amarillo pálido	–	–	–	–	–	+	–
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Ocre/anaranjado	–	–	–	–	–	+	–
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Amarillo	–	+	+	–	V(70)	–	+
<i>Balneatrix alpica</i>	Amarillo pálido	–	+	–	+	+	–	ND
<i>Burkholderia cepacia</i>	Amarillo	–	+	–	–	+	V(67)	–
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Amarillo	–	+	–	–	–	+	–

^aDatos tomados de las referencias^{170,249,392,443,626}.

^bLas especies de *Methylobacterium* aparecen como colonias oscuras bajo la luz UV de onda larga debido a la absorción de luz UV. Las especies de *Roseomonas* no absorben la luz UV y no aparecen oscuras.

Nota: todos estos pigmentos se desarrollan sólo a medida que el cultivo envejece. La mayoría de las cepas de las especies de *Chryseobacterium* y *Sphingobacterium* también están pigmentadas (amarillo); sin embargo, estos microorganismos son excluidos de este cuadro porque son inmóviles (véase cuadro 7-26).

+: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Cuadro 7-33 Identificación de no fermentadores desnitrificadores (oxidasa +, motilidad +, fluoresceína –, lactosa al 10% –, acetamida –, lisina –, pigmento –)

MICROORGANISMO	DEXTROSA OF	POLIMIXINA B	ONPG	NACL AL 6,5%	FENILALANINA DESAMINASA	ARGININA	HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	MALTOSA OF	UREASA
<i>Oligella ureolytica</i>	–	S	–	–	+	–	–	–	++
Especies de <i>Pseudomonas</i> CDC grupo 1	–	S	–	–	–	V(50)	–	–	–
<i>A. denitrificans</i>	–	S(83)	–	–	–	–	–	–	V(31)
<i>R. pickettii</i> (Va-1)	+	R	–	–	–	–	V(48)	+	+
<i>R. pickettii</i> (Va-2)	+	R	–	–	V(40)	–	V(12)	–	+
<i>Rhizobium radiobacter</i>	+	S	+	–	+	–	V(16)	+	+
<i>P. stutzeri</i> (Vb-1)	+	S	–	+	V(55)	–	+	+	V(17)
<i>P. mendocina</i> (Vb-2)	+	S	–	+	V(50)	+	–	–	V(50)
CDC Vb-3	+	S	–	+	V(56)	+	V(75)	V(88)	V(31)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	+	S	–	–	+	V(36)	–	V(50)	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	S	–	–	–	+	–	V(12)	V(66)
<i>A. xylosoxidans</i>	+	S	–	–	–	–	–	–	–

Datos tomados de la referencia²⁴⁹.
 +: 90% o más de cepas positivas; –: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; R: resistente; S: sensible; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.
 Nota: *A. denitrificans* puede ser separado de las especies de *Pseudomonas* CDC grupo 1 sobre la base de la morfología de los flagelos. *Achromobacter* tiene flagelos peritricos; *Pseudomonas* grupo 1 tiene un único flagelo polar.

Cuadro 7-34 Identificación de no fermentadores dextrosa positivos (oxidasa +, motilidad +, fluoresceína -, lactosa al 10% -, acetamida -, lisina -, pigmento -, desnitrificación -)

MICROORGANISMO	PIGMENTO DE LAS COLONIAS	KIA H ₂ S	INDOL	FRUCTOSA OF	ONPG	XILOSA OF	DNASA	CRECIMIENTO EN NaCl 6,5%	FENILALANINA DESAMINASA	ARGININA	CRECIMIENTO A 42 °C	HIDRÓLISIS DE GELATINA	HIDRÓLISIS DE ESCULINA
<i>Methylobacterium</i>	Rosado	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	+	-	V	-	-	+	-	-	-	V	V	-
<i>Balneatrix alpica</i>	Amarillo pálido	-	+	+	-	ND	-	-	ND	+	+	+ débil	-
<i>A xylooxidans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V(86)	-	-
<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-	-	-	-	-	V(12)	-	V(16)	-	V(19)	V(58)	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V(13)	-	+
Grupo similar a <i>Pseudomonas</i> 2	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	V(21)	V(36)	V(75)	-	-
<i>Acidovorax delafieldii</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
CDC Vb-3	-	-	-	+	-	+	-	+	V(56)	+	V(75)	-	-
<i>O. anthropi</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	V(36)	V(10)	-	V(40)
<i>R. pickettii</i> (VA-1)	-	-	-	+	-	+6	-	-	-	-	V(26)	V(77)	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	V(85)	-	-	-	+	+	V(46)	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>P. putida</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Datos tomados de las referencias^{170,249}. +: 90% o más de cepas positivas; -: 90% o menos de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.													

Cuadro 7-35 Identificación de no fermentadores negativos dextrosa negativos^a (oxidasa +, motilidad +, fluoresceína –, lactosa al 10 % –, acetamida –, lisina –, pigmento –, desnitrificación –, dextrosa –)

MICROORGANISMO	COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO	KIA H ₂ S	FRUCTOSA OF	UREASA	NO ₃ A NO ₂	NO ₃ A GAS	HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	FENILALANINA DESAMINASA	DNASA	ARGININA	FLAGELLOS SEGÚN SU DISPOSICIÓN
<i>Methylobacterium</i> ^b	+	–	V	+	V	ND	+	–	–	–	Monotricos polares
<i>Roseomonas</i> ^b	+	–	+	+	–	ND	+	V(17)	–	–	Variable
<i>Shewanella putrefaciens/alga</i>	–	+	V	–	V	ND	–	–	+	–	Polar, 1-2
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	–	–	+	–	+	ND	–	V(21)	–	V(36)	Polar, 1-2
<i>O. ureolytica</i>	–	–	–	++	+	V(63)	–	+	–	–	Peritricos
<i>B. bronchiseptica</i>	–	–	–	++	+	–	–	V(25)	–	–	Peritricos
<i>Cupriavidus pauculus</i>	–	–	–	++	–	–	V(16)	–	–	–	Peritricos
<i>Brevundimonas diminuta</i>	–	–	–	–	–	ND	–	V(16)	V(12)	–	Monotricos polares
<i>B. hinzii</i>	–	–	–	–	–	–	–	V(15)	–	–	Peritricos
<i>P. alcaligenes</i>	–	–	–	V(21)	V(61)	V(10)	V(16)	V(20)	–	V(7)	Monotricos polares
<i>C. testosteroni</i>	–	–	–	–	+	V(11)	–	V(30)	–	–	Multitricos polares
<i>A. piechaudii</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	Peritricos

^aDatos tomados de la referencia²⁴⁹.^bLas especies de *Methylobacterium* aparecen como colonias oscuras bajo la luz UV de onda larga debido a la absorción de luz UV. Las especies de *Roseomonas* no absorben luz UV y no aparecen oscuras.^c*Shewanella alga* crecen en NaCl al 6,5%; *Shewanella putrefaciens* no crece en NaCl al 6,5%.

+: 90% o más de cepas positivas; –: 90% o más de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; ++: reacción positiva fuerte; ND: resultados no disponibles; OF: oxidación-fermentación. Los números entre paréntesis son porcentajes de cepas que dan reacciones positivas.

Recuadro 7-11 Sistemas API 20E y API 20NE para identificar a los no fermentadores

Función	Procedimiento operativo	Sustratos incluidos
Cada sistema consiste en una banda de plástico con 20 cúpulas miniaturizadas que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación de plástico con una tapa que ajusta laxamente (véanse las láminas en color 6-6A y 7-5D). Cada cúpula tiene un agujero pequeño en la parte superior a través del cual se puede inocular la suspensión bacteriana con una pipeta. La acción bacteriana sobre los sustratos produce turbidez o cambios de color que son interpretados visualmente.	<i>Para ambos sistemas:</i> agregar 5 mL de agua corriente a una bandeja de incubación para proveer una atmósfera húmeda durante la incubación. Colocar la banda en la bandeja de incubación. Preparar una suspensión bacteriana del microorganismo de prueba suspendiendo las células de una colonia bien aislada en 5 mL de solución salina al 0.85% estéril. La turbidez debe ser equivalente a un estándar de McFarland al 0.5. <i>API 20E:</i> con una pipeta de Pasteur, llenar cada cúpula con la suspensión bacteriana a través del agujero de inoculación. Cubrir las tres cúpulas de descarboxilasa y las cúpulas de ureasa con vaselina estéril. La unidad se incuba a 35 °C durante 24 o 48 horas antes de leer los resultados de acuerdo con las siguientes reglas: después de 24 horas, si la glucosa es positiva, agregar reactivos, realizar una prueba de oxidasa y crear un número de perfil de 7 dígitos para buscarlo en la sección blanca del Índice de perfiles; si la glucosa es negativa, pero tres o más de otras reacciones son positivas antes de agregar reactivos, proseguir como antes; si la glucosa es negativa y menos de otras tres pruebas son positivas, no agregar reactivos, recubrir las bandas durante otras 24 horas e inocular glucosa OF, medio para motilidad y agar de MacConkey. Después de 48 horas, agregar reactivos, realizar la prueba de oxidasa y crear un número de perfil de 9 dígitos para buscarlo en la sección azul del Índice de perfiles. <i>API 20NE:</i> con una pipeta de Pasteur, llenar la porción de tubo de las ocho primeras cúpulas (NO₃ a PNPG) con la suspensión bacteriana. Inocular una ampolla de medio AUX con cuatro gotas de la misma suspensión salina. Mezclar bien. Con una nueva pipeta estéril inocular las pruebas de asimilación GLU a PAC (cúpulas con líneas coloreadas) llenando el tubo y la cúpula hasta obtener una superficie líquida plana sin un menisco. Agregar vaselina a las cúpulas GLU, ADH y URE. Incubar la banda durante 24 horas a 29-31 °C. Después de 24 horas, agregar reactivos de nitrato a la cúpula de NO₃ y reactivo TRP a la cúpula TRP. Leer y registrar las reacciones. Las pruebas de asimilación se registran como positivas si existe un crecimiento visible en la porción de la cúpula del tubo. Se genera un número de perfil de 7 dígitos. Si no se obtiene una buena identificación o no se encuentra un número de perfil en el libro de códigos, se puede inocular la banda de prueba durante otras 24 horas. Para hacerlo, cubrir de inmediato las cúpulas de NO₃ y TRP con vaselina. Registrar los resultados de las pruebas de NO₃, TRP y GLU después de 24 horas; no leer estas pruebas después de 48 horas.	API 20E: ONPG Arginina dihidrolasa Lisina descarboxilasa Ornitina descarboxilasa Citrato Sulfuro de hidrógeno Ureasa Triptófano desaminasa (agregar FeCl₃ al 10%) Indol Voges-Proskauer (agregar KOH y α-naftol) Gelatina Glucosa Manitol Inositol Sorbitol Ramnos Sacarosa Melibios Amigdalina Arabinosa Pruebas complementarias: Oxidasa NO₃ Gas N₂ Motilidad Agar de MacConkey Glucosa-oxidativa OF Glucosa-fermentativa OF API 20NE: Pruebas bioquímicas: NO₃ Reducción de nitrato TRP Triptófano GLU Fermentación de glucosa ADH Arginina dihidrolasa URE Ureasa ESC Hidrólisis de esculina GEL Gelatinasa PNPG β-galactosidasa Pruebas de asimilación: GLU D-glucosa ARA L-arabinosa MNE D-manosa MAN D-manitol NAG N-acetil-D-glucosamina MAL Maltosa GNT D-gluconato CAP Caprato ADI Adipato MLT L-malato CIT Citrato PAC Fenilacetato

ismos como *B. cepacia* y CDC grupo IV y con muchas de las cepas no oxidativas y no sacarolíticas.⁷⁸⁹ Fue necesario realizar pruebas complementarias, como morfología en la tinción de Gram, motilidad de la gota colgante y tinciones para flagelos para identificar estas cepas. No obstante, los investigadores

comunican que es conveniente utilizar el sistema UNI-N/F, que tiene un porcentaje global elevado de identificaciones de bacilos no fermentadores en 24 horas y mejor rendimiento para la identificación de no fermentadores que los sistemas Oxi/Ferm o API 20E.^{20,45,90,411,422,681,789} Kiska y cols. informaron que el sistema

Recuadro 7-12 Sistema Remel N/F para la identificación de los no fermentadores

Diseño funcional	Procedimiento operativo	Sustratos incluidos
Este sistema consiste en dos tubos de medios vertidos sobre una porción inclinada y una rueda, que incluye 13 compartimentos, 12 periféricos y 1 central, que contienen distintos sustratos de medios (lámina en color 7-5E). Los dos tubos se utilizan para evaluar <i>P. aeruginosa</i>. El tubo no estrangulado se incuba a 42 °C para observar el crecimiento y la producción de pigmento piocianina; el tubo GNF estrangulado se utiliza para evaluar la presencia de fluorescencia, la fermentación de glucosa y el N₂. La rueda se utiliza para determinar varias características bioquímicas. Cada uno de los compartimentos de medios periféricos tiene un pequeño poro a través del cual se puede inocular una suspensión bacteriana. El medio del compartimento central está abierto al aire y es inoculado directamente. Una tapa de plástico cubre la unidad para evitar la evaporación durante la incubación.	Inicialmente inocular con un corte los dos tubos, utilizando un alambre inoculador recto que ha sido tocado hasta la superficie de una colonia bien aislada de la bacteria de prueba que crece sobre una placa de agar. Incubar los tubos durante 18-24 horas a 35 °C. Si las reacciones en los tubos no son compatibles con <i>P. aeruginosa</i>, preparar una suspensión bacteriana importante para emulsificar todo el crecimiento desde la porción inclinada del tubo GNF en 2 mL de agua destilada estéril. Agregar una gota a cada una de las 12 celdas periféricas a través del poro inoculador e inocular con un corte profundamente el medio de agar en el centro de la rueda. Reemplazar la tapa de plástico sobre la rueda e incubar la unidad a 35 °C durante 18-24 horas. Las reacciones de color se interpretan visualmente y se hacen las identificaciones utilizando un esquema lógico o un programa computarizado suministrado por el fabricante.	Agar inclinado en tubo no estrangulado: crecimiento a 42 °C y producción de pigmento piocianina Tubo estrangulado Medio GNF Fermentación de glucosa N₂ Fluorescencia Rueda Compartimentos periféricos Control de crecimiento Glucosa Xilosa Manitol Lactosa Maltosa Acetamida Esculina Urea DNAsa ONPG Compartimento central Medios de agar: Sulfuro de hidrógeno Indol

UNI-N/F identificó correctamente el 72% de los bacilos no fermentadores hallados en pacientes con fibrosis quística, que incluyó el 86% de las cepas de *B. cepacia*. El porcentaje de identificación de *B. cepacia* aisladas fue el más alto entre los cuatro equipos de prueba estudiados.⁴⁰⁴ Hemos observado que el sistema Uni-N/F tiene un rendimiento comparable con los sistemas Crystal Enteric/Nonfermenter e IDS RapID NF Plus. (Schreckenberger PC, Anderson RP, Pierson C, Debusscher J, Brown W: datos no publicados).

Sistema Crystal Enteric/Nonfermenter

El equipo de identificación Crystal Enteric/Nonfermenter se describió en el capítulo 6. La base de datos de no fermentadores incluye 24 taxones de no fermentadores que representan 10 géneros diferentes. Otros 20 taxones están incluidos en un grupo denominado "Otros bacilos gramnegativos", que consiste en un grupo de especies oxidasa positivas que son relativamente inactivas e indistinguibles unas de otras con el sistema Crystal E/NF. En este grupo se incluyen algunas especies de importancia clínica de *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Moraxella*, *Ochrobactrum*, *Oligella* y *Pseudomonas*. En un estudio de Wauters y cols.⁷⁹¹ la identificación correcta global de 201 no fermentadores (que incluían 31 especies diferentes) fue del 75,9% con Crystal E/NF, comparada con la identificación del 75,3% mediante API 20NE. Se destaca que sólo 36 de 45 cepas de *P. aeruginosa* fueron identificadas correctamente con Crystal E/NF comparado con la identificación de 41 en 45 con API 20NE. El porcentaje global de identificaciones incorrectas de no fermentadores fue mayor en forma sustancial con API (13,8%) que con Crystal (6,3%). Los investigadores destacaron que la ventaja de Crystal con respecto al sistema

API consiste en que tanto los microorganismos fermentadores como los no fermentadores pueden probarse con el mismo panel. Además, API 20NE puede requerir 48 horas de incubación, mientras que Crystal E/NF precisa sólo 18 horas de incubación. Robinson y cols.⁶³¹ estudiaron 131 bacilos no entéricos con Crystal E/NF, entre los cuales se incluyeron 11 especies de no fermentadores; sin embargo, tres especies (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*) representaron el 90% de los no fermentadores evaluados. El sistema Crystal identificó correctamente todas las especies de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. maltophilia* evaluadas, pero sólo identificó correctamente 8 de 13 (61,5%) especies restantes de no fermentadores. Nuestra propia evaluación mostró una tasa de identificación global de especies del 62,5%. (Schreckenberger PC, Anderson RR, Pierson C, Debusscher J, Brown W: datos no publicados.)

Sistema RapID NF Plus

El sistema RapID NF Plus (Remel) es un micrométodo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de bacterias gramnegativas no fermentadores de importancia clínica y otras bacterias gramnegativas fermentadoras de la glucosa seleccionadas no pertenecientes a la familia de enterobacterias. Las pruebas utilizadas en este sistema se basan en la degradación microbiana de sustratos específicos detectados mediante distintos sistemas indicadores. Las reacciones utilizadas son una combinación de pruebas convencionales y pruebas cromogénicas de sustrato único. El sistema se describe en el recuadro 7-13 y se muestra en la lámina en color 7-5F. En el estudio de Kitch y cols.,⁴⁰⁵ la identificación de especies fue correcta en el 90,1% de todas las cepas sin otras pruebas. Kiska y cols.⁴⁰⁴ mostraron que el sistema RapID NF Plus

Recuadro 7-13 Sistema RapID NF Plus para la identificación de los no fermentadores

Diseño funcional	Procedimiento operativo	Sustratos incluidos
El sistema consiste en 10 cavidades de reacción moldeadas en la periferia de una bandeja desechable de plástico (véase lámina en color 7-5F). Las cavidades de reacción contienen reactivos deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. Cuando se agrega el inóculo de prueba a la cavidad de reacción, el sustrato de prueba se hidrata y se inicia la reacción de la prueba. Después de la incubación durante 4 horas, se examina cada cavidad de prueba para detectar actividad anotando el desarrollo de un color. En algunos casos, se deben agregar reactivos a las cavidades de prueba para proporcionar un cambio de color. El patrón resultante de las reacciones de prueba positivas y negativas se utiliza como base para la identificación de la cepa de prueba por comparación de los resultados de las pruebas con la reactividad de los microorganismos conocidos almacenados en una base de datos generada computarizada.	Preparación de los inóculos: se deben hacer crecer los microorganismos de prueba en cultivo puro y deben ser examinados mediante tinción de Gram y oxidasa antes de su uso en el Sistema RapID NF. Los microorganismos de prueba pueden extraerse de distintos medios de crecimiento en agar selectivos y no selectivos. Las placas utilizadas para la preparación de los inóculos deben tener preferentemente de 18-24 horas de antigüedad. Utilizando un hisopo de algodón o un ansa de inoculación, extraer microorganismos de la placa de agar y suspender RapID Inoculation Fluid para lograr una turbidez visual de por lo menos un estándar de turbidez de McFarland pero no superior a tres estándares. Las suspensiones deben mezclarse con cuidado y utilizarse dentro de los 15 minutos de su preparación. Inoculación de paneles: retirar la tapa del panel sobre la puerta de inoculación. Con una pipeta de Pasteur, transferir con suavidad todo el contenido del líquido de inoculación en el ángulo superior derecho del panel. Volver a sellar la puerta de inoculación presionando la tapa en su lugar. Después de agregar la suspensión de prueba, inclinar el panel nuevamente lejos de las cavidades de prueba en un ángulo de 45°. Mientras está inclinado hacia atrás, mover con suavidad el panel de un lado a otro para distribuir en forma uniforme el inóculo a lo largo de los deflectores posteriores. Mientras se mantiene una posición horizontal a nivel, inclinar suavemente el panel hacia adelante hacia las cavidades de reacción hasta que el inóculo fluya a lo largo de los deflectores en las cavidades de reacción. Incubar los paneles a 35-37 °C en una estufa sin CO₂ durante 4 horas. Paneles de lectura: colocar el panel sobre la parte superior del banco y retirar la tapa marcada sobre las cavidades de reacción. Sin el agregado de ningún reactivo, leer y puntuar las cavidades 1 a 10, de izquierda a derecha y registrar en el formulario de informe. Registrar el color de la cavidad 10 (GLU) en el espacio provisto sobre el agujero de comunicación. Luego agregar 2 gotas de reactivo NF Plus a las cavidades 4-8, 2 gotas de reactivo Innova Spot Indole a la cavidad 9 y 2 gotas de reactivo Innova Nitrato A a la cavidad 10. Dejar al menos 10 segundos pero no más de 3 minutos para que aparezca el color. Registrar los resultados en recuadros apropiados en el formulario de informe. Buscar en el compendio de códigos o la base de datos del ordenador.	Arginina dihidrolasa Utilización de tiol alifático Hidrólisis de triglicéridos La hidrólisis enzimática de glucósido o fosfoéster ligado a sustratos nitrofenólicos libera <i>o</i>-nitrofenol o <i>p</i>-nitrofenol amarillo: <i>p</i>-nitrofenil-fosfoéster <i>p</i>-nitrofenil-<i>N</i>-acetil-β, D-glucosamida <i>p</i>-nitrofenil-α, D-glucósido <i>p</i>-nitrofenil-β, D-glucósido <i>o</i>-nitrofenil-β, D-galactósido Hidrólisis de urea Utilización de glucosa La hidrólisis enzimática de sustrato ligado a β-naftilamida libera β-naftilamina que es detectada con el reactivo RapID NF Plus Prolina β-naftilamida Pirrolidina β-naftilamida γ-glutamil β-naftilamida Triptófano β-naftilamida <i>N</i>-benzil-arginina-β-naftilamida Utilización de triptófano con formación de indol Reducción de nitrato de sodio Las pruebas anteriores junto con la oxidasa proporcionan 18 parámetros de prueba

identificaba correctamente el 80% de los bacilos no fermentadores aislados de pacientes con fibrosis quística, incluido el 80% de los aislados de *B. cepacia*. Ésta fue la tasa de identificación global más alta de los cuatro sistemas comerciales incluidos en este estudio.⁴⁰⁴ En el estudio de Schreckenberger y cols., la identificación correcta global de las especies fue del 61,8%. (Schreckenberger PC, Anderson RR, Pierson C, Debusscher J, Brown W: datos no publicados.) RapID NF Plus es el único sistema de prueba de 4 horas no automático disponible para la identificación de no fermentadores.

Sistema Biolog

El sistema Biolog (Biolog, Hayward CA) se describió en el capítulo 6. La base de datos para gramnegativos versión 4.01 contiene cerca de 275 especies y biogrupos de bacilos gramnegativos no fermentadores. Holmes y cols.³¹⁵ evaluaron el sistema Biolog utilizando 214 cepas de no fermentadores que representan 15 especies. Estos autores comunican que después de 4 horas de incubación identificaron correctamente las especies en el 20% de los no fermentadores utilizando el lector automáti-

co; sin embargo, después de 24 horas de incubación la identificación de especies fue correcta en el 54% y el 66% de los no fermentadores mediante las lecturas automática y manual, respectivamente, utilizando software versión 3.01A. Los autores señalan que ningún otro sistema de identificación bacteriano comercial tiene tantos taxones en una base de datos única como el proporcionado por Biolog, pero como existen tantos, incluso la gran cantidad de pruebas disponibles puede no ser suficiente, en la práctica, para discriminar todos los pares de taxones.³¹⁵

Sistemas de identificación automáticos

Sistema Vitek Legacy®

El sistema Vitek Legacy (bioMérieux), descrito en el capítulo 6, ha sido utilizado con éxito en la identificación de los no fermentadores hallados con mayor frecuencia en el laboratorio clínico. Pfaller y cols.⁵⁷⁸ evaluaron 91 bacilos no fermentadores y el 90,1% fue identificado correctamente. El 15% fue identificado en 4 horas, otro 45%, en 5 a 8 horas y otro 40%, en 9 a 18 horas. Colonna y cols.¹⁴⁷ evaluaron 142 no fermentadores y observaron un 79,6% de concordancia con el API NFT. Kiska y cols.⁴⁰⁴ evaluaron cuatro sistemas de identificación, que incluían la tarjeta Vitek GNI, para la identificación de bacilos no fermentadores de pacientes con fibrosis quística. Se evaluó un total de 150 cepas aisladas que incluyeron 58 *B. cepacia*, 30 *S. maltophilia*, 24 *A. xylosoxidans*, 14 *P. aeruginosa* y otros 24 bacilos no fermentadores. El Vitek identificó correctamente sólo el 50% de las cepas de *B. cepacia* y el 60% del total de microorganismos aislados. O'Hara y cols.⁵⁴⁸ evaluaron 23 no fermentadores (8 *Acinetobacter*, 10 *P. aeruginosa*, 5 *S. maltophilia*) y comunicaron un 100% de identificaciones correctas con la tarjeta Vitek GNI y el software versión R07.1. Rhoads y cols.⁶²³ evaluaron 80 *A. baumannii* y 39 *P. aeruginosa* e informaron una identificación correcta del 100% y del 84,6%, respectivamente, con la tarjeta Vitek GNI y el software versión AMS-R08.2. Sung y cols. evaluaron el GNI+ para la identificación de 301 cepas de bacilos no fermentadores que representaban 25 especies diferentes. La identificación correcta de especie en las pruebas iniciales fue del 71,8% y mejoró hasta el 92,3% después de las pruebas adicionales como lo recomendaba el protocolo del fabricante.⁷²²

Sistema Vitek 2®

El sistema Vitek 2 se describe en detalle en el capítulo 6. La tarjeta Vitek 2 original para la identificación de gramnegativos ha sido rediseñada para mejorar la identificación de los bacilos fermentadores y no fermentadores. La nueva tarjeta contiene 47 pruebas (26 que habían sido incluidas en la tarjeta previa y 21 pruebas nuevas), comparadas con las 41 en la tarjeta Vitek 2 IDx-GNB establecida. La base de datos para la nueva tarjeta ha sido ampliada hasta 159 taxones comparada con sólo 101 para la tarjeta Vitek 2 original. En un estudio realizado por Funke y cols., 133 de 144 (92,4%) bacilos no fermentadores fueron identificados correctamente con las nuevas tarjetas Vitek 2.²³⁰

Sistemas Microscan Walkaway-96®, Walkaway-40® y Autoscan-4®

Estos tres sistemas (fabricados por Dade Behring, West Sacramento CA), descritos en el capítulo 6, tienen una base de datos extensa que incluye muchas especies de bacilos no fer-

mentadores. Pfaller y cols.,⁵⁷⁸ utilizando el panel rápido para gramnegativos Walkaway-96, comunicaron que el 92,3% de los bacilos no entéricos eran identificados correctamente con una probabilidad mayor del 85%. Tenover y cols.⁷³⁴ evaluaron el Walkaway-96 (antes denominado autoSCAN-W/A) por su capacidad para identificar 310 bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa bien caracterizados. En su estudio, se evaluaron dos tipos de paneles de identificación: el panel tipo 2 de identificación Neg colorimétrico desecado (DCP) y el panel de identificación Neg fluorométrico rápido (RFP). Los resultados con DCP mostraron que el 41,3% de 286 microorganismos fueron identificados correctamente, con una confianza mayor del 85%, mientras que el 22,4% fue mal identificado con el mismo grado de confianza (errores mayores). El 15% de los microorganismos fueron comunicados como no identificados. Se informaron problemas en la identificación de bacilos no fermentadores relativamente frecuentes, como *P. fluorescens*, *P. putida* y *S. maltophilia* con el panel DCP. Los investigadores comunicaron mejores resultados con los paneles RFP, en los cuales el 77,1% de 239 cepas aisladas se identificaron correctamente, mientras que el 25% fue mal identificado. Los investigadores señalaron además que los resultados con los paneles RFP estaban disponibles en 2 horas; por lo tanto, cuando no se puede identificar un microorganismo, se pueden inocular otras pruebas bioquímicas el mismo día, y se pierde poco tiempo en la identificación. Colonna y cols. evaluaron en UCLA 142 bacilos no fermentadores utilizando el panel de identificación Neg rápido en 2 horas y comunicaron el 74,6% de concordancia con el API NFT.¹⁴⁷ O'Hara y cols.⁵⁴⁸ evaluaron en los CDC 23 cepas de bacilos no fermentadores, incluidos 8 *Acinetobacter*, 10 *P. aeruginosa* y 5 *S. maltophiliae* e informaron una precisión del 100% con el panel combo 3 Walkaway Neg y el software versión 17.02. Rhoads y cols.⁶²³ comunicaron una identificación correcta del 97,5% y el 82,1% de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados, respectivamente, utilizando el sistema Walkaway-96 con combo 6 en orina y combo 16 negativo y software versión 20.20. Sung y cols. compararon el MicroScan Walkaway (W/A) utilizando paneles tipo 12 de Combo Neg convencional (toda la noche), con el Vitek GNI+ para la identificación de 301 bacilos no fermentadores aislados que mejoró hasta el 96,0% después de pruebas adicionales que fueron recomendadas por el protocolo del fabricante.⁷²² Saiman y cols. evaluaron la capacidad del MicroScan Autoscan para identificar *P. aeruginosa* aisladas en pacientes con fibrosis quística.⁶⁵⁶ Utilizando los paneles Combo Negativos tipo 15 leídos después de 20 a 24 horas y nuevamente a las 48 horas de incubación pudieron identificar correctamente el 57% (108 o 189) de cepas no mucoides y 40% (24 de 60) de cepas mucoides. La mala identificación más frecuente fue *Pseudomonas fluorescens/putida*.⁶⁵⁶

En 1997, MicroScan actualizó los paneles de identificación rápida de gramnegativos del panel tipo 2 al panel tipo 3 para mejorar la precisión de la identificación, eliminar la necesidad del revestimiento con vaselina para las pruebas de descarboxilasa y aumentar el tiempo de conservación de 1 año a 2 años. La base de datos de identificación para el panel revisado fue actualizada para incluir 119 taxones. En una evaluación multicéntrica del nuevo panel tipo 3 la identificación de especies fue correcta en el 91,3% (63 de 69) de los bacilos no fermentadores.⁴⁸ En un estudio realizado en la University of Illinois en Chicago, la identificación de especies con los paneles rápidos tipo 3 para gramnegativos fue correcta en el 92,2% (71 de 77) de los bacilos no fermentadores que representaban 10 especies.⁶⁷⁰

Sistema Sensititre AP80®

Los paneles de identificación Sensititre AP80 (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) pueden ser inoculados e incubados fuera de línea y luego leídos en el Autolector Sensititre o pueden ser inoculados y colocados en el instrumento ARIS (Sistema de lectura e incubación automática) descrito en el capítulo 6. El panel AP80 permite la identificación de bacilos gramnegativos tan sólo en 5 horas, con la opción de una incubación adicional durante toda la noche si es necesario o conveniente. Colonna y cols. evaluaron 142 bacilos gramnegativos utilizando los paneles Sensititre AP80 y comunicaron un 71,1% de concordancia con el API NPT.¹⁴⁷ Shorrock y cols.⁷¹¹ evaluaron 144 cepas no entéricas que incluyeron 135 no fermentadores que representaban ocho especies. El 93% de los microorganismos aislados consistió sólo en tres especies (68 *P. aeruginosa*, 33 *Acinetobacter*, 25 *S. maltophilia*). Se obtuvo una identificación correcta para el 99,2% de estas tres especies y para el 95,1% de todos los no entéricos evaluados. La pequeña cantidad de especies de no fermentadores evaluados en este estudio hace difícil determinar el rendimiento de este sistema para las pruebas de laboratorio clínico habitual de los no fermentadores.

Sistema Phoenix®

El Phoenix (Becton Dickinson Microbiology Systems) es un sistema microbiológico automático de identificación y pruebas de sensibilidad a los antibióticos creado recientemente. En el capítulo 6 se presentan sus detalles. Hasta la fecha, sólo se han publicado algunos estudios que lo evalúan para la identificación de bacilos no fermentadores. Stefaniuk y cols. evaluaron 94 bacilos no fermentadores (22 *P. aeruginosa*, 17 *Acinetobacter*, 15 *S. maltophilia*) y comunicaron un 96,3% (52 de 54) de concordancia con los métodos estándares.⁷¹² Donay y cols. evaluaron 56 bacilos no fermentadores que representaban siete especies y comunicaron un 89,3% de identificaciones correctas con el sistema Phoenix en comparación con una identificación de referencia.¹⁹⁶

Selección de un sistema

Los microbiólogos clínicos deben evaluar los parámetros de precisión, costo-eficacia y efectos sobre el flujo de trabajo cuando deciden si van a utilizar un sistema comercial para la identificación de los no fermentadores. Los sistemas comerciales rinden con niveles de precisión iguales o mejores que los métodos convencionales en la identificación de *P. aeruginosa*, especies de *Acinetobacter* y *S. maltophilia*; sin embargo, estos microorganismos metabólicamente activos también pueden ser identificados fácilmente utilizando algunas pruebas bioquímicas simples descritas antes. Muchos laboratorios han adoptado uno de los sistemas comerciales por conveniencia. No obstante, debido a la baja sensibilidad y especificidad comunicadas en la identificación de muchos de los no fermentadores con mayores requerimientos nutricionales especiales y más inactivos desde el punto de vista bioquímico, se deben tener aún a estos medios diferenciales convencionales con suplementos. Por lo tanto, la identificación definitiva de la mayoría de los no fermentadores requiere aún una experiencia técnica considerable y el acceso a distintos medios de cultivo frescos bajo un estricto control de calidad. Dado que relativamente pocos no fermentadores, sobre todo las cepas de especies distintas de las

tres mencionadas, se encuentran en la mayoría de los laboratorios intermedios o pequeños, se debe considerar seriamente los servicios de un laboratorio de referencia. No es difícil identificar a los no fermentadores si el microbiólogo desea emplear el tiempo y la dedicación necesarios para lograr un nivel aceptable de precisión. Se pueden recomendar los sistemas comerciales, siempre que se conozcan sus inconvenientes y se desee establecer pruebas complementarias para identificar las cepas débilmente reactivas o con requerimientos nutricionales especiales.

REFERENCIAS

1. Aaron SD, Fems W, Henry DA, et al. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1206-1212.
2. Aber RC, Wennert C, Moellering RC Jr. Antimicrobial susceptibility of flavobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1978;14:483-487.
3. Agodi A, Mahenthalingam E, Barchitta M, et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomic status. J Clin Microbiol 2001;39:2891-2896.
4. Aisenberg G, Rolston KV, Safdar A. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). Cancer 2004;101:2134-2140.
5. Alcalá L, Vasallo FJ, Cercenado E, et al. Catheter-related bacteremia due to *Roseomonas gilardii* sp. nov. J Clin Microbiol 1997;35:2712.
6. Alnor D, Frimodt-Moller, Espersen F, et al. Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*. Clin Infect Dis 1994;18:914-920.
7. Alos JJ, De Rafael L, Gonzalez-Palacios R, et al. Urinary tract infection probable caused by *Agrobacterium radiobacter*. Eur J Clin Microbiol 1985;4:596-597.
8. Amador C, Chiner E, Calpe JL, et al. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis 1991;13:771-772.
9. Amber LJ, Reimer LG. *Pseudomonas* sp. group Ve-2 bacterial peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Clin Microbiol 1987;25:744-745.
10. Anaissie E, Fainstein V, Miller P, et al. *Pseudomonas putida*: newly recognized pathogen in patients with cancer. Am J Med 1987;82:1191-1194.
11. Andersen BM, Steigerwalt AG, O'Connor SP, et al. *Neisseria weaveri* sp. nov., formerly CDC group M-5, a gram-negative bacterium associated with dog bite wounds. J Clin Microbiol 1993;31:2456-2466.
12. Andersen BM, Weyant RS, Steigerwalt AG, et al. Characterization of *Neisseria elongata* subsp. glycolytica isolates obtained from human wound specimen and blood culture. J Clin Microbiol 1995;33:76-78.
13. Anderson RR, Warnick P, Schreckenberger PC. Recurrent CDC Group IVc-2 bacteremia in a human with AIDS. J Clin Microbiol 1997;35:780-782.
14. Anzai Y, Kudo Y, Oyaizu H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. Int J Syst Bacteriol 1997;47:249-251.
15. Apisarnthanarak A, Dunagan WC, Dunne WM. *Neisseria elongata* Subsp. *elongata* as a cause of human endocarditis. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;39:265-266.
16. Apisarnthanarak A, Mayfield JL, Garison T, et al. Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:269-274.
17. Appelbaum PC, Bowen AJ. Opportunistic infection of chronic skin ulcer with *Pseudomonas putrefaciens*. Br J Dermatol 1978;98:229-231.
18. Appelbaum PC, Campbell DB. Pancreatic abscess associated with *Achromobacter* group VD biovar 1. J Clin Microbiol 1980;12:282-283.
19. Appelbaum PC, Leather DJ. Evaluation of the rapid NFT system for identification of gram-negative, nonfermenting rods. J Clin Microbiol 1984;20:730-734.
20. Appelbaum PC, Stavits J, Bent MS, et al. Four method for identification of gram-negative nonfermenting rod: organisms more commonly encountered in clinical specimens. J Clin Microbiol 1980;12:271-278.
21. Aragon MDR, Maurizi DM, Clara LO, et al. *Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis. J Clin Microbiol 1992;30:1583-1584.
22. Arance A, Montes A, Cissal M, et al. CDC group IV c-2 infection in a item cell transplant recipient. Bone Marrow Transplant 1997;20:1005-1006.
23. Arda B, Aydemir S, Yamazhan T, et al. Comamonas testosteroni meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma. APMIS 2003;111:474-476.
24. Arduino S, Villar H, Veron MT, et al. CDC group IV c-2 as a cause of catheter-related sepsis in an immunocompromised patient. Clin Infect Dis 1993;17:512-513.
25. Areekul S, Vongthongsri U, Mookto T, et al. *Sphingobacterium multivorum* septicemia: a case report. J Med Assoc Thai 1996;79:395-398.
26. Ari RM, Routh JC, LiPuma JJ, et al. Lung transplantation for patient with cystic fibrosis with *Burkholderia cepacia* complex. Am J Respir Crit Care Med 2001;164:2102-2106.
27. Arvand M, Feldhues R, Mieth M, et al. Chronic cholangitis caused by *Bordetella hinzii* in a liver transplant recipient. J Clin Microbiol 2004;42:2335-2337.
28. Ashdown LR. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. Pathology 1979;11:293-297.
29. Ashdown LR. Melioidosis and safety in the clinical laboratory. J Hosp Infect 1992;21:301-306.

30. Ashdown LR, Currie BJ. Melioidosis: when in doubt leave the quinolone alone! *Med J Aust* 1992;157:427-428.
31. Ashdown LR, Johnson RW, Koehler IM, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. *J Infect Dis* 1989;160:253-260.
32. Ashdown LR, Previtera S. Community acquired *Flavobacterium meningosepticum* and septicemia. *Med J Aust* 1992;156:69-70.
33. Aspinall ST, Graham R. Two sources of contamination of a hydrotherapy pool by environmental organism. *J Hosp Infect* 1989;14:285-292.
34. Asib EA, Ouattara AS, Thierry S, et al. *Senorophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:559-568.
35. Atkinson BE, Smith DL, Lockwood WR. *Pseudomonas testosterone* septicemia. *Ann Intern Med* 1975;83:369-370.
36. Bachman KH, Sewell DL, Strausbaugh LJ. Recurrent cellulitis and bacteremia caused by *Flavobacterium odoratum*. *Clin Infect Dis* 1996;22:1112-1113.
37. Bailie WE, Stowe EC, Schmitt AM. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* 1978;7:223-231.
38. Baldani JJ, Pot B, Kirchhof G, et al. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] rubrisubalbicans, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group I) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:802-810.
39. Balkwill DL, Drake GR, Reeves RH, et al. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranean* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:191-201.
40. Ballesteros S, Virseda I, Escobar H, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:728-729.
- 40a. Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenbarg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Ed. 5. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991.
41. Barabaro DJ, Mackowiak PA, Barth SS, et al. *Pseudomonas testosterone* infections: eighteen recent cases and a review of the literature. *Rev Infect Dis* 1987;9:124-129.
42. Barham WB, Church P, Brown JE, et al. Misidentification of *Brucella* species with use of rapid bacterial identification systems. *Clin Infect Dis* 1993;17:1068-1069.
43. Barker PM, Wood RE, Gilligan PH. Lung infection with *Burkholderia gladioli* in a child with cystic fibrosis: acute clinical and spirometric deterioration. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:123-125.
44. Barnham M, Holmes B. Isolation of CDC group M-5 and *Staphylococcus intermedius* from infected dog bites. *J Infect* 1992;25:332-334.
45. Barnishan J, Ayers LW. Rapid identification of nonfermentative gram-negative rods by the Comig N/F system. *J Clin Microbiol* 1979;9:239-243.
46. Barson WJ, Cromer BA, Marcon MJ. Puncture wound osteochondritis of the foot caused by CDC group Vd. *J Clin Microbiol* 1987;25:2014-2016.
47. Barwick RS, Levy DA, Craun GP, et al. Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ* 2000;49:1-21.
48. Bascomb S, Abbott SL, Bobolis JD, et al. Multicenter evaluation of the MicroScan rapid gram-negative identification type 3 panel. *J Clin Microbiol* 1997;35:2531-2536.
49. Basset DCJ, Dickson JAS, Hunt GH. Infection of Holter valve by *Pseudomonas*-contaminated chlorhexidine. *Lancet* 1973;1:1263-1264.
50. Batchelor BI, Brindle RJ, Gilks GF. Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *J Hosp Infect* 1992;22:159-162.
51. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwinh R, et al. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in patients with cystic fibrosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:2748-2751.
52. Baumann L, Baumann P, Mandel M, et al. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol* 1972;110:402-429.
53. Baumann L, Bowditch RD, Baumann P. Description of *Deleya* gen. nov. created to accommodate the marine species *Alcaligenes aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus*, *A. venustus*, and *Pseudomonas marina*. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:793-802.
54. Bauwens JE, Spach DH, Schacker TW, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 1992;30:2474-2475.
55. Beci-Sague CM, Jarvis WR, Brook J H, et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am J Epidemiol* 1990;132:723-733.
56. Ben Dekhil SM, Peel MM, Lennox VA, et al. Isolation of *Lautropia mirabilis* from sputa of a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* 1997;35:1024-1026.
57. Bendig JWA, Mayes PJ, Eyers DE, et al. *Flavimonas oryzihabitans* (*Pseudomonas oryzihabitans*; CDC Group Ve-2): an emerging pathogen in peritonitis related to continuous ambulatory peritoneal dialysis? *J Clin Microbiol* 1989;27:217-218.
58. Benaar A, Rossello-Mora R, Lalucat J, et al. 16SrRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:200-205.
59. Berger SA, Siegman-Igra Y, Stadler J, et al. Group VE-1 septicemia. *J Clin Microbiol* 1983;17:926-927.
60. Bergoyne-Berezin E, Townner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-165.
61. Berkman RL, Lewin S, Allen JR, et al. Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone-iodine with *Pseudomonas cepacia*. *Ann Intern Med* 1981;45:32-36.
62. Bernardet J-F, Segers P, Vancannet M, et al. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*. emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydati*, nom. nov. (basonym. *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol* 1996;40:128-148.
63. Bernards AT, de Beaufon AJ, Dijkshoorn L, et al. Outbreak of septicemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. *J Hosp Infect* 1997;35:129-140.
64. Bibashi E, Sofianou D, Kontopoulou K, et al. Peritonitis due to *Roseomonas fauriae* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:456-457.
65. Bizet C, Bizet J. Comparative susceptibility of *Ochrobacterium anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloisidans* and *Bordetella bronchiseptica* against 35 antibiotics including 17 beta-lactams. *Pathol Biol (Paris)* 1995;43:258-263.
66. Bizet J, Bizet C. Strains of *Alcaligenes faecalis* from clinical material. *J Infect* 1997;35:167-169.
67. Blok KC, Nadarajah R, Jacobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:30-41.
68. Blumberg DA, Cherry JD. *Agrobacterium radiobacter* and CDC group Ve-2 bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:351-355.
69. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1983;5:279-313.
70. Boixeda D, de Luis DA, Meseguer MA, et al. A case of spontaneous peritonitis caused by *Weeksella virosa*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:897-898.
71. Bonacorsi S, Fitoussi F, Lhopital S, et al. Comparative in vivo activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:213-217.
72. Borghans JGA, Hosli MTC, Olsen H, et al. *Pseudomonas cepacia* bacteremia due to intrinsic contamination of an anaesthetic. *Acta Path Microbiol Scand Sect B* 1979;87:15-20.
73. Bottone EJ, Douglas SD, Rausen AR, et al. Association of *Pseudomonas cepacia* with chronic granulomatous disease. *J Clin Microbiol* 1975;14:425-428.
74. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:635-643.
75. Boutros N, Gonullu N, Casetta A, et al. *Talstonia pickettii* traced in blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2002;40:2666-2667.
76. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228-240.
77. Bouvet PJM, Grimont PAD. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987;138:569-578.
78. Bouvet PJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species of the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* 1989;140:291-299.
79. Bouvet PJM, Jeanjean S, Vieu J-F, et al. Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* 1990;28:170-176.
80. Bove K, Genus II. *Moraxella* Lwoff 1939, 173 emend. Henriksen and Bove 1968:391^{AI}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: William & Wilkins, 1984:296-303.
81. Bove K, Fuglesang JE, Hagen N, et al. *Moraxella atlantiae* sp. nov. and its distinction from *Moraxella phenylpyruvica*. *Int J Syst Bacteriol* 1976;26:511-521.
82. Bowman JP, Cavanagh, Austin JJ, et al. Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:841-848.
83. Bracis R, Seibers K, Julien RM. Meningitis caused by Group IIj following a dog bite. *West J Med* 1979;131:438-440.
84. Brink AJ, Van Straten A, Van Rensburg AJ. *Shewanella* (*Pseudomonas*) *putrefaciens* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1995;20:1327-1332.
85. Brisse S, Stelani S, Verhoef J, et al. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2002;40:1743-1748.
86. Brivet F, Guibert M, Kiredjian M, et al. Necrotizing fasciitis bacteremia, and multiorgan failure caused by *Ochrobacterium anthropi*. *Clin Infect Dis* 1993;17:516-518.
87. Brown MA, Greene JN, Sandin RL, et al. *Methylobacterium* bacteremia after infusion of contaminated autologous bone marrow. *Clin Infect Dis* 1996;23:1191-1192.
88. Buchman AL, Pickett MJ. *Moraxella atlantiae* bacteremia in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Infect* 1991;23:197-199.
89. Buchman AL, Pickett MJ, Mann L, et al. Central venous catheter infection caused by *Moraxella osloensis* in a patient receiving home parenteral nutrition. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:163-166.
90. Burdard NM, Bannister ER, Manos JP, et al. A comparison of four commercial systems for the identification of nonfermentative gram-negative bacilli. *Am J Clin Pathol* 1980;73:564-569.
91. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 1998;27:158-163.
92. Butt AA, Figueroa J, Martin DA. Ocular infection caused by three unusual marine organisms. *Clin Infect Dis* 1997;24:740.
93. Buxton AE, Anderson RL, Werdegard D, et al. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*. *Am J Med* 1978;65:507-513.
94. Cain JR. A case of septicemia caused by *Agrobacterium radiobacter*. *J Infect* 1988;16:205-206.
95. Calegari L, Gezeule E, Torres E, et al. Botryomycosis caused by *Pseudomonas vesicularis*. *Int J Dermatol* 1996;35:817-818.
96. Calubiran OV, Schoch PE, Cunha BA. *Pseudomonas paucimobilis* bacteremia associated with haemodialysis. *J Hosp Infect* 1990;15:383-388.
97. Campos-Herrero MI, Bordes A, Rodrigue H, et al. *Pseudomonas stutzeri* community-acquired pneumonia associated with empyema: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:325-326.

94. Capitini CM, Herrero IA, Patel R, et al. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis*. 2002;34:E74-E76.
95. Carlson P, Kontiainen S, Anttila P, et al. Septicemia caused by *Neisseria weaveri*. *Clin Infect Dis* 1997;24:739.
96. Carratala J, Salazar A, Mascaro J, et al. Community-acquired pneumonia due to *Pseudomonas stutzeri*. *Clin Infect Dis* 1992;14:792.
97. Casadevall A, Freundlich LF, Pirofski L. Septic shock caused by *Pseudomonas paucimobilis*. *Clin Infect Dis* 1992;14:784.
98. Casalta JP, Peloux Y, Raoult D, et al. Pneumonia and meningitis caused by a new non-fermentative unknown gram-negative bacterium. *J Clin Microbiol* 1989;27:1446-1448.
99. Castagnola E, Conte M, Venzano P, et al. Broviac cameter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer: case reports with literature review. *J Infect* 1997;34:215-218.
100. Castagnola E, Tasso L, Conte M, et al. Central venous catheter-related infection due to *Comamonas acidovorans* in a child with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Infect Dis* 1994;19:559-560.
101. Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, et al. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:255-260.
102. Catlin BW. Cellular elongation under the influence of antibacterial agents: way to differentiate coccobacilli from cocci. *J Clin Microbiol* 1975;1:102-105.
103. Centers for Disease Control and Prevention. *Pseudomonas pickettii* colonization associated with a contaminated respiratory therapy solution—Illinois. *Morb Mortal Wkly Rep* 1983;38:495.
104. Centers for Disease Control and Prevention. *Pseudomonas cepacia* at summer camps for persons with cystic fibrosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42:456-459.
105. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial *Burkholderia cepacia* infection and colonization associated with intrinsically contaminated mouth-wash—Arizona, 1998. *Morb Mortal Wkly Rep* 1998;47:926-928.
106. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired human glanders—Maryland, May 2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:532-535.
107. Chagla AH, Haque KN. Peritonitis due to *Moraxella phenylpyruvica*. *Clin Microbiol Newslett* 1988;10:103.
108. Chadlond Y, Roscoe DL, Nantel SH. *Agrobacterium yellow* group: bacteremia and possible septic arthritis following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:101-104.
109. Chang H3, Christenson JC, Pavia AT, et al. *Ochrobactrum anthropi* meningitis in pediatric pericardial allograft transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996;173:656-660.
110. Chang J-C, Hsueh P-R, Wu J-J, et al. Antimicrobial susceptibility of flavobacteria as determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:1301-1306.
111. Chasowagul W, Suputtamongkul Y, Smith MD, et al. Oral fluoroquinolones for maintenance treatment of melioidosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:599-601.
112. Chaudhry HJ, Schoch PE, Cunha BA. *Flavimonas oryzae* (CDC Group Ve-2). *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:485-488.
113. Chauncey JB, Schaberg DR. Interstitial pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a heart transplant patient. *Transplantation* 1990;49:817-819.
114. Chen W-M, Laevens S, Lee T-M, et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1729-1735.
115. Chen Y-S, Liu Y-C, Yen M-Y, et al. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. *Clin Infect Dis* 1997;25:225-229.
116. Chetchotisakd P, Porramatikul S, Mootsikapun P, et al. Randomized, double-blind, controlled study of cefepime-sulbactam plus cotrimoxazole versus ceftazidime plus cotrimoxazole for the treatment of severe melioidosis. *Clin Infect Dis* 2001;33:29-34.
117. Chetoui H, Melin P, Struelens MJ, et al. Comparison of biotyping, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for investigation of common-source out-break of *Burkholderia pickettii* bacteremia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1398-1403.
118. Chn C-Y, Fung C-P, Wong W-W, et al. *Brevundimonas* bacteremia: two case reports and literature review. *Scand J Infect Dis* 2004;36:59-77.
119. Charab W, Alaoui AS, Amar M. *Chryseobacterium luteola* identified as the source of serious infections in a Moroccan University Hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42:1837-1839.
120. Chiu C-H, Waddington M, Hsieh W-S, et al. Atypical *Chryseobacterium meningosepticum* and meningitis and sepsis in newborns and the immunocompromised. *Taiwan. Emerg Infect Dis* 2000;6:481-486.
121. Chow AW, Wong J, Bartlett ICH. Synergistic interactions of ciprofloxacin and extended-spectrum beta-lactams or aminoglycosides against multiply drug-resistant *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:782-784.
122. Chow KW, Wulfrant NM, Wolfs TFW, et al. *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection in a child after bone marrow transplantation. *Pediatr Infect Dis* 1999;J 18:481-482.
123. Christenson JC, Welch DF, Mukwaya G, et al. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1989;27:270-273.
124. Cieslak TJ, Robb ML, Drabick CJ, et al. Catheter-associated sepsis caused by *Ochrobactrum anthropi*: report of a case and review of related nonfermentative bacteria. *Clin Infect Dis* 1992;14:902-907.
125. Cladera AM, Bannasar A, Barcelo M, et al. Computational genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J Bacteriol* 2004;186:5239-5248.
126. Clark WA. A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* 1976;33:632-634.
127. Clayton AL, Lisella RS, Martin DC. Melioidosis: a serologic survey in military personnel. *Milit Med* 1973;138:24-26.
128. Gode FE, Metherell LA, Pin TL. Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:374-375.
129. Coenye T, Falsen E, Hoste B, et al. Description of *Pandora* gen. nov. with *Pandora apista* sp. nov., *Pandora pulmonicola* sp. nov., *Pandora phenomusa* sp. nov., *Pandora spurius* sp. nov. and *Pandora norimbergensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:887-899.
130. Coenye T, Falsen E, Vancanney M, et al. Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:405-413.
131. Coenye T, Gons J, De Vos P, et al. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1075-1080.
132. Coenye T, Coris J, Spilker T, et al. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* 2002;40:2062-2069.
133. Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, et al. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:271-279.
134. Coenye T, Liu L, Vandamme P, et al. Identification of *Pandora* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. *J Clin Microbiol* 2001;39:4452-4455.
135. Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1481-1490.
136. Coenye T, Vancanney M, Cnockaert MC, et al. *Kerseria gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Rügger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1825-1831.
137. Coenye T, Vancanney M, Falsen E, et al. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1819-1824.
138. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, et al. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001;39:3427-3436.
139. Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Infection by *Ralstonia* species in patients with cystic fibrosis: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 2002;8:692-696.
140. Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. *Ralstonia respiraculi* sp. nov., isolated from the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1339-1342.
141. Coenye T, Vanlaere E, Falsen E, et al. *Stenotrophomonas africana* (Drancourt et al. 1997) is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1235-1237.
142. Coenye T, Vanlaere E, LiPuma JJ, et al. Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using gyrB RFLP analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40:181-185, 2004.
143. Colonna P, Nikolai D, Bruckner D. Comparison of MicroScan autoSCAN-W/A. Radiometer Sensitivity and Vitek systems for rapid identification of gram-negative bacilli. Abstracts of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1990:370.
144. Connor BJ, Kopecky RT, Frymoyer PA, et al. Recurrent *Pseudomonas luteola* (CDC Group Ve-1) peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1987;25:1113-1114.
145. Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, et al. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "B. hinzii." *J Clin Microbiol* 1994;32:2569-2571.
146. Coyle-Gilchrist MM, Crewe P, Roberts G. *Flavobacterium meningosepticum* in the hospital environment. *J Clin Pathol* 1976;29:824-826.
147. Craven DE, Moody B, Connolly MG, et al. Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *N Engl J Med* 1981;305:621-623.
148. Crowe HM, Brecher SM. Nosocomial septicemia with CDC group IVc-2, an unusual gram-negative bacillus. *J Clin Microbiol* 1987;25:2225-2226.
149. Cume BJ, Fisher DA, Howard DM, et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;31:981-986.
150. Dalamaga M, Karmanliolas K, Chavelas C, et al. *Pseudomonas luteola* cutaneous abscess and bacteraemia in a previously healthy man. *Scand J Infect Dis* 2004;36:495-497.
151. Daley D, Neville S, Kociuba K. Peritonitis associated with a CDC group EO-3 organism. *J Clin Microbiol* 1997;35:3338-3339.
152. Dan M, Berger SA, Aderka D, et al. Septicemia caused by the gram-negative bacterium CDC IVc-2 in an immunocompromised human. *J Clin Microbiol* 1986;23:803.
153. Dan M, Gutman R, Biro A. Peritonitis caused by *Pseudomonas putrefaciens* in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Infect Dis* 1992;14:359-360.
154. Dance DA. Melioidosis. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:127-132.
155. Dance DAH. Melioidosis. *Rev Med Microbiol* 1990;1:143-150.
156. Dance DAB. Melioidosis: The tip of the iceberg. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:52-60.
157. Dance DA, Wuthiekanun V, Chaowagul W, et al. The antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei*: emergence of resistance in vitro and during treatment. *J Antimicrob Chemother* 1989;24:295-309.
158. Dance DA, Wuthiekanun V, Naigowit P, et al. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. *J Clin Pathol* 1989;42:645-648.
159. Daneshvar MI, Douglas MP, Weyant RS. Cellular fatty acid composition of *Lautropia mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:4160-4162.
160. Daneshvar MI, Hill B, Hollis DG, et al. CDC group 0-3: phenotypic characteristics, fatty acid composition, isoprenoid quinone content, and in vitro antimicrobial susceptibilities of an unusual gram-negative bacterium isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1674-1678.
161. Daneshvar MI, Hollis DG, Moss CW, et al. Eugonic oxidizer group 5: an unusual gram-negative nonfermenter isolated from clinical specimens. Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1998:165.

166. Daneshvar MI, Hollis DC, Steigerwalt AG, et al. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. *J Clin Microbiol* 2001;39:1819-1826.
167. Daneshvar MI, Hollis DG, Weyant RS, et al. *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. *J Clin Microbiol* 2003;41:1289-1294.
168. Daniel C-T, Chang S-C, Chen Y-C, et al. In vitro activities of antimicrobial agents, alone and in combinations, against *Burkholderia cepacia* isolated from blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:187-191.
169. Das K, Shah S, Levi MH. Misleading Gram stain from a patient with *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* bacteremia. *Clin Microbiol Newslett* 1997;19:85-88.
170. Dauga C, Gilli M, Vandamme P, et al. *Balneatrix alpica* gen. nov., sp. nov., a bacterium associated with pneumonia and meningitis in a spa therapy centre. *Res Microbiol* 1993;144:35-46.
171. Davis JM, Whipp MJ, Ashhurst-Smith C, et al. Mucoid nitrate-negative *Moraxella nonliquefaciens* from three patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* 2004;42:3888-3890.
172. Daxboeck F, Goerzer E, Apfalter P, et al. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med* 2004;21:1247-1248.
173. De I, Rolston KVI, Han XY. Clinical significance of *Roseomonas* species isolated from catheter and blood samples: analysis of 36 cases in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2004;38:1579-1584.
174. De Baere T, Muylaen A, Everaen E, et al. Bacteremia due to *Moraxella atlantae* in a cancer patient. *J Clin Microbiol* 2002;40:2693-2695.
175. De Baere T, Steyaert S, Wauters G, et al. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/ "thomasi" strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolitica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:547-558.
176. Debois J, Degreef H, Vandepitte J, et al. *Pseudomonas putrefaciens* as a cause of infection in humans. *J Clin Pathol* 1975;28:993-996.
177. Decker CF, Hawkins RE, Simon GL. Infections with *Pseudomonas paucimobilis*. *Clin Infect Dis* 1992;14:783-784.
178. Decker GR, Lavelle JP, Kumar PN, et al. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis* 1991;13:1250-1251.
179. Dees SB, Hollis DG, Weaver RE, et al. Cellular fatty acid composition of *Pseudomonas marginata* and closely associated bacteria. *J Clin Microbiol* 1983;18:1073-1078.
- 179a. Dees SB, Moss CW, Hollis DG, Weaver RE. Chemical characterization of *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium breve*, and *Flavobacterium*-like groups IIIe, IIh, and IIi. *J Clin Microbiol* 1986;23:267-273.
180. Degreef H, Ltebois J, Vandepitte J. *Pseudomonas putrefaciens* as a cause of infection of venous ulcers. *Dermatologica* 1975;151:296-301.
181. De la Fuente J, Albo C, Rodríguez A, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with AIDS. *Thorax* 1994;49:719-720.
182. De Ley J, Segers P, Kersters K, et al. Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, *Alcaligenaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:405-414.
183. Del Mar Ojeda-Vargas M, Suarez-Alonso A, de Los Angeles Perez-Cervantes M, et al. Urinary tract infection associated with *Comamonas acidovorans*. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:443-444.
184. Denton M, Hall MJ, Todd NJ, et al. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:397-398.
185. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:57-80.
186. Deakorn V, Smith MD, Wulthiekanun V, et al. Detection of *B pseudomonas pseudomallei* antigen in urine for the diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:627-633.
187. De Soya A, McDowell A, Archer L, et al. *Burkholderia cepacia* complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001;358:1780-1781.
188. De Soya A, Morris K, McDowell A, et al. Prevalence and clonality of *Burkholderia cepacia* complex genomovars in UK patient with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *Thorax* 2004;59:526-528.
189. Dhawan B, Chaudhry R, Mihra BM, et al. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from a rheumatic heart disease patient with infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2394.
190. Dhawan V K, Rajashekaraiah KR, Metzger WI, et al. Spontaneous bacterial peritonitis due to a group IIk-2 train. *J Clin Microbiol* 1980;11:492-495.
191. Dohson SJ, Franmann PD. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodentificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:550-558.
192. Doelle IF. *Bacterial Metabolism*. Ed. 2. New York: Academic Press, 1975.
193. Doit C, Loukil C, Simon A-M, et al. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in a pediatric hospital due to contamination of lipid emulsion stopper. *J Clin Microbiol* 2004;42:2227-2230.
194. Dominguez EA, Smith TL. Endocarditis due to *Neisseria elongata* subspecies *nitroreducens*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1998;26:1471-1473.
195. Dominguez H, Vogel BF, Gram L, et al. *Shewanella alga* bacteremia in two patients with lower leg ulcer. *Clin Infect Dis* 1996;22:1036-1039.
196. Donay J-L, Mathieu D, Fernandes P, et al. Evaluation of the automated Phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2004;42:1542-1546.
197. Doritke C, Vandamme P, Hinz KH, et al. Isolation of a *Bordetella avium*-like organism from a human specimen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:451-454.
198. Dorman SE, Gill VJ, Gallin JI, et al. *Burkholderia pseudomallei* infection in a Puerto Rican patient with chronic granulomatous disease: case report and review of occurrences in the Americas. *Clin Infect Dis* 1998;26:889-894.
199. Dowda H. Evaluation of two rapid methods for identification of commonly encountered nonfermenting or oxidase-positive, gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 1977;6:605-609.
- 199a. Drancourt M, Bollet C, Raoul D. *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:160-163.
200. Duggan JM, Goldstein SJ, Chenoweth CE, et al. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1996;23:569-576.
201. Dunne WM Jr, Maisch S. Epidemiological investigation of infections due to *Alcaligenes* species in children and patients with cystic fibrosis: use of repetitive-element-sequence polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995;20:836-841.
202. Dunne WM Jr, Tillman J, Murray JC. Recovery of a strain of *Agrobacterium radiobacter* with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia. *J Clin Microbiol* 1993;31:2541-2543.
203. Dworkin MS, Sullivan PS, Buikin SE, et al. *Bordetella bronchiseptica* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1999;28:1095-1099.
204. Ebrigh T JR, Lentino JR, Juni E. Endophthalmitis caused by *Moraxella nonliquefaciens*. *Am J Clin Pathol* 1982;77:362-363.
205. Edmond MB, Riddler SA, Baxter CM, et al. *Agrobacterium radiobacter*: a recently recognized opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 1993;16:388-391.
206. Egbert JE, Feder JM, Rapoza PA, et al. Keratitis associated with *Pseudomonas mesophilica* in a patient taking topical corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 1990;116:445-446.
207. Ekelund B, Johnsen CR, Nielsen PB. Septicemia with *Agrobacterium* species from a permanent vena cephalica catheter: a case report. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1987;95:323-324.
208. Elting LS, Bodey GP. Septicemia due to *Xanthomonas* species and non-aeruginous *Pseudomonas* species: increasing incidence of catheter-related infections. *Medicine (Baltimore)* 1990;69:296-306.
209. Ender PT, Dooley DP, Moore RH. Vascular catheter-related *Comamonas acidovorans* bacteremia managed with preservation of the catheter. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15: 918-920.
210. Engel JM, Alexander FS, Pachucki CT. Bacteremia caused by CDC Group Ve-I in previously healthy patient with granulomatous hepatitis. *J Clin Microbiol* 1987;25: 2023-2024.
211. Esteban J, Martin J, Ortiz A, et al. *Pseudomonas oryzihabitans* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:607-608.
212. Esteban J, Valero-Moratalla ML, Alcazar R, et al. Infections due to *Flavimonas oryzihabitans*: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:797-800.
213. Euzéby J. Validation of publication of new name and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:935-937.
214. Ezzedine H, Mourad M, Van Ossel C, et al. An outbreak of *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in five organ transplant patients. *J Hosp Infect* 1994;27:35-42.
215. Farmer JJ III, Gangarosa RE, Gangarosa EJ. Does *Laribacter hongkongensis* cause diarrhea, or does diarrhoea "cause" *L. hongkongensis*? *Lancet* 2004;363:1923-1924.
216. Farrand SK, van Berkum PB, Oger P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1681-1687.
217. Fass RJ, Barnishan J. In vitro susceptibility of nonfermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. *Rev Infect Dis* 1980;2:841-853.
218. Feigin RD, San Joaquin V, Middelkamp JN. Septic arthritis due to *Moraxella osloensis*. *J Pediatr* 1969;75:116-117.
219. Felegie TP, Yu VL, Ruman LW, et al. Susceptibility of *Pseudomonas maltophilia* to antimicrobial agents, singly and in combination. *Antimicrob Agents Chemoter* 1979;16:833-837.
220. Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patient attending a single cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2002;40:3793-3797.
221. Finkmann W, Altendorf K, Stackebrandt E, et al. Characterization of *N₂O*-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitrifiducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broeghebrensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:273-282.
222. Flournoy DJ, Petrone RL, Voith DW. A pseudo-outbreak of *Methylobacterium mesophilica* isolated from patients undergoing bronchoscopy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:240-243.
223. Fraser SL, Jorgensen IH. Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:2738-2741.
224. Freney J, Gruel LD, Bornstein N, et al. Septicemia caused by *Agrobacterium* sp. *J Clin Microbiol* 1985;22:683-685.
225. Freney J, Hansen W, Etienne J, et al. Postoperative infant septicemia caused by *Pseudomonas luteola* (CDC group Ve-1) and *Pseudomonas oryzihabitans* (CDC group Ve-2). *J Clin Microbiol* 1988;26:1241-1243.
226. Freney J, Hansen W, Ploton C, et al. Septicemia caused by *Sphingobacterium multivorum*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1126-1128.
227. Friedman ND, Korman TM, Fairley CK, et al. Bacteraemia due to *Stenotrophomonas maltophilia*: an analysis of 45 episodes. *J Infect* 2002;45:47-53.
228. Fujita J, Hata Y, Irino S. Respiratory infection caused by *Flavobacterium meningosepticum*. *Lancet* 1990;335:544.
229. Funke G, Frodl R, Sommer H. First comprehensively documented case of *Paracoccus yeei* infection in a human. *J Clin Microbiol* 2004;42:3366-3368.
230. Funke G, Funke-Kissling P. Evaluation of the new Vitek 2 card for identification of clinically relevant gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 2004;42:4067-4071.
231. Funke G, Hess T, von Graevenitz A, et al. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 1996;34: 966-969.
232. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Benito N, et al. *Bordetella hinzii*, a "new" opportunistic pathogen to think about. *J Infect* 2000;40:298-299.

233. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32(Suppl 2):2001:S146-S155.
234. Garcia San Miguel L, Quereda C, Martinez M, et al. *Bordetella bronchiseptica* cavity pneumonia in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:675-6.
235. Gancia-Valdes E, Castillo MM, Bannasar A, et al. Polyphasic characterization of *Pseudomonas stutzeri* CLN100 which simultaneously degrades chloro- and methylobacterium: a new genomovar within the species. *Syst Appl Microbiol* 2003;26:390-403.
236. Garner J, Briant RH. Osteomyelitis caused by a bacterium known as M-6. *J Infect* 1986;13:298-300.
237. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the Prokaryote. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. 2. Release 5.0., May 2004, New York: Springer-Verlag, 2004.
238. George JJ, Cunha BA. *Pseudomonas stutzeri* synthetic vascular graft infection. *Heart Lung* 1990;19:203-205.
239. George RM, Cochran CP, Wheeler WE. Epidemic meningitis of the newborn caused by flavobacteria. *Am J Dis Child* 1961;101:296-304.
240. Gerner-Smidt P, Keiser-Nielsen H, Dorsch M, et al. *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. *Microbiology* 1994;140:1787-1797.
241. Ghosh JK, Tranter J. *Bordetella bronchiseptica* infections in man: review and case report. *J Clin Pathol* 1979;32:546-548.
242. Giladi J, Borer A, Peled N, et al. Hospital-acquired *Brevundimonas vesicularis* septicemia following open-heart surgery: case report and literature review. *Scand J Infect Dis* 2000;32:90-91.
243. Gilardi GL. Infrequently encountered *Pseudomonas* species causing infection in humans. *Ann Intern Med* 1972;77:211-215.
244. Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978.
245. Gilardi GL. Identification of *Pseudomonas* and related bacteria. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978:15-44.
246. Gilardi GL. Identification of miscellaneous glucose nonfermenting gram-negative bacteria. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978:45-55.
247. Gilardi GL. *Nonfermentative Gram-Negative Rods: Laboratory Identification and Clinical Aspects*. New York: Marcel Dekker, 1985.
248. Gilardi GL. Cultural and biochemical aspects for identification of glucose-nonfermenting gram-negative rods. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978:17-84.
249. Gilardi GL. Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods. New York: North General Hospital, 1990.
250. Gilardi GL. *Pseudomonas* and related genera. In: Balows A, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 5. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991:429-441.
251. Gilardi GL, Faur YC. *Pseudomonas mesophilica* and an unnamed taxon, clinical isolates of pink-pigmented oxidative bacteria. *J Clin Microbiol* 1984;20:626-629.
252. Gilardi GL, Hirschl S, Mandel M. Characteristics of yellow-pigmented nonfermentative bacilli (groups Ve-1 and Ve-2) encountered in clinical bacteriology. *J Clin Microbiol* 1975;13:384-389.
253. Gilardi GL, Mankin HJ. Infection due to *Pseudomonas stutzeri*. *NY State J Med* 1973;71:2789-2791.
254. Gilchrist MJR, Kraft JA, Hammond JG, et al. Detection of *Pseudomonas mesophilica* as a source of nosocomial infections in a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 1986;23:1052-1055.
255. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:35-51.
256. Gilligan PH, Gage PA, Bradshaw LM, et al. Isolation medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1985;22:5-8.
257. Gilligan PH, Lum G, Vandamme PAR, Whittier S. *Burkholderia Stenotrophomonas, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoraea, and Acidovorax*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 4. Washington DC: ASM Press, 2003:729-748.
258. Gills M, Van TV, Bardin R, et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for *N₂*-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:274-289.
259. Giv GA. Ocular infection caused by *Psychrobacter immobilis* acquired in the hospital. *J Clin Microbiol* 1990;28:400-401.
260. Gorman G, Connor PJ, Williams RF, et al. Controlled study of *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1993;67:192-195.
261. Glew RH, Moellering RC, Kunz LJ. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Flavobacterium vagincola*): Clinical and laboratory studies. *Medicine* 1977;56:79-97.
262. Goldmann DA, Klinger JD. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 1986;108:806-812.
263. Goldstein R, Sun L, Jiang RZ, et al. Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Bacteriol* 1995;177:1029-1052.
264. Gomez L, Graziutti M, Sumoza D, et al. Bacterial pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 1998;26:1002-1003.
265. Gomez-Cerezo J, Suarez I, Rios JJ, et al. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:360-363.
266. Goodnow RA. Biology of *B. bronchiseptica*. *Microbiol Rev* 1980;44:722-738.
267. Goodman RK. Recrudescence pulmonary melioidosis: a case report involving the so-called "Vietnamese time bomb." *Indiana Med* 1987;80:247-249.
268. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993;342:15-19.
269. Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996;45:395-407.
270. Graber CD, Jervey LP, Ostrander WE, et al. Endocarditis due to a lanthan, unclassified gram-negative bacterium (group IVd). *Am J Clin Pathol* 1968;49:220-223.
271. Graham DR, Band JD, Thornberry C, et al. Infections caused by *Moraxella*, *Moraxella urethralis*, *Moraxella*-like groups, M-5 and M-6 and *Kingella kingae* in the United States, 1953-1980. *Rev Infect Dis* 1990;12:423-431.
272. Gransden WR, Eykyn SJ. Seven cases of bacteremia due to *Ochrobactrum anthropi*. *Clin Infect Dis* 1992;15:1068-1069.
273. Grant PE, Brenner DJ, Steigerwal AG, et al. *Neisseria elongata* Subsp. nov. nitroreducens subsp. nov., formerly CDC group M-6, a gram-negative bacterium associated with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2591-2596.
274. Grave M, Robin T, Chipman AM, et al. Four additional cases of *Burkholderia gladioli* infection with microbiological correlates and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:838-842.
275. Green BT, Green K, Nolan PE. *Myroides odoratus* cellulitis and bacteremia: case report and review. *Scand J Infect Dis* 2001;33:932-934.
276. Green BT, Nolan PE. Cellulitis and bacteraemia due to *Chryseobacterium indologenes*. *J Infect* 2001;42:219-220.
277. Green PN, Bousfield JJ. Emendation of *Methylobacterium* Patt. Cole, and Hanson 1976: *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *Int. J Syst Bacteriol* 1983;33:875-877.
278. Green PN, Bousfield JJ, Hood D. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zamianii* sp. nov., and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J Syst Bacteriol* 1988;38:124-127.
279. Green RN, Tuffnell PG. Laboratory acquired melioidosis. *Am J Med* 1968;44:599-605.
280. Grieg JR, Gunda SS, Kwan JTC. *Bordetella holmesii* bacteraemia in a individual on haemodialysis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:716-717.
281. Griffin BW III, McHaffey MA, Cook EC, et al. Relationship between performance in three of the Centers for Disease Control microbiology proficiency testing programs and the number of actual patient specimens tested by participating laboratories. *J Clin Microbiol* 1986;23:246-250.
282. Grimault E, Glerant JC, Aubry P, et al. [Uncommon site of *Bergeyella zoohelcum*: apropos of a case]. *Rev Pneumol Clin* 1996;52:387-389.
283. Gutierrez Rodero F, Masia MM, Cortes J, et al. Endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia* case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;23:1261-1265.
284. Guttigoli A, Zaman MM. Bacteremia and possible endocarditis caused by *Moraxella phenylpyruica*. *South Med J* 2000;93:708-709.
285. Haddow LJ, Mulgrew C, Ansari A, et al. *Neisseria elongata* endocarditis: case report and literature review. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:426-430.
286. Haditsch M, Binder L, Tschuschenthaler G, et al. Bacteremia caused by *Ochrobactrum anthropi* in an immunocompromised child. *Infection* 1994;22:291-292.
287. Hamill RJ, Houston ED, Georgiour PR, et al. An outbreak of *Burkholderia (formerly Pseudomonas) cepacia* respiratory tract colonization and infection associated with nebulized albuterol therapy. *Ann Intern Med* 1995;122:762-766.
288. Hammerberg O, Bialkowska-Hobrzanska H, Gopaul D. Isolation of *Agrobacterium radiobacter* from central venous catheter. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:450-455.
289. Han XY, Pham AS, Tarrand JJ, et al. Bacteriologic characterization of 36 strains of *Roseomonas* species and proposal of *Roseomonas mucosa* sp. nov. and *Roseomonas gilardii* subsp. rosea subsp. nov. *Am J Clin Pathol* 2003;120:256-264.
290. Han XY, Tarrand JJ. *Moraxella oloensis* blood and catheter infections during anti-cancer chemotherapy: clinical and microbiologic studies of 10 cases. *Am J Clin Pathol* 2004;121:581-587.
291. Hansen W, Glupczynski Y, Group IV c-2 associated peritonitis. *Clin Microbiol Newsllett* 1985;7:43.
292. Harrington BJ, Letter to the Editors. *Clin Microbiol Newsllett* 1997;19:191.
293. Harrington SP, Perlino CA. *Flavobacterium meningosepticum* sepsis: disease due to bacteria with unusual antibiotic susceptibility. *Southern Med J* 1981;74:764-766.
294. Harrison GAI, Morris R, Holmes B, et al. Human infections with strains of *Agrobacterium*. *J Hosp Infect* 1990;16:383-388.
295. Hauben L, Vauterin L, Moore ERB, et al. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1749-1760.
296. Hawley HB, Gump DW. Vancomycin therapy of bacterial meningitis. *Am J Dis Child* 1973;126:261-264.
297. Heagney MA. An unusual case bacterial meningitis caused by *Burkholderia pickettii*. *Clin Microbiol Newsllett* 1998;20:102-103.
298. Heard S, Lawrence S, Holmes B, et al. A pseudo-outbreak of *Pseudomonas* on a special care baby unit. *J Hosp Infect* 1990;16:59-65.
299. Heimbrook ME, Wang WLL, Campbell C. Staining bacterial flagella easily. *J Clin Microbiol* 1989;27:2612-2615.
300. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, et al. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 1997;35:614-619.
301. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, et al. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:1004-1007.
302. Henry DA, Mahenthalingam E, Vandamme P, et al. Phenotypic methods for determining genomovar status of *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001;39:1073-1078.
303. Higgin PG, Wispelinghoff H, Stetnik D, et al. In vitro activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β -lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents and Chemother* 2004;48:1586-1592.

304. Hiraishi A, Furuhata K, Matsumoto A, et al. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2099-107.
305. Hirsh BE, Wong B, Kiehn TE, et al. *Flavobacterium meningosepticum* bacteremia in an adult with acute leukemia: use of rifampin to clear persistent infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:65-69.
306. Hoare S, Cant AJ. Chronic granulomatous disease presenting as severe sepsis due to *Burkholderia gladioli*. *Clin Infect Dis* 1996;23:411.
307. Hobson R, Gould I, Govan J. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:908-911.
308. Hoffert L, Votava H, Blazejevic DJ. Comparison of three methods for identifying nonfermenting gram-negative rods. *Can J Microbiol* 1978;24:1140-1144.
309. Hofstad T, Hope O, Falsen E. Septicaemia with *Neisseria elongate* spp. *nitroreducens* in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Scand J Infect Dis* 1998;30:200-201.
310. Hohl P, Frei R, Aubry P. In vitro susceptibility of 33 clinical case isolates of *Xanthomonas maltophilia*. Inconsistent correlation of agar dilution and of disk diffusion test results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991;14:447-450.
311. Hollis DG, Daneshvar MI, Moss CW, et al. Phenotypic characteristics, fatty acid composition, and isoprenoid quinone content of CDC group Iig bacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:762-764.
312. Hollis DG, Moss CW, Daneshvar MI, Meadows L, et al. Characterization of Centers for Disease Control group NO-1, a fastidious, nonoxidative, gram-negative organism associated with dog and cat bites. *J Clin Microbiol* 1993;31:746-748.
313. Hollis DG, Moss CW, Daneshvar MI, Wallace-Shewnamer PL. CDC group Iic: phenotypic characteristics, fatty acid composition, and isoprenoid quinone content. *J Clin Microbiol* 1996;14:2322-2324.
314. Hollis DG, Weaver RE, Moss CW, et al. Chemical and cultural characterization of CDC group WO-1, a weakly oxidative gram-negative group of organisms isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 1992;30:291-295.
315. Holmes B, Costas M, Ganner M, et al. Evaluation of Biolog System for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. *J Clin Microbiol* 1994;2:1970-1975.
316. Holmes B, Costas M, Wood AC, Kersters K. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of "Achromobacter" group B, E and F strains from human blood. *J Appl Bacteriol* 1990;68:495-504.
317. Holmes B, Costas M, Wood AC, Kersters K. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of "Achromobacter" group B, E and F strains from human blood. *J Appl Bacteriol* 1990;68:495-504.
318. Holmes B, Costas M, Wood AC, Owen RJ, et al. Differentiation of Achromobacter-like strains from human blood by DNA restriction endonuclease digest and ribosomal RNA gene probe patterns. *Epidemiol Infect* 1990;105:541-551.
319. Holmes B, Dawson CA. Numerical taxonomic studies on *Achromobacter* isolates from clinical material. In: Leclerc H, ed. *Gram Negative Bacteria of Medical and Public Health Importance: Taxonomy-Identification-Applications*. Paris, Les Editions INSERM, 1983:331-341.
320. Holmes B, Dowling J, Lapage SP. Identification of gram-negative nonfermenters and oxidase-positive fermenters by the Oxi/Ferm tube. *J Clin Pathol* 1979;32:78-85.
321. Holmes B, Lewis R, Trevett A. Septicaemia due to *Achromobacter* group B: a report of two cases. *Med Microbiol Lett* 1992;1:177-184.
322. Holmes B, Moss CW, Daneshvar MI. Cellular fatty acid compositions of "Achromobacter" groups B and E." *J Clin Microbiol* 1993;31:1007-1008.
323. Holme B, Owen RJ, Evans A, et al. *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *Int J Syst Bacteriol* 1977;27:133-146.
324. Holmes B, Owen RJ, Hollis DG. *Flavobacterium spiritivorum*, a new species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:157-165.
325. Holmes B, Owen RJ, McMeekin TA. Genus *Flavobacterium*. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:353-361.
326. Holmes B, Owen RJ, Weaver RE. *Flavobacterium multivorum*, a new species isolated from human clinical specimens and previously known as group Iik, biotype 2. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:21-34.
327. Holmes B, Panning CA, Dawson CA. A probability matrix for the identification of gram-negative, aerobic, non-fermentative bacteria that grow on nutrient agar. *J Gen Microbiol* 1986;132:1827-1842.
328. Holmes B, Popoff M, Kiredjian M, et al. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:406-416.
329. Holmes B, Snell JIS, Lapage SP. *Flavobacterium odoratum*: a species resistant to a wide range of antimicrobial agents. *J Clin Pathol* 1979;32:73-77.
330. Holmes B, Steigerwalt AG, Weaver RE, Brenner DJ. *Weeksellia virosa* gen. nov., sp. nov. (formerly group Iif), found in human clinical specimens. *Syst Appl Microbiol* 1986;8:185-190.
331. Holmes B, Steigerwalt AG, Weaver RE, Brenner DJ. *Weeksellia zoohelcum* sp. nov. (formerly group Iij), from human clinical specimens. *Syst Appl Microbiol* 1986;8:191-196.
332. Holmes B, Steigerwalt AG, Weaver RE, Brenner DJ. *Chryseomonas luteola* comb. nov. and *Flavimonas oryziabitis* gen. nov., comb. nov., *Pseudomonas*-like species from human clinical specimens and formerly known, respectively, as groups Ve-1 and Ve-2. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:245-250.
333. Holmes B, Weaver RE, Steigerwalt AG, et al. A taxonomic study of *Flavobacterium spiritivorum* and *Sphingobacterium mizutae*: proposal of *Flavobacterium yabuuchi* sp. nov. and *Flavobacterium mizutaii* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:348-353.
334. Holt HM, Sogaard P, Gahrn-Hansen B. Ear infections with *Shewanella alga*: a bacteriologic, clinical and epidemiologic study of 67 cases. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:329-334.
335. Holton J. A note on the preparation and use of a selective and differential medium for the isolation of the *Acinetobacter* spp. from clinical sources. *J Appl Bacteriol* 1983;66:24-26.
336. Hombrouck-Alet C, Poilane I, Janoir-Jouveshomme C, et al. Utilization of 16S ribosomal DNA sequencing for diagnosis of septicemia due to *Neisseria elongate* subsp. glycolytica in a neutropenic patient. *J Clin Microbiol* 2003;41:3436-3437.
337. Hornei B, Luneberg E, Schmidt-Rotte H, et al. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *J Clin Microbiol* 1999;37:248-250.
338. Horowitz H, Gilroy S, Feinstein S, et al. Endocarditis associated with *Comamonas acidovorans*. *J Clin Microbiol* 1990;28:143-145.
339. Howard K, Inglis TJJ. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3312-3316.
340. Hueh P-R, Chang J-C, Teng L-J, et al. Comparison of Etest and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Flavobacterium* isolates. *J Clin Microbiol* 1997;35:1021-1023.
341. Hueh P-R, Hsue T-R, Wu J-J, et al. *Flavobacterium indologenes* bacteremia: clinical and microbiological characteristics. *Clin Infect Dis* 1996;23:550-555.
342. Hsueh P-R, Teng L-J, Chen C-Y, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002;8:827-832.
343. Hsueh P-R, Teng L-J, Ho S-W, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. *J Clin Microbiol* 1996;34:1908-1913.
344. Hsueh P-R, Teng L-J, Lee L-N, et al. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg Infect Dis* 2001;7:428-433.
345. Hsueh P-R, Teng L-J, Yang P-C, et al. Nosocomial infections caused by *Sphingomonas paucimobilis*: clinical features and microbiological characteristics. *Clin Infect Dis* 1998;26:676-681.
346. Hsueh P-R, Teng L-J, Yang P-C, et al. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:568-574.
347. Hsueh P-R, Wu J-J, Hsue T-R, et al. Bacteremic necrotizing fasciitis due to *Flavobacterium odoratum*. *Clin Infect Dis* 1995;21:1337-1338.
348. Hubert B, De Mahenge A, Grimont F, et al. An outbreak of pneumonia and meningitis caused by a previously undescribed gram-negative bacterium in a hot spring spa. *Epidemiol Infect* 1991;107:373-381.
349. Hudson MJ, Hollis W, Weaver RE, et al. Relationship of CDC group EO-2 and *Psychrobacter immobilis*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1907-1910.
350. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1953;66:24-26.
351. Hutchinson GR, Parker S, Pryor JA, et al. Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:584-587.
352. Ibrahim A, Gerner-Smidt P, Liesack W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:837-841.
353. Igra-Siegmán Y, Chmel H, Cobbs C. Clinical and laboratory characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* infection. *J Clin Microbiol* 1980;11:141-145.
354. Impen HL, Joho KL, Alcidi DV. Endocarditis due to *Neisseria elongate* subspecies *nitroreducens*. *Clin Infect Dis* 1995;20:1431-1432.
355. Isenberg HD, Sampson-Scherer J. Clinical laboratory evaluation of a system approach to the recognition of nonfermentative or oxidase-producing gram-negative, rod-shaped bacteria. *J Clin Microbiol* 1977;5:336-340.
356. Isles A, MacLuskey I, Corey M, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 1984;104:206-210.
357. Iwata M, Tateda K, Matsumoto T, et al. Primary *Shewanella* alga septicemia in a patient on hemodialysis. *J Clin Microbiol* 1999;37:2104-2105.
358. Janknecht P, Schneider CM, Ness T. Outbreak of *Empedobacter brevis* endophthalmitis after cataract extraction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:291-295.
359. Jannes G, Vaneechoute M, Lanno M, et al. Polyphasic taxonomy leading to the proposal of *Moraxella canis* sp. nov. for *Moraxella catarrhalis*-like strains. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:438-449.
360. Jawad A, Hawkey PM, Herilage J, et al. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* 1994;32:2353-2358.
361. Jellison TK, McKinnon PS, Rybak MJ. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy* 2001;21:142-148.
362. Jelveh N, Cunha BA. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia. *Herat Lung* 1999;28:145-146.
363. Jenks PJ, Shaw EJ. Recurrent septicemia due to "Achromobacter Group B." *J Infect* 1997;34:143-145.
364. Jenney AW, Lum G, Fisher DA, et al. Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:109-113.
365. Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Becerra B, et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin Infect Dis* 1997;24:932-935.
366. Jiménez-Mejías ME, Pichardo-Guerrero C, Márquez-Rivas FJ, et al. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:212-214.
367. Johansen HK, Kjeldsen K, Høiby N. *Pseudomonas mendocina* as a cause of chronic infective endocarditis in a patient with situs inversus. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:650-652.
368. Johnson DW, Lum G, Nimmo G, et al. *Moraxella nonliquefaciens* septic arthritis in a patient undergoing hemodialysis. *Clin Infect Dis* 1995;21:1039-1040.

- James AM, Dodd ME, Wehh AK. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *Eur Respir J* 2001;17:295-301.
- James AM, Stanbridge TN, Isklaka BJ, et al. *Burkholderia gladioli*: recurrent abscesses in a patient with cystic fibrosis. *J Infect* 2001;42:69-71.
- Jorgensen IM, Johansen HK, Frederiksen B, et al. Epidemic spread of *Pandora* *agrippa*, a new pathogen causing severe lung disease in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2003;16:439-446.
- Kaiser RM, Garman RL, Bruce MG, et al. Clinical significance and epidemiology of NO-1, an unusual bacterium associated with dog and cat bites. *Emerg Infect Dis* 2002;8:171-174.
- Kämpfer P. Grouping of *Acinetobacter genomic* species by cellular fatty acid composition. *Med Microbiol Lett* 1993;2:394-400.
- Kan SS, Tapon V, Davis RD, et al. Infections in patients with cystic fibrosis following lung transplantation. *Chest* 1997;112:924-930.
- Kaplan LJ, Flaherty J. Centers for Disease Control Group M-6: a cause of destructive endocarditis. *J Infect Dis* 1991;164:822-823.
- Karstein I, Grundmann H, Hauer T, et al. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter* in an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients. *J Hosp Infect* 2002;5:27-30.
- Karpas F, Malmberg AS, Alfredsson H, et al. Bacterial colonization with *Stenotrophomonas maltophilia*: a retrospective study in a cystic fibrosis patient population. *Infection* 1994;22:258-263.
- Kasir MM, Chavez JF, Limaye AP, et al. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:789-794.
- Kay SE, Clark RA, While KL, et al. Recurrent *Achromobacter piechaudii* bacteremia in a patient with hematological malignancy. *J Clin Microbiol* 2001;39:808-810.
- Kay KM, Macone A, Kazanjian PH. Catheter infection caused by *Methylobacterium* in immunocompromised hosts: report of three cases and review of the literature. *CID* 1992;14:1010-1014.
- Kay WE, Markum AC, Samadpour M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by commercial piercing of upper ear cartilage. *JAMA* 2004;91:981-985.
- Kendall T, Cifci E, Ince E, et al. *Ralstonia pickettii* outbreak associated with contaminated distilled water used for respiratory care in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004;56:77-78.
- Kerr WJ, Oethinger M, Kaufhold A, et al. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia: report of four cases and short review. *Infection* 1993;21:306-310.
- Kerr KG, Denton M, Todd NJ, et al. A novel selective culture medium for the isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:607-612.
- Krieg K, De Ley J, Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942, 359^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:244-254.
- Krieg K, De Ley J, Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:pp 361-373.
- Krieg K, Hin K-H, Hertle A, et al. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:56-70.
- Krueger A, Weill F-X, Poilane I, et al. Septic shock caused by *Ochrobactrum anthropi* in an otherwise healthy host. *J Clin Microbiol* 2003;41:1339-1341.
- Kuehn RF, Amow PM, Highsmith AK, et al. *Pseudomonas fluorescens* bacteremia in blood transfusion. *Am J Med* 1984;76:62-68.
- Kuehn SU, Gordon SM, Stillwell PC, et al. Empyema and bloodstream infection caused by *Burkholderia gladioli* in a patient with cystic fibrosis after lung transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:637-639.
- Kupfer N, Eiting L, Wong E, et al. Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. *Rev Infect Dis* 1990;12:997-1003.
- Kuske S, Janda JM. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. *J Clin Microbiol* 1998;36:783-787.
- Kuschi I, Aro T, Oiva T. Surgical treatment of fungating lesion of foot due to *Shewanella phenylpyruvica*. Case report. *Plast Reconstr Surg* 1978;61:911-916.
- Kyriakou H, Cooper RA, Welty-Wolf KE, et al. *Pseudomonas putrefaciens* bacteremia. *Infect Dis* 1989;11:97-104.
- Kyriakou KK, Kim MK, Lim JH, et al. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1287-1293.
- Kyriakou A, Holmes B, Phillips I, et al. A taxonomic study of clinical isolate of *Pseudomonas pickettii*, 'P. thomasi' and 'group Ivd' bacteria. *J Gen Microbiol* 1979;114:137-147.
- Kyriakou EO. Studies of a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infant. *Am J Clin Pathol* 1959;31:241-247.
- Kyriakou EO. The Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Bacteria. Atlanta: Centers for Disease Control, 1964.
- Kyriakou EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 1954;44:301-307.
- Kyriakou M, Holmes B, Kersters K, et al. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:282-287.
- Kyriakou S, Over U, Babacan F, et al. Disseminated *Flavimonas oryzae* infection in a diabetic patient who presented with suspected multiple splenic abscesses. *Clin Infect Dis* 1997;25:324-325.
- Kyriakou MA, Buggy BP, Forbes BA. Bacteremia caused by *Achromobacter* species in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol* 1984;19:947-948.
- Kyriakou RA, Brown GL, Blair EB, et al. Melioidosis: serologic studies on U.S. military personnel returning from Southeast Asia. *Milit Med* 1971;136:694-698.
- Kyriakou DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 8. Washington DC: ASM Press, 2003:719-728.
- Kiska DL, Kerr A, Jones MC, et al. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:886-891.
- Kitch T, Jacobs MR, Appelbaum PC. Evaluation of the 4-hour Rapid NF Plus method for identification of 345 gram-negative non-fermentative rods. *J Clin Microbiol* 1992;30:1267-1270.
- Kivinen PK, Lahtinen M-R, Ruotsalainen E, et al. *Bergeyella zoohelcum* septicemia of a patient suffering from severe skin infection. *Acta Derm Venereol* 2003;83:74-75.
- Klausner JD, Zukerman C, Limaye AP, et al. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia among patients undergoing bone marrow transplantation: association with faulty replacement handwashing soap. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:756-758.
- Knuth BD, Owen MR, Latorraca R. Occurrence of an unclassified organism group Ivd. *Am J Med Technol* 1969;35:227-232.
- Kociuba K, Munro R, Daley D. M-6 endocarditis: report of an Australian case. *Pathology* 1993;25:310-312.
- Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, Dowell VR. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J Clin Microbiol* 1982;16:948-952.
- Koestgen EK, Larone DH, Pavletich KJ. Comparison of the Oxi/Ferm and N/F systems for identification of infrequently encountered nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacilli. *J Clin Microbiol* 1982;15:384-390.
- Koh TH, NG LSY, Ho JLP, et al. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1809.
- Koide M, Miyata T, Nukina M, et al. A strain of *Pseudomonas vesicularis* isolated from shower hose which supports the multiplication of *Legionella*. *Kansenshogaku Zasshi* 1989;63:1160-1164.
- Kosako Y, Yabuuchi E, Naka T, et al. Proposal of *Sphingomonadaceae* fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov et al. 1994, *Porphyrobacter* Fuerst et al. 1993, *Zymomonas* Kuyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov et al. 1997, with the type genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990. *Microbiol Immunol* 2000;44:563-575.
- Kostman JR, Solomon F, Fekete T. Infections with *Chryseomonas luteola* (CDC Group Ve-1) and *Flavimonas oryzae* (CDC Group Ve-2) in neurosurgical patients. *Rev Infect Dis* 1991;13:233-236.
- Labarca JA, Leber AL, Kern V L, et al. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogeneic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. *Clin Infect Dis* 2000;30:195-197.
- Labarca JA, Pegue DA, Wagar EA, et al. Something's rotten: a nosocomial outbreak of malodorous *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1998;26:1440-1446.
- Labarca JA, Trick WE, Peterson CL, et al. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. *Clin Infect Dis* 1999;29:1281-1286.
- Lacy DE, Spencer DA, Goldstein A, et al. Chronic granulomatous disease presenting in childhood with *Pseudomonas cepacia* septicemia. *J Infect* 1993;27:301-304.
- Laffineur K, Janssens M, Charlier J, et al. Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 2002;40:1085-1087.
- Lai C-C, Teng L-J, Hsueh P-R, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:149-153.
- Lambert WC, Pathan AK, Imaeda T, et al. Culture of *Vibrio* extorquens from severe, chronic skin ulcers in a Puerto Rican woman. *J Am Acad Dermatol* 1983;9:262-268.
- Lampe AS, van der Reijden TJK. Evaluation of commercial test systems for the identification of nonfermenters. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:301-305.
- La Scola B, Birtles RJ, Mallet M-N, et al. *Messinia timonea* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *J Clin Microbiol* 1998;36:2847-2852.
- Lau SKP, Woo PCY, Hui W-T, et al. Use of cefoperazone MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4839-4841.
- Laukeland H, Bergh K, Bevanger L. Posttraumatic endophthalmitis caused by *Moraxella nonliquefaciens*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2668-2670.
- Lazarus HM, Magalhaes-Silverman M, Fox RM, et al. Contamination during in vitro processing of bone marrow for transplantation: clinical significance. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:241-246.
- Lechner A, Bruckner DA. *Oligella ureolytica* in blood culture: contaminant or infection? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:142-143.
- Leelarasamee A, Bovornkitti S. Melioidosis: review and update. *Rev Infect Dis* 1989;11:413-425.
- Leifson E. Atlas of Bacterial Flagellation. New York: Academic Press, 1960.
- Lejbkowitz F, Belavsky L, Kudinsky R, et al. Bacteraemia and sinusitis due to *Flavimonas oryzae* infection. *Scand J Infect Dis* 2003;35:411-414.
- Lema I, Gomez-Torreiro M, Rodriguez-Ares MT. *Comamonas acidovorans* keratitis in a hydrogel contact lens wearer. *CLAO J* 2001;27:55-56.
- Le Moal G, Paccalin M, Breux JP, et al. Central venous catheter-related infection due to *Comamonas testosteroni* in a woman with breast cancer. *Scand J Infect Dis* 2001;33:627-628.
- Lertpatanasuwan N, Sermsri K, Petkaseam A, et al. Arabinose-positive *Burkholderia pseudomallei* infection in humans: case report. *Clin Infect Dis* 1999;28:927-928.
- Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for subcutaneous combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:144-153.
- Levin AS, Barone A, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999;28:1008-1011.
- Levy P-Y, Tessier JL. Anthrithis due to *Shewanella putrefaciens*. *Clin Infect Dis* 1998;26:536.
- Lewin LO, Byard PJ, Davis PB. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of patients with cystic fibrosis. *J Clin Epidemiol* 1990;43:125-131.

438. Lewis L, Stock F, Williams D, et al. Infections with *Roseomonas gilardii* and review of characteristics used for biochemical identification and molecular typing. *Am J Clin Pathol* 1997;108:210-216.
439. Li X, Dorsch M, Del Dot T, et al. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Bacteriol* 1993;74:324-329.
440. Lin P-Y, Chu C, Su L-H, et al. Clinical and microbiological analysis of blood-stream infections caused by *Chryseobacterium meningosepticum* in nonneonatal patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:3353-3355.
441. Lin R-D, Hsueh P-R, Chang J-C, et al. *Flavimonas oryihabitans* bacteremia: clinical features and microbiological characteristics of isolates. *Clin Infect Dis* 1997;24:867-873.
442. Linde H-J, Hahn J, Holler E, et al. Septicemia due to *Acinetobacter junii*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2696-2697.
443. Lindquist D, Murrill D, Burran WP, et al. Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-like isolates from human patients, with an emended description of the species. *J Clin Microbiol* 2003;41:192-196.
444. Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, et al. *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:813-815.
- 444a. Lindsay JA, Riley TV. Susceptibility of de ferrioxamine: a new test for the identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 1991;35:45-48.
445. LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. *Clin Chest Med* 1998;19:473-486.
446. LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, et al. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1990;336:1094-1096.
447. LiPuma JJ, Marks-Austin KA, Holsclaw DS Jr, et al. Inapparent transmission of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* among patients with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:716-719.
448. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, et al. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:92-96.
449. List Editor, IJSEM. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 2, of the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:795-796.
450. Liu J-W, Wu J-J, Chen H-M, et al. *Methylobacterium mesophilicum* synovitis in an alcoholic. *Clin Infect Dis* 1997;24:1008-1009.
451. Livermore, DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-640.
452. Lloyd-Puryear M, Wallace D, Baldwin T, et al. Meningitis caused by *Psychrobacter immobilis* in an infant. *J Clin Microbiol* 1991;29:2041-2042.
453. Lobue TD, Deutsch TA, Stein RM. *Moraxella nonliquefaciens* endophthalmitis after trabeculectomy. *Am J Ophthalmol* 1985;99:343-345.
454. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, et al. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS48/ PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:467.
455. Lopez-Menchero R, Siguenza F, Caridad A, et al. Peritonitis due to *Comamonas acidovorans* in a CAPD patient. *Pent Dial Int* 1998;18:445-446.
456. Lorenzo-Pajuelo B, Villanueva JL, Rodriguez-Cuesta J, et al. Cavitary pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of penactin and other major antigens. *J Clin Microbiol* 2002;40:3146-3154.
457. Lonholaro O, Fagon J-Y, Hoi AB, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995;20:790-796.
458. Loubinoux J, Mihaila-Amrouche L, Le Fieche A, et al. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1337-1338.
459. Loulik C, Saizou C, Doit C, et al. Epidemiologic investigation of *Burkholderia cepacia* acquisition in two pediatric intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:707-710.
460. Lowe P, Engler C, Norton R. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 2002;40:4625-4627.
461. Lu PC, Chan JC. *Flavobacterium indologenes* keratitis. *Ophthalmologica* 1997;211:98-100.
462. Lucas KG, Kiehn TE, Soback KA, et al. Sepsis caused by *Flavimonas oryihabitans*. *Medicine (Baltimore)* 1994;73:209-214.
463. Lyons RW. Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* and *Moraxella*. In: Gilardi GL, ed. *Nonfermentative Gram-Negative Rods: Laboratory Identification and Clinical Aspects*. New York: Marcel Dekker, 1985:159-179.
464. Macdonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* 1985;6:171-182.
465. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Ed. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
466. MacFarlane L, Oppenheim BA, Lorrigan P. Septicaemia and septic arthritis due to *Pseudomonas putida* in a neutropenic patient. *J Infect* 1991;23:346-347.
467. Madazero EG, Bassaris HP, Quintiliani R. *Flavobacterium meningosepticum* meningitis in a newborn infant. Treatment with intraventricular erythromycin. *J Pediatr* 1974;85:675-676.
468. Madhavan T. Septic arthritis with *Pseudomonas stutzeri*. *Ann Intern Med* 1974;80:670-671.
469. Madhavan T, Fisher EJ, Cox F, et al. *Pseudomonas putida* and septic arthritis. *Ann Intern Med* 1973;78:971-972.
470. Mahenthalingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2002;51:533-538.
471. Mahenthalingam E, Simpson DA, Speen DP. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:808-816.
472. Mahenthalingam E, Vandamme P, Campbell ME, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 2001;33:1469-1475.
473. Mahmood MS, Sarwari AR, Khan MA, et al. Infective endocarditis and septic embolization with *Ochrobactrum anthropi*: case report and review of literature. *J Infect* 2000;40:287-290.
474. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Calza L, et al. *Ochrobactrum anthropi* as an agent of nosocomial septicemia in the setting of AIDS. *Clin Infect Dis* 1999;28:692-694.
475. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Mastroianni A, et al. Emerging gram-negative pathogens in the immunocompromised host: *Agrobacterium radiobacter* septicemia during HIV disease. *Microbiologica* 1999;22:375-382.
476. Mani RM, Kuruvilla KC, Batiwala PM, et al. *Flavobacterium meningosepticum* as an opportunist. *J Clin Pathol* 1978;31:220-222.
477. Manian FA. Bloodstream infection with *Oligella ureolytica*, *Candida krusei*, *Bacteroides* species in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1993;17:250-291.
478. Manikam VM, Landman D, Saurina G, et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000;31:101-106.
479. Manno G, Dalmastrici C, Tabacchini S, et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2004;42:1491-1497.
480. Mardy C, Holmes B. Incidence of vaginal *Weeksella virosa* (formerly group II). *J Clin Pathol* 1988;41:211-214.
481. Marin M, Garcia de Viedma D, Manin-Rabadan P, et al. Infection of Hickman catheter by *Pseudomonas (formerly Flavimonas) oryihabitans* traced to a synthetic bath sponge. *J Clin Microbiol* 2000;38:4577-4579.
482. Marin ME, Marco Del Pont J, Dibar E, et al. Catheter-related bacteremia caused by *Roseomonas gilardii* in an immunocompromised patient. *Int J Infect Dis* 2001;5:170-171.
483. Marinella MA. Cellulitis and sepsis due to *Sphingobacterium*. *JAMA* 2002;288:23.
484. Marne C, Pallares R, Sitges-Serra A. Isolation of *Pseudomonas putrefaciens* in intra-abdominal sepsis. *J Clin Microbiol* 1983;17:1173-1174.
485. Maroye P, Doermann HP, Rogues AM, et al. Investigation of an outbreak of *Ralstonia pickettii* in a paediatric hospital by RAPD. *J Hosp Infect* 2000;44:267-272.
486. Marraro RV, Mitchell JL, Payet CR. A chromogenic characteristic of an aerobic pseudomonad species in 2% tryptone (indole) broth. *J Am Med Technol* 1977;39:13-19.
487. Marroni M, Pasticci MB, Pantosti A, et al. Outbreak of infusion-related septicemia by *Ralstonia pickettii* in the oncology department. *Tumori* 2003;89:575-576.
488. Marshall WF, Keating MR, Anhalt JP, et al. *Xanthomonas maltophilia*: an emerging nosocomial pathogen. *Mayo Clin Proc* 1989;64:1097-1104.
489. Martin R, Siavoshi F, McDougal DL. Comparison of rapid NFT system and conventional methods for identification of nonsaccharolytic gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1986;24:1089-1092.
490. Martino R, Martinez C, Pericas R, et al. Bacteremia due to glucose non-fermenting gram-negative bacilli in patients with hematological neoplasias and solid tumors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:610-615.
491. Martino R, Pericas R, Romero P, et al. CDC group IV c-2 bacteremia in stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:401-402.
492. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:191-206.
493. Mayfield CI, Innis WE. A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can J Microbiol* 1977;23:1311-1313.
494. Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, et al. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:2330-2333.
495. McKinley KP, Laundry TJ, Mastenon RG. *Achromobacter* group B replacement valve endocarditis. *J Infect* 1990;20:262-263.
496. McMenamin JD, Zaccane TM, Coenye T, et al. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest* 2000;117:1661-1665.
497. Meis JFGM, van Griethuysen AJA, Muytjens HL. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis in an immunosuppressed patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:366-367.
498. Mesnard R, Guido N, Michelet C, et al. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:304-306.
499. Mesnard R, Sire JM, Donnio PY, et al. Septic arthritis due to *Oligella urethralis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:195-196.
500. Meuleman P, Erard K, Herregods MC, et al. Bioprotective valve endocarditis caused by *Neisseria elongate* subspecies nitroreducens. *Infection* 1996;24:258-260.
501. Micozzi A, Venditti M, Monaco M, et al. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2000;31:705-711.
502. Miller JM, Alachi P. Evaluation of new computer-enhanced identification program for microorganisms: adaption of BioBASE for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1996;34:179-181.
503. Miller JM, Novy C, Hiett M. Case of bacterial endophthalmitis caused by an *Agrobacterium radiobacter*-like organism. *J Clin Microbiol* 1996;34:3212-3213.
504. Moissenet D, Tabone M-D, Girardet J-P, et al. Nosocomial CDC group IV c-2 bacteremia: epidemiological investigation by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1996;34:1264-1266.
505. Moller LVM, Arends JP, Harmsen HJM, et al. *Ochrobactrum intermedium* infection after liver transplantation. *J Clin Microbiol* 1999;37:241-244.
506. Montejo M, Aguirrebengoa K, Ugalde J, et al. *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after a dog bite. *Clin Infect Dis* 2001;33:1608-1609.
507. Moore IE, Reid A, Millar BC, et al. *Pandoraea apista* isolated from a patient with cystic fibrosis: problems associated with laboratory identification. *Br J Biomed Sci* 2002;59:164-166.
508. Moms JT, Myers M. Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis* 1998;27:912-913.
509. Moms MJ, Young VM, Moody MR. Evaluation of a multitest system for identification of saccharolytic pseudomonads. *Am J Clin Pathol* 1978;69:41-47.

510. Morrison AJ, Boyce K. Pseudomonitis caused by *Alcaligenes denitrificans* subsp. xylosoxidans: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 1986;24:879-881.
511. Morrison AJ, Hoffmann KK, Wenzel RP. Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial *Pseudomonas maltophilia* in a university hospital. *J Clin Microbiol* 1986;24:52-55.
512. Morrison AJ, Shulman JA. Community-acquired bloodstream infection caused by *Pseudomonas paucimobilis*: case report and review of literature. *J Clin Microbiol* 1986;24:853-855.
513. Morrison RE, Lamb AS, Craig DB, et al. Melioidosis: a reminder. *Am J Med* 1988;84:965-967.
514. Mortensen JE, Schidlow DV, Stahl EM. *Pseudomonas gladioli* (marginata) isolated from a patient with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Newslett* 1988;10:29-30.
515. Moss CW, Daneshvar MI, Hollis DG. Biochemical characteristics and fatty acid composition of Gilardi Rod Group 1 bacteria. *J Clin Microbiol* 1993;31:689-691.
516. Moss CW, Kaltenbach CM. Production of glutaric acid: a useful criterion for differentiating *Pseudomonas diminuta* from *Pseudomonas vesicularis*. *Appl Microbiol* 1974;27:437-439.
517. Moss CW, Wallace PL, Hollis DG, et al. Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M-5, and M-6, *Moraxella* (*Moraxella*) species, *Oligella urethralis* *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter immobilis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:484-492.
518. Moss RB. Cystic fibrosis: pathogenesis, pulmonary infection, and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;21:839-851.
519. Muder RR, Harris AP, Muller S, et al. Bacteremia due to *Stenotrophomonas Xanthomonas maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. *Clin Infect Dis* 1996;22:508-512.
520. Muder RR, Yu VL, Dummer JS, Vinson C, Lumish RM. Infections caused by *Pseudomonas maltophilia*. *Arch Intern Med* 1987;147:1672-1674.
521. Murray AE, Banzakas CA, Shepherd AJ, et al. Blood transfusion-associated *Pseudomonas fluorescens* septicemia: is this an increasing problem? *J Hosp Infect* 1987;9:243-248.
522. Musso D, Drancourt M, Bardot J, et al. Human infection due to the CDC group IVc-2 bacterium: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:482-484.
523. Nadler H, George H, Barr J. Accuracy and reproducibility of the Oxi-Ferm system in identifying a select group of unusual gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1978;9:180-185.
524. Nagano N, Sato J, Cordevant C, et al. Presumed endocarditis caused by BRO β -lactamase-producing *Moraxella lacunata* in an infant with Fallot's tetrad. *J Clin Microbiol* 2003;41:5310-5312.
525. Nahass RG, Wineski R, Herman DJ, et al. Vertebral osteomyelitis due to *Roseomonas* species: case report and review of the evaluation of vertebral osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 1995;21:1474-1476.
526. Namdari H, Hamzavi S, Peairs RR. *Rhizobium* (*Agrobacterium*) *radiobacter* identified as a cause of chronic endophthalmitis subsequent to cataract extraction. *J Clin Microbiol* 2003;41:3998-4000.
527. Namnyak S, Hussain S, Davalle J, et al. Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteremia due to *Pseudomonas fluorescens*. *J Hosp Infect* 1999;41:23-28.
528. Nawaz T, Hardy DJ, Bonnez W. *Neisseria longata* subsp. *elongata* a cause of human endocarditis complicated by pseudoaneurysm. *J Clin Microbiol* 1996;34:756-758.
529. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast: Approved Guideline. NCCLS document M35-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
530. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, et al. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1891-1899.
531. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1563-1567.
532. Nemec A, Dijkshoorn L, Jezek P. Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3937-3941.
533. Neu HC, Saha G, Chhl N-X. Resistance of *Xanthomonas maltophilia* to antibiotics and the effect of beta-lactamase inhibitors. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:283-285.
534. Ng VL, Boggs JM, York MK, et al. Recovery of *Bordetella bronchiseptica* from patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:376-377.
535. Njamkepo E, Delisle F, Hagege I, et al. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:131-136.
536. Noell F, Gorce MF, Garde C, et al. Isolation of *Weeksella zoohelcum* in septicemia. *Lancet* 1989;2:332.
537. Nord C-E, Wretling B, Dahlback A. Evaluation of two test kits- API and Oxi/Ferm tube- for identification of oxidative-fermentative gram-negative rods. *Med Microbiol Immunol* 1977;163:93-97.
538. Noyola DE, Edwards MS. Bacteremia with CDC group IV c-2 in an immunocompetent infant. *Clin Infect Dis* 1999;29:1572.
539. Nozue H, Hayashi T, Hasimoto Y, et al. Isolation and characterization of *Shewanella alga* from human clinical specimens and emendation of the description of *S. alga*. *Samdu et al.* 1990 335. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:628-634.
540. Nuijens E, Bussels B, Bols A, et al. Recurrent bacteremia by *Chryseobacterium indologenes* in an oncology patient with a totally implanted intravascular device. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:391-393.
541. Nzula S, Vandamme P, Govan JRW. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:265-269.
542. Oberhelman RA, Humbert JR, Santorelli FW. *Pseudomonas vesicularis* causing bacteremia in a child with sickle cell anemia. *South Med J* 1994;87:821-822.
543. Oberhofer TR. Comparison of the API 20E and Oxi/Ferm systems in identification of nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria. *J Clin Microbiol* 1979;9:220-226.
544. Oberhofer TR. Use the API 20E, Oxi/Ferm and Minitek systems to identify nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria: seven years of experience. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:241-256.
545. Oberhofer TR. Manual of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria. New York: Wiley, 1985.
546. Oberhofer TR. Rapid identification of glucose-nonfermenting gram-negative rods with commercial miniaturized kits. In: Gilardi GL, ed. *Nonfermentative Gram-Negative Rods: Laboratory Identification and Clinical Aspects*. New York: Marcel Dekker, 1985:85-116.
547. Oberhofer TR, Rowen JW, Cunningham GF, et al. Evaluation of the Oxi/Ferm tube system with selected gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1977;6:559-566.
548. O'Hara CM, Tenover FC, Millar JM. Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitex GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family Enterobacteriaceae and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli. *J Clin Microbiol* 1993;31:3165-3169.
549. O'Leary T, Fong IW. Prosthetic valve endocarditis caused by group Ve-I bacteria. *J Clin Microbiol* 1984;20:995.
550. Olsen H, Frederiksen WC, Siboni KE. *Flavobacterium meningosepticum* in 8 nonfatal cases of postoperative bacteremia. *Lancet* 1965;1:1294-1296.
551. O'Neil KM, Herman JH, Modlin JF, et al. *Pseudomonas cepacia*: an emerging pathogen in chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1986;108:940-942.
552. Ophel K, Kerr A. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium biovar 3* from grapevines. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:236-241.
553. Ostergaard L, Andersen PL. Etiology of community-acquired pneumonia: evaluation by transtracheal aspiration, blood culture, or serology. *Chest* 1993;104:1400-1407.
554. Otto LA, Blachman U. Nonfermentative bacilli: evaluation of three systems for identification. *J Clin Microbiol* 1979;10:147-154.
555. Otto LA, Deboo BS, Capers EL, et al. *Pseudomonas vesicularis* from cervical specimens. *J Clin Microbiol* 1978;7:341-345.
556. Otto LA, Pickett MJ. Rapid method for identification of gram-negative, nonfermentative bacilli. *J Clin Microbiol* 1976;3:566-575.
557. Owen RJ, Legros RM, Lapage SP. Base composition, size and sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens*. *J Gen Microbiol* 1978;104:127-138.
558. Pagani L, Lang A, Vedovelli C, et al. Soft tissue infection and bacteremia caused by *Shewanella putrefaciens*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2240-2241.
559. Pallett LJ, Hugo WB, Grant DJW, et al. *Pseudomonas cepacia* as contaminant and infective agent. *J Hosp Infect* 1983;4:9-13.
560. Palleroni NJ, Family I. *Pseudomonadaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984; 141-219.
561. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Sys Bacteriol* 1993;43:606-609.
562. Panagea S, Bijoux R, Corkill JE, et al. A case of lower respiratory tract infection caused by *Neisseria weaveri* and review of the literature. *J Infect* 2002;44:96-98.
563. Pandey A, Kapil A, Sood S, et al. In vitro activities of ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3415-3416.
564. Pankuch GA, Jacobs MR, Rittenhouse SF, et al. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2317-2322.
565. Panlilio AL, Beck-Sague CM, Siegel JD, et al. Infection and pseudoinfection due to povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *Clin Infect Dis* 1992;14:1078-1083.
566. Papadakis KA, Vartivarian SE, Vassilaki ME, et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: an unusual cause of biliary sepsis. *Clin Infect Dis* 1995;21:1032-1034.
567. Papadakis KA, Vartivarian SE, Vassilaki ME, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis. Report of two cases and review of the literature. *J Neurosurg* 1997;87:106-108.
568. Parke JL, Gunan-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* 2001;39:225-258.
569. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 2003;35:32-40.
570. Pedersen MM, Marso E, Pickett MJ. Nonfermentative bacilli associated with man: III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am J Clin Pathol* 1970;54:178-192.
571. Peel MM, Hibberd AJ, King BM, et al. *Alcaligenes piechaudii* from chronic ear discharge. *J Clin Microbiol* 1988;26:1580-1581.
572. Peetermans WE, van Wijngaarden E, van Eldere J, et al. Melioidosis brain and lung abscess after travel to Sri Lanka. *Clin Infect Dis* 1999;28:921-922.
573. Peiris V, Fraser S, Fairhurst M, et al. Laboratory diagnosis of *Brucella* infection: some pitfalls. *Lancet* 1992;339:1415-1416.
574. Perez RE. Endocarditis with *Moraxella*-like M-6 after cardiac catheterization. *J Clin Microbiol* 1986;24:501-502.
575. Perola O, Nousiainen T, Soumalainen S, et al. Recurrent *Sphingomonas paucimobilis*-bacteremia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. *J Hosp Infect* 2002;50:196-201.
576. Petrocheilou-Paschou V, Georgilis K, Kostis E, et al. Bronchitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in an elderly woman. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:147-148.
577. Pettersson B, Kodjo A, Ronaghi M, et al. Phylogeny of the family Moraxellaceae by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:75-89.
578. Pfaller MA, Sahm D, O'Hara C, et al. Comparison of the AutoSCAN-W/A rapid bacterial identification system and the Vitex AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1991;9:1422-1428.
579. Phillips I, Eykyn S. Contaminated drip fluids. *BMJ* 1972;1:746.

580. Phillips I, Eykyn S, Laker M. Outbreak of hospital infection caused by contaminated autoclave fluids. *Lancet* 1972;1:1258-1260.
581. Pickett MJ. Nonfermentative Gram-Negative Bacilli: A Syllabus for Detection and Identification. Los Angeles: Scientific Development Press, 1980.
582. Pickett MJ. Methods for identification of flavobacteria. *J Clin Microbiol* 1989;27:2309-2315.
583. Pickett MJ. Typing of strain from a single-source outbreak of *Pseudomonas pickettii*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1132-1133.
584. Pickett MJ. Identification of *Brucella* species with a procedure for detecting acidification of glucose. *Clin Infect Dis* 1994;19:976.
585. Pickett MJ. Moraxellae: differential features for identification of *Moraxella atlantae*, *M. lacunata*, and *M. nonliquefaciens*. *Med Microbiol Lett* 1994;3:397-400.
586. Pickett MJ, Greenwood JR. A study of the Va-1 group of pseudomonads and its relationship to *Pseudomonas pickettii*. *J Gen Microbiol* 1980;120:439-446.
587. Pickett MJ, Holli DG, Bottone EJ. Miscellaneous gram-negative bacteria. In: Balows A ed. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 5. Washington DC: American Society for Microbiology 1991;10:428.
588. Pickett MJ, Nelson EL. 1955. Speciation within the genus *Brucella* IV. Fermentation of carbohydrates. *J Bacteriol* 1955;69:333-336.
589. Pickett MJ, Pederson MM. Characterization of saccharolytic nonfermentative bacteria associated with man. *Can J Microbiol* 1970;16:351-362.
590. Pickett MJ, Pedersen MM. Nonfermentative bacilli associated with man: II. Detection and identification. *Am J Clin Pathol* 1970;54:164-177.
591. Pickett MJ, Von Graevenitz A, Pfyffer GE, et al. Phenotypic features distinguishing *Oligella urethralis* from *Moraxella osloensis*. *Med Microbiol Lett* 1996;5:265-270.
592. Picu C, Mille C, Popescu GA, et al. Aortic prosthetic endocarditis with *Neisseria elongate* subspecies *nitroreducens*. *Scand J Infect Dis* 2003;35:280-282.
593. Pien FD, Chung EYS. Group Ve infection: case report of group Ve-2 septicemia and literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;5:177-180.
594. Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab Sci* 1976;13:105-114.
595. Pitulle C, Citron DM, Bochner B, et al. Novel bacterium isolated from a lung transplant patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:3851-3855.
596. Planc AM, Ramirez A, Fernandez F, et al. *Pseudomonas vesicularis* bacteraemia. *Infection* 1992;0:367-368.
597. Platsouka E, Routsis C, Chalkis A, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis, bacteraemia and respiratory infection. *Scand J Infect Dis* 2002;4:391-392.
598. Plotkin GR. Agrobacterium radiobacter prosthetic valve endocarditis. *Ann Intern Med* 1980;3:839-840.
599. Plotkin SA, McKittrick JC. Nosocomial meningitis of the newborn caused by a Flavobacterium. *JAMA* 1966;98:194-196.
600. Pope TL Jr, Teague WG Jr, Kossack R, et al. Pseudomonas sacroiliac osteomyelitis: diagnosis by gallium citrate Ga 67 scan. *Am J Dis Child* 1982;36:649-650.
601. Potvliege C, Dejaegher-Bauduin C, Hansen W, et al. Flavobacterium multivorum septicemia in a hemodialyzed patient. *J Clin Microbiol* 1984;9:568-569.
602. Potvliege C, Jonckheer J, Lencelud C, et al. Pseudomonas stutzeri pneumonia and septicemia in a patient with multiple myeloma. *J Clin Microbiol* 1987;5:458-459.
603. Potvliege C, Vanhuynegem L, Hansen W. Catheter infection caused by an unusual pathogen Agrobacterium radiobacter. *J Clin Microbiol* 1989;7:2120-2122.
604. Prashanth K, Ranga MPM, Rao VA, et al. Corneal perforation due to *Acinetobacter junii*: a case report. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;7:215-217.
605. Puckett A, Davison G, Entwistle CC, et al. Post-transfusion septicemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. *J Clin Pathol* 1992;5:155-157.
606. Pugliese A, Pacris B, Schoch PE, et al. *Oligella urethralis* urosepsis. *Clin Infect Dis* 1993;7:1069-1070.
607. Purcell BK, Dooley DP. Centers for Disease Control and Prevention group O1 bacterium-associated pneumonia complicated by bronchopulmonary fistula and bacteremia. *Clin Infect Dis* 1999;9:945-946.
608. Rahav G, Simhon A, Maan Y, et al. Infections with *Chryseomonas luteola* (CDC group Ve-1) and *Flavimonas oryzihabitans* (CDC group Ve-2). *Medicine (Baltimore)* 1995;4:83-88.
609. Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M. *Pseudomonas pickettii* a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum*. *Int J Syst Bacteriol* 1973;23:15-19.
610. Ramirez FC, Saeed ZA, Darouiche RO, et al. *Agrobacterium tumefaciens* peritonitis mimicking tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1992;15:938-940.
611. Ramos JM, Soriano F, Bernacer M, et al. Infection caused by the nonfermentative gram-negative bacillus CDC group IV c-2: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:456-458.
612. Rastogi S, Sperber SJ. Facial cellulitis and *Pseudomonas luteola* bacteremia in an otherwise healthy patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:303-305.
613. Reina J, Bassa A, Llompart I, Borrell N, et al. Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a patient with a thoracic trauma. *Infection* 1991;19:46-48.
614. Reina J, Bassa A, Llompart I, Portela D, et al. Infections with *Pseudomonas paucimobilis*: report of four cases and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:1072-1076.
615. Reina J, Borrell N. Leg abscess caused by *Weeksella zoohelcum* following a dog bite. *Clin Infect Dis* 1992;14:1162-1163.
616. Reina J, Gil J, Alomar P. Isolation of *Weeksella virosa* (formerly CDC group II) from a vaginal sample. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:569-570.
617. Reina J, Gil J, Salva F, et al. Microbiological characteristics of *Weeksella virosa* (formerly CDC Group II) isolated from the human genitourinary tract. *J Clin Microbiol* 1990;28:2357-2359.
618. Reina J, Llompart I, Alomar P. Acute suppurative otitis caused by *Comamonas acidovorans*. *Clin Microbiol Newsletter* 1991;13:38-39.
619. Reisler RB, Blumberg H. Community-acquired *Pseudomonas stutzeri* vertebral osteomyelitis in a previously healthy patient: case report and review. *Clin Infect Dis* 1999;29:667-669.
620. Reverdy ME, Freney J, Fleuret J. Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. *J Clin Microbiol* 1984;19:140-143.
621. Reye EAP, Bale MJ, Cannon WH, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production in Tech agar. *J Clin Microbiol* 1981;13:456-458.
622. Reyes MP, Lerner AM. Current problems in the treatment of infective endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1981;5:314.
623. Rhoads S, Marinelli L, Imperatrice CA, et al. Comparison of MicroScan WalkAway System with Vitek System for identification of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1995;31:3044-3046.
624. Rice EW, Reasoner DJ, Johnson CH, et al. Monitoring for methylobacteria in water systems. *J Clin Microbiol* 2000;38:4296-4297.
625. Richardson JD. Failure to clear a *Roseomonas* line infection with antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 1997;25:155.
626. Rihs JD, Brenner DJ, Weaver RE, et al. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. *J Clin Microbiol* 1993;31:3275-3283.
627. Ringvold A, Vik E, Bevinger LS. *Moraxella lacunata* isolated from epidemic conjunctivitis among teen-aged females. *Acta Ophthalmol* 1985;63:427-431.
628. Rios I, Klimek JJ, Maderazo E, et al. *Flavobacterium meningosepticum* meningitis: report of selected aspects. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:444-447.
629. Ritterband D, Shah M, Cohen K, et al. *Burkholderia gladioli* keratitis associated with consecutive recurrent endophthalmitis. *Cornea* 2002;21:602-603.
630. Robin T, Janda MJ, Pseudo-, Santo-, *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging pathogen in search of a genus. *Clin Microbiol Newsletter* 1996;18:9-13.
631. Robinson A, McCarter YS, Tetreault J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter System, API 20E System, and Vitek Automicrobic System for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1995;33:364-370.
632. Rockhill RC, Lutwick LI. Group IV-like gram-negative bacilemia in a patient with obstructive uropathy. *J Clin Microbiol* 1978;8:108-109.
633. Rodby RA, Glick E. Agrobacterium radiobacter peritonitis in two patients maintained on chronic peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1991;18:402-405.
634. Roig P, Orti A, Navarro V. Meningitis due to *Pseudomonas stutzeri* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996;22:587-588.
635. Roilides E, Mueller BU, Letterio JJ, et al. Agrobacterium radiobacter bacteremia in a child with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:337-338.
636. Romanyk J, Gonzalez-Palacios R, Nieto A. A new case of bacteraemia due to *Flavimonas oryzihabitans*. *J Hosp Infect* 1995;29:236-237.
637. Romero Gomez MP, Peinado Eteban AM, Sobrino Daza JA, et al. Prosthetic mitral valve endocarditis due to *Ochrobactrum anthropi*: case report. *J Clin Microbiol* 2004;42:3371-3373.
638. Rose RC, Grossman AM, Giles JW. Infective endocarditis due to the CDC group M6 bacillus. *J Tenn Med Assoc* 1990;83:603-604.
639. Rosenberg I, Leibovici L, Mor F, et al. *Pseudomonas stutzeri* causing late prosthetic valve endocarditis. *J R Soc Med* 1987;80:457-459.
640. Rosenthal SL. Clinical role of *Acinetobacter* and *Moraxella*. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach FL: CRC Press, 1978;105-117.
641. Rosenthal SL, Freundlich LF, Gilardi GL, et al. In vitro antibiotic sensitivity of *Moraxella* species. *Chemotherapy* 1978;24:360-363.
642. Rosenthal SL, Freundlich LF, Washington W. Laboratory evaluation of a multitest system for identification of gram-negative organisms. *Am J Clin Pathol* 1978;70:914-917.
643. Ross JP, Holland SM, Gill VJ, et al. Severe *Burkholderia (Pseudomonas) gladioli* infection in chronic granulomatous disease: report of two successfully treated cases. *Clin Infect Dis* 1995;21:1291-1293.
644. Rossau R, Kersters K, Faleen E, et al. *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:198-210.
645. Rossau R, van Landschoot A, Gillis M, et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organism. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:310-319.
646. Rosselló R, García-Valdés E, Lalucat J, et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 1991;14:150-157.
647. Rosselló R, García-Valdés E, Macario AJL, et al. Antigenic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 1992;15:617-623.
648. Rosselló-Mora RA, Lalucat J, Dott W, et al. Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. *J Appl Bacteriol* 1994;76:226-233.
649. Rosselló-Mora RA, Lalucat J, Moore ERB. Strain JM300 represents a new genomovar within *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 1996;19:596-599.
650. Rossmann SN, Wilson PH, Hicks J, et al. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* 1998;36:1756-1760.
651. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 2002;8:225-230.
652. Russell FM, Davis JM, Whipp MJ, et al. Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. *Clin Infect Dis* 2001;33:129-130.
653. Rutherford PC, Narkowicz JE, Wood CJ, et al. Peritonitis caused by *Pseudomonas mephitica* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1988;26:2441-2443.
654. Ryu E. A simple method of staining bacterial flagella. *Kitasato Arch Exp Med* 1937;14:218-219.
655. Saavedra J, Garrido C, Folgueira D, et al. *Ochrobactrum anthropi* bacteraemia associated with a catheter in an immunocompromised child and review of the pediatric literature. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:658-660.
656. Saiman L, Burns JL, Larone D, et al. Evaluation of MicroScan Autoscan for identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:492-494.
657. Saiman L, Chen Y, Tabibi S, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3942-3945.
658. Sajjan US, Sun L, Goldstein R, et al. Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the cblA major

686. *actin* gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J Clin Microbiol* 1995;177:1030-1038.
687. US. Xie H, Lefebvre MD, et al. Identification and molecular analysis of cable transfer genes in *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* 2003;149:961-971.
688. Carratala J, Zurita A, et al. Bacteremia caused by CDC group IV c-2 in a patient with acute leucemia. *Haematologica* 1998;83:670-672.
689. R. Martino R, Sureda A, et al. Catheter-related bacteremia due to *Pseudomonas paucimobilis* in neutropenic cancer patients: report of two cases. *Clin Infect Dis* 1995;20:1573-1574.
690. MacFarlane DJ. Successful treatment of *Pseudomonas paucimobilis* haemodialysis catheter-related sepsis without catheter removal. *Postgrad Med J* 1994;70:47-49.
691. Martin JW, Martin JW, Hooke M, et al. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of a unusual opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 2000;30:936-938.
692. JAT, Malnicki H, Loudon KW. A case of peritonitis caused by *Roseomonas* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2150-2152.
693. DA, Carter GR. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* 1976;33:344-349.
694. H, Ieki J, Oyaizu H, et al. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:704-707.
695. WF, Turchik JB, Westlake RE, et al. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). *N Engl J Med* 1981;305:1133-1135.
696. U, Kapila R, Kaminski Z, et al. *Pseudomonas putrefaciens* as a cause of sepsis in humans. *J Clin Microbiol* 1979;10:385-387.
697. Sneathenberger PC. Practical Approach to the Identification of Glucose-fermenting Gram-Negative Bacilli: A Guide to Identification. Ed. 3. Maywood, IL: Loyola University, 2005.
698. Sneathenberger PC, Connell S, Skinner J, et al. Comparison of MicroScan Rapid Gram-Negative Identification Type 3 (RNI3) Poanel with Vitek GNI and API 20E for identification of Gram-Negative Bacilli. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 1998:156.
699. Sneathenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 8. Washington DC: ASM Press 2003:749-779.
700. J, Boulton FE, Govan JRW, et al. A fatal transfusion reaction associated with blood contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. *Vox Sang* 1988;54:201-204.
701. Negers P, Vancanneyt M, Pot B, et al. Classification of *Pseudomonas diminuta* Lefson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll and Freytag 1953 as *Brevandimonas* gen. nov. as *Brevandimonas diminuta* comb. nov. and *Brevandimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:499-510.
702. Seifert H, Baginski R, Schulze A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:750-753.
703. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic identification method. *J Clin Microbiol* 1997;35:2819-2825.
704. Senol E, Des-Jardin J, Stark PC, et al. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002;34:1653-1656.
705. Sepulveda-Torres LC, Zhou J, Guasp C, et al. *Pseudomonas* sp strain KC represents a new genomovar within *Pseudomonas stutzeri*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2013-2019.
706. Shah SS, Ruth A, Coffin SE. Infection due to *Moraxella osloensis*: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;30:179-181.
707. Shaegani M, Lee AM, McGlynn DM. Evaluation of the Oxi/Ferm tube system for identification of nonfermentative gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1978;7:533-538.
708. Shayegani M, Maupin PS, McGlynn DM. Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1978;7:539-545.
709. Shayegani M, Maupin PS, Parsons LM, et al. Evaluation of the N/F system for identification of nonfermentative gram-negative bacilli using a reference laboratory population. *Lab Med* 1981;12:177-182.
710. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, et al. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 2000;38:3112-3115.
711. Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, et al. *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis* 2004;38:799-804.
712. Sheridan RL, Ryan CM, Pasternack MS, et al. Flavobacterial sepsis in massively burned pediatric patients. *Clin Infect Dis* 1993;17:185-187.
713. Shewan JM: Taxonomy and ecology of *Flavobacterium* and related genera. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:233-252.
714. Shin JH, Kim SH, Shin MG, et al. Bacteremia due to *Burkholderia gladioli*: case report. *Clin Infect Dis* 1997;25:1264-1265.
715. Shivaji S, Ray MK, Rao NS, et al. *Sphingobacterium antarcticus* sp. nov., psychrotrophic bacterium from the soils of Schirmacher Oasis, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:102-106.
716. Shokar NK, Shokar GS, Islam J, et al. *Roseomonas gilardii* infection: case report and review. *J Clin Microbiol* 2002;40:4789-4791.
717. Shukla SK, Paustian DL, Stockwell PJ, et al. Isolation of a fastidious *Bergeyella* species associated with cellulites after a cat bite and a phylogenetic comparison with *Bergeyella* Zooheleum strains. *J Clin Microbiol* 2004;42:290-293.
718. Siau H, Yuen K-Y, Ho P-L. Identification of acinetobacters on blood agar in presence of D-glucose by unique browning effect. *J Clin Microbiol* 1998;36:1404-1407.
719. Siegman-Igra Y, Bar-Yoef S, Gorea A, et al. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:843-849.
720. Silver MR, Felegie TP, Sorkin MI. Unusual bacterium, group Ve-2, causing peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1985;21:838-839.
721. Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T, et al. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:331-336.
722. Simmonds EJ, Conway SP, Ghoneim ATM, et al. *Pseudomonas cepacia*: a new pathogen in patients with cystic fibrosis referred to a large centre in the United Kingdom. *Arch Dis Child* 1990;65:874-877.
723. Simor AE, Salit IE. Endocarditis caused by M6. *J Clin Microbiol* 1983;17:931-933.
724. Simpson AJH, Suputtamongkol Y, Smith MD. Comparison of imipenem and ceftazidime as therapy for severe melioidosis. *Clin Infect Dis* 1999;29:381-387.
725. Sintchenko V, Jelfs P, Sharma A, et al. *Massilia timonae*: an unusual bacterium causing wound infection following surgery. *Clin Microbiol Newslett* 2000;22:149-151.
726. Smith DL, Gurney LB, Smith EG, et al. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J Clin Microbiol* 1993;31:3017-3022.
727. Smith J, Ashhurst-Smith C, Norton R. *Pseudomonas fluorescens* pseudobacteraemia: a cautionary lesson. *J Paediatr Child Health* 2002;38:63-65.
728. Smith MD, Angus BJ, Wuthiekanun V, et al. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 1997;65:4319-4321.
729. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, Pitt TL, et al. Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. *J Clin Pathol* 1993;46:374-375.
730. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, Teerawattanasook N, et al. Latex agglutination for rapid detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigen in urine of patients with melioidosis. *J Clin Pathol* 1995;48:174-176.
731. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, White NJ. In-vitro activity of carbapenem antibiotics against beta-lactam susceptible and resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:611-615.
732. Smith SM, Eng RHK, Forrester C. *Pseudomonas* mesophilica infections in humans. *J Clin Microbiol* 1985;21:314-317.
733. Sobel JD, Hashman N, Reinher G, et al. Nosocomial *Pseudomonas cepacia* infection associated with chlorhexidine contamination. *Am J Med* 1982;73:183-186.
734. Sonnenwirth AC. Bacteremia with and without meningitis due to *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Comamonas terrigena*, and *Pseudomonas maltophilia*. *Ann NY Acad Sci* 1970;174:488-502.
735. Spangler SK, Visalli MA, Jacobs MR, et al. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:772-775.
736. Spear JB, Fuhrer J, Kirby BD. *Acetobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 1988;26:598-599.
737. Speert DP, Henry D, Vandumme P, et al. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patient with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 2002;8:181-187.
738. Spotnitz M, Rudnitsky J, Rambaud JJ. Melioidosis pneumonitis. *JAMA* 1967;202:950-954.
739. Staneck JL, Weckbach LS, Tilton RC, et al. Collaborative evaluation of the Radiometer Sensititre AP80 for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1993;31:1179-1184.
740. Stefaniuk E, Baraniak A, Gniadkowski, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:479-485.
741. Steyn PL, Segers P, Vancanneyt M, et al. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species. *Pedobacter heparinus* comb. nov. *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter sultans* sp. nov. proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:165-177.
742. Stiakaki E, Galanakis E, Samonis G, et al. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in pediatric oncology patients. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:72-74.
743. Stonecipher KG, Jensen HG, Kati PR, et al. Ocular infections associated with *Comamonas acidovorans*. *Am J Ophthalmol* 1991;112:46-49.
744. Storms V, Van Den Vrecken N, Coenye T, et al. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia*-like isolate leading to the emended description of *Burkholderia pyroclia*. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:517-526.
745. Struillou L, Raffi F, Bamer JH. Endocarditis caused by *Neisseria elongate* subspecies *nitroreducens*: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:625-627.
746. Struthers M, Wong J, Janda JM. An initial appraisal of the clinical significance of *Roseomonas* species associated with human infections. *Clin Infect Dis* 1996;23:729-733.
747. Strylowski ME, LiPuma JJ, Messier RH, et al. Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandora phenomusa* infection after lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2003;41:2255-2257.
748. Subudhi CP, Adediji A, Kaufmann ME, et al. Fatal *Roseomonas gilardii* bacteremia in a patient with refractory blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:573-575.
749. Sugarman B, Clarridge J. Osteomyelitis caused by *Moraxella osloensis*. *J Clin Microbiol* 1982;15:1148-1149.
750. Sun L, Jiang RZ, Steinbach S, et al. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbi* + *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med* 1995;1:661-666.
751. Sung LL, Yang DI, Hung CC, et al. Evaluation of autoSCAN-W/A and the Vitek GNI + AutoMicrob System for identification of non-glucose-fermenting gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2000;38:1127-1130.
752. Suputtamongkol Y, Chaowgul W, Chetchotisakd P, et al. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. *Clin Infect Dis* 1999;29:408-413.

724. Swann RA, Foulkes SJ, Holmes B, et al. "Agrobacterium yellow group" and *Pseudomonas paucimobilis*, causing peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Pathol* 1985;38:1293-1299.
725. Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2004;42:5102-5108.
726. Tabor E, Gerety RJ. Five cases of pseudomonas sepsis transmitted by blood transfusions. *Lancet* 1984;1:1403.
727. Takeuchi M, Hamana K, Hiraiishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera. *Shingobium*, *Novosphingobium* and *Spingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1405-1417.
728. Takeuchi M, Kawai F, Shimada Y, et al. Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 1993;16:227-238.
- 728a. Takeuchi M, Sakane T, Yanagi M, et al. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas assacharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:334-341.
729. Takeuchi M, Yokota A. Proposals of *Sphingobacterium faecium* sp. nov., *Sphingobacterium piscium* sp. nov., *Sphingobacterium heparinum* comb. nov., *Sphingobacterium thalophilum* comb. nov. and two biospecies of the genus *Sphingobacterium*, and synonymy of *Flavobacterium yabuchiiae* and *Sphingobacterium spiritovorum*. *J Gen Appl Microbiol* 1992;38:465-482.
730. Tamaoka J, Ha D-M, Komagata K. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dons de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteorini* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteorini* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:52-59.
731. Tang, Y-W, Hopkins MK, Kolben CP, et al. *Bordetella holmesii*-like organism associated with septicemia endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis* 1998;26:389-392.
732. Taplan D, Bassett DCJ, Menz PM. Foot lesions associated with *Pseudomonas cepacia*. *Lancet* 1971;2:568-571.
733. Taylor M, Keane CT, Falkner FR. *Pseudomonas putida* in transfused blood. *Lancet* 1984;2:107.
734. Tenover FC, Mizuki TS, Carlson LG. Evaluation of autoSCAN-W/A automated microbiology system for the identification of non-glucose-fermenting gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1990;28:1628-1634.
735. Terec D. ICU-acquired pneumonia due to *Flavobacterium meningosepticum*. *JAMA* 1974;228:732.
736. Thayu M, Baltimore RS, Sleight BJ, et al. CDC group IV c-2 bacteremia in a child with recurrent acute monoclonal leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:397-398.
737. Thimann KV. The Life of Bacteria: Their Growth, Metabolism and Relationships. Ed. 2. New York: Macmillan, 1963.
738. Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, et al. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:791-796.
739. Thong ML, Putbuechary SD, Lee EL. *Flavobacterium meningosepticum* infection: an epidemiological study in a newborn nursery. *J Clin Pathol* 1981;34:429-433.
740. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989;97:595-605.
741. Tonjum T, Caugant DA, Bover K. Differentiation of *Moraxella nonliquefaciens*, *M. lacunata* and *U. bovis* by using multilocus enzyme electrophoresis and *M. lacunata*, and *M. bovis* by using multilocus enzyme electrophoresis and hybridization with plasmid-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1992;30:3099-3107.
742. Tripodi MF, Adinolfi LE, Rosario P, et al. First definite case of aortic valve endocarditis due to *Moraxella phenylpyruvica*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:480-482.
743. Tronel H, Plesiat P, Ageron E, et al. Bacteremia caused by a novel species of *Sphingobacterium*. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1242-1244.
744. Truant AL, Gulati R, Giger O, et al. *Methylobacterium* species: an increasingly important opportunistic pathogen. *Lab Med* 1998;29:704-710.
745. Truper HG, De Clari L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (Nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:908-909.
746. Tsakris A, Hassapopoulou H, Skoura L, et al. Leg ulcer due to *Pseudomonas luteola* in a patient with sickle cell disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:141-143.
747. Urakami T, Araki H, Suzuki K-I, et al. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:504-513.
748. Ursing J, Bruun B. Genotypic heterogeneity of *Flavobacterium* group Iib and *Flavobacterium breve*, demonstrated by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1991;99:780-786.
749. Valdezate S, Vindel A, Maiz L, et al. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with cystic fibrosis. Madrid, 1991-1998. *Emerg Infect Dis* 2001;7:113-122.
750. Valenstein P, Bardy GH, Cox CC, et al. *Pseudomonas alcaligenes* endocarditis. *Am J Clin Pathol* 1983;79:245-247.
751. Vancanneyt M, Segers P, Torck U, et al. Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:926-932.
752. Vandamme P, Bernadet J-F, Segers P, et al. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:827-831.
- 752a. Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2285-2289.
753. Vandamme P, Gillis M, Vancanneyt M, et al. *Moraxella lincolnii* sp. nov., isolated from the human respiratory tract, and reevaluation of the taxonomic position of *Moraxella osloensis*. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:474-481.
- 753a. Vandamme P, Goris J, Coenye T, et al. Assignment of Centers for Disease Control group IVc-2 to the genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:663-669.
754. Vandamme P, Henry D, Coenye T, et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;33:143-149.
755. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, et al. *Bordetella tremarum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alkaligenes dentrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:849-858.
756. Vandamme P, Holmes B, Coenye T, et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - a new twist to an old story. *Res Microbiol* 2003;154:91-96.
757. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in patient with cystic fibrosis and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1188-1200.
758. Vandamme P, Homme J, Vancanneyt M, et al. *Bordetella hincii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:37-45.
759. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, et al. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol* 2000;38:1042-1047.
760. Vandepitte J, Debois J. *Pseudomonas putrefaciens* as a cause of bacteremia in humans. *J Clin Microbiol* 1978;7:70-72.
761. Vanechoutte M, Claeys G, Steyaert S, et al. Isolation of *Moraxella canis* from an ulcerated metastatic lymph node. *J Clin Microbiol* 2000;38:3870-3871.
762. Vanechoutte M, De Baere T, Wauters G, et al. One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. *J Clin Microbiol* 2001;39:4588-4590.
763. Vanechoutte M, Kampfer P, De Baere T, et al. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:317-327.
764. Vanholder R, Vanhaecke E, Ringoir S. *Pseudomonas* septicemia due to deficient disinfectant mixing during reuse. *Int J Artif Organs* 1992;15:19-24.
765. van Horn KG, Gedris CA, Ahmed T, et al. Bacteremia and urinary tract infection associated with CDC group Vd biovar 2. *J Clin Microbiol* 1989;27:201-202.
766. van Laer F, Raes D, Vandamme P, et al. An outbreak of *Burkholderia cepacia* with septicemia on a cardiology ward. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:112-113.
767. van Pelt, Verduin CM, Goessens WHF, et al. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol* 1999;37:2158-2164.
768. Vartivarian S, Anaisie E, Bodey G, et al. A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:624-627.
769. Vartivarian SE, Papadakis KA, Anaissie EJ. *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* urinary tract infection: a disease that is usually severe and complicated. *Arch Intern Med* 1996;156:433-435.
770. Vartivarian SE, Papadakis KA, Palacios JA, et al. Mucocutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia*: a new spectrum. *Ann Intern Med* 1994;121:969-973.
771. Velasco J, Romero C, Lopez-Goni I, et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:759-768.
772. Verhasselt B, Claeys G, Elaichouni A, et al. Case of recurrent *Flavimonas oryziabactans* bacteremia associated with an implanted central venous catheter (Port-A-Cath): assessment of clonality by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:3047-3048.
773. Vermis K, Coenye T, LiPuma JJ, et al. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:689-691.
774. Vermis K, Bañadme PAR, Nelis HJ. *Burkholderia cepacia* complex genomovars: utilization of carbon sources, susceptibility to antimicrobial agents and growth on selective media. *J Appl Microbiol* 2003;95:1191-1199.
775. Villegas MV, Hinstein AL. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:284-295.
776. Visca P, Petrucca A, De Mori P, et al. Community-acquired *Acinetobacter* radioresistant bacteremia in an HIV-positive patient. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1032-1035.
777. Vogel BF, Jorgensen K, Christensen H, et al. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:2189-2199.
778. Vogel BF, Venkateswaran K, Christensen H, et al. Polyphasic taxonomic approach in the description of *Alishewanella fetalis* gen. nov., sp. nov., isolated from a human foetus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1133-1142.
779. Von Graevenitz A. Clinical role of infrequently encountered nonfermenters. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978:119-153.
780. von Graevenitz A. Ecology, clinical significance, and antimicrobial susceptibility of infrequently encountered glucose-nonfermenting gram-negative rods. In: Gilardi GL, ed. *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 1978:181-232.
781. von Graevenitz A, Boewman J, Del Notaro C, et al. Human infection with *Halomonas* following fish bite. *J Clin Microbiol* 2000;38:3123-3124.
782. von Graevenitz A, Grehn M. Susceptibility studies on *Flavobacterium* II-b FEM.S Microbiol Lett 1977;2:289-292.
783. von Graevenitz A, Pfyler GE, Pickett MJ, et al. Isolation of an unclassified non-fermentative gram-negative rod from a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:568-570.
784. von Graevenitz A, Simon G. Potentially pathogenic, nonfermentative, H₂S-producing gram-negative rod (Ib). *Appl Microbiol* 1970;19:176.

25. Von Graevenitz A, Zollinger-Iten J. Evaluation of pertinent parameters of a new identification system for non-enteric gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:108-112.
26. Von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, et al. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic birreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1257-65.
27. Wallet F, Perez T, Armand S, et al. Pneumonia due o *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J Clin Microbiol* 2002;40:2300-2301.
28. Walsh AL, Wuthiekanun V, Smith MD, et al. Selective broths for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical samples *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:124.
29. Warwood NM, Blazevic DJ, Hofherr L. Comparison of the API 20E and Corning N/F systems for identification of nonfermentative gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 1979;10:175-179.
30. Watson KC, Muscatl. Meningitis caused by a *Flavobacterium*-like organism (CDC lie strain). *J Infect* 1983;7:278-279.
31. Wauters G, Boel A, Voorn GP, et al. Evaluation of a new identification system. Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1995;33:845-849.
32. Wauters G, Claeys G, Verschraegen G, et al. Case of catheter sepsis with *Ralstonia giardii* in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Microbiol* 2001;39:4583-4584.
33. Wauters G, de Baere T, Willems A, et al. Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;51:859-862.
34. Weems JJ Jr. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas cepacia* associated with contamination of reusable electronic ventilator temperature probes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;18:583-586.
35. Wentkamp J-H, Tang Y-W, Haas DW, et al. Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia associated with persistent lymph node infection in a patient with hyperimmunoglobulin M syndrome. *Clin Infect Dis* 2000;31:1183-1187.
36. Welch DF, Muzynski MJ, Pai CH, et al. Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1987;25:1730-1734.
37. Wen A, Fegan M, Hayward C, et al. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov. comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:567-576.
38. Werthamer S, Weiner M. Subacute bacterial endocarditis due to *Flavobacterium meningosepticum*. *Am J Clin Pathol* 1972;57:410-412.
39. Wertheim WA, Markovitz DM. Osteomyelitis and intervertebral discitis caused by *Pseudomonas pickettii*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2506-2508.
40. Weyant RS, Danehrvar MI, Jordan JG, et al. Eugonic oxidizer group 4: an unusual gram-negative bacterium isolated from clinical specimens. Abstract of the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999:144.
41. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* 1995;33:1-7.
42. Weyant RS, Moss CW, Weaver RE, et al. Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria. Ed. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
43. Wheelis M. First shots fired in biological warfare. *Nature* 1998;395:213.
44. Whyte PW, Pope LC, Carter KB, et al. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *J Clin Microbiol* 2000;38:282-285.
45. White NJ. Melioidosis. *Lancet* 2003;361:1715-1722.
46. Willems A, De Ley J, Gillis M, et al. *Comamonadaceae*, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov. comb. nov., *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969) gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:445-450.
47. Willems A, Falsen E, Pot B, et al. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, *E. Falsen* (EF) Group 13, EF Group 16, and several clinical isolates with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:384-398.
48. Wilson APR, Ridgway GL, Ryan KE, et al. Unusual pathogens in neutropenic patients. *J Hosp Infect* 1988;11:398-400.
49. Wispflinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospital: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 2000;31:690-697.
50. Wolf A, Fritze A, Hagemann M, et al. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1937-1944.
51. Wong JD, Janda JM. Association of an important *Neisseria* species. *Neisseria elongata* Subsp. *nitroreducens*, with bacteremia, endocarditis, and osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1992;30:719-720.
52. Woo PC, Kuhnert P, Burnes Ap, et al. *Laribacter hongkongensis*: a potential cause of infectious diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:551-556.
53. Woo PC, Lau SKP, Teng JLL, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study. *Lancet* 2004;363:1941-1947.
54. Woo PC, Wong SS, Yuen KY: *Rolstonia pickettii* bacteraemia in a cord blood transplant recipient. *New Microbiol* 2002;25:97-102.
55. Wood CA, Reboli AC. Infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype antitratu. *J Infect Dis* 1983;160:1603-1603, 1993.
56. Woodard DR, Cone LA, Fostvedt K. *Bordetella bronchiseptica* infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;20:193-194.
57. Woods CW, Bressler AM, LiPuma JJ, et al. Virulence associated with outbreak-related strains of *Burkholderia cepacia* complex among a cohort of patients with bacteremia. *Clin Infect Dis* 2004;38:1243-1250.
58. Woolfrey BF, Moody JA. Human infection associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:243-255.
59. Wright RM, Moore JE, Shaw A, et al. Improved cultural detection of *Burkholderia cepacia* from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 2001;54:803-805.
60. Wuthiekanun V, Dance D, Chaowagul W, et al. Blood culture techniques for the diagnosis of melioidosis. *Eur J Clin Microbiol* 1990;9:654-658.
61. Wuthiekanun V, Dance DA, Wattanagoon Y, et al. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. *J Med Microbiol* 1990; 33:121-126.
62. Yabuuchi E, Kaneko T, Yano I, et al. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucosa-non-fermenting gram-negative rods in CDC groups I1K-2 and I1b. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:580-598.
63. Yabuuchi E, Kuwamura Y, Cosaco Y, et al. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *Dentrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. and *Microbiol Immunol* 1998;42:429-438.
64. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 1992;36:1251-1275.
65. Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol* 1995;39:897-904.
66. Yabuuchi E, Yano I. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohya 1971) nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:477-478.
67. Yabuuchi E, Yuno I, Oyaizu H, et al. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas albaesia* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol* 1990;34:99-119.
68. Yagci A, Cerikcioglu N, Kaulmann ME, et al. Molecular typing of *Myroides odoratimimus* (*Flavobacterium odoratum*) urinary tract infections in a Turkish hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:731-732.
69. Yamamoto T, Naigowit P, Dejsirilert S, et al. In vitro susceptibilities of *Pseudomonas pseudomallei* to 27 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34: 2027-2029.
70. Yao JDC, Louie M, Louie L, et al. Comparison of E test and agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1428-1430.
71. Yih WK, Silva EA, Ida J, et al. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Inf Dis* 1999;5:441-443.
72. Yohe S, Fishbain JT, Andrews M. *Shewanella putrefaciens* abscess of the lower extremity. *J Clin Microbiol* 1997;35:3363.
73. Yoneyama A, Yano H, Hitomi S, et al. *Ralstonia pickettii* colonization of patients in an obstetric ward caused by a contaminated irrigation system. *J Hosp Infect* 2000;46:79-80.
74. Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, et al. A revision of *Rhizobium* Fran 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. Rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:89-103.
75. Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, et al. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: a reply to Farrand, et al. (2003). *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1689-1695.
76. Yuen, K-Y, Woo PCY, Teng JLL, et al. *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel gram negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. *J Clin Microbiol* 2001;39:4227-4232.
77. Zapardiel J, Blum G, Caramelo C, et al. Peritonitis with CDC group IV c-2 bacteria in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:509-511.

<http://booksmedicos.org>

Bacilos gramnegativos curvos y fermentadores oxidasa positivos: campilobacterias y vibriones

Parte I: Bacilos curvos: *Campylobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter* *Helicobacter* y bacterias relacionadas

Reseña histórica

Clasificación de *Campylobacter* y taxones relacionados

Especies de *Campylobacter*

Campylobacter jejuni subespecie *jejuni*

Otras especies de *Campylobacter*

Ex especies de *Wolinella* y *Bacteroides*
incluidas en la familia

Campylobacteriaceae

Género *Arcobacter*

Género *Helicobacter*

H. pylori

Otras especies de *Helicobacter*
de importancia clínica

Especies de *Helicobacter* no humanas

Otros bacilos gramnegativos microaerófilos

Identificación definitiva de campilobacteres y bacterias relacionadas

Identificación rápida de
campilobacteres a partir
de colonias y muestras de heces

Pruebas diferentes del cultivo

Métodos de detección directos

Cultivo y aislamiento de *Helicobacter pylori*

Muestras para el aislamiento de *H. pylori*

Procedimiento de aislamiento

Identificación de *H. pylori*

Prueba de ureasa en biopsia (prueba CLO)

Pruebas no invasivas para el diagnóstico de
la infección por *H. pylori*

Precisión de las pruebas invasivas
y no invasivas para el diagnóstico
de la infección por *H. pylori*

Helicobacteres enterohepáticos

Parte II: Familias de *Vibrionaceae* y "*Aeromonadaceae*"

Filogenia de *Vibrionaceae*

Género *Vibrio*

Taxonomía

Descripción y síndromes clínicos asociados
de especies de *Vibrio* de importancia
humana

Métodos de aislamiento de *Vibrios*
en el laboratorio

Caracterización bioquímica e identificación
de laboratorio de las especies de *Vibrio*

Géneros *Listonella*, *Photobacterium* y *Shewanella*

Aeromonas y *Plesiomonas*

Género *Aeromonas*

Taxonomía

Importancia clínica

Especies de *Aeromonas* en *sanguijuelas medicinales*

Aislamiento en el laboratorio de especies de *Aeromonas* a partir de muestras clínicas

Identificación de laboratorio de especies de *Aeromonas*

Género *Plesiomonas*

Aislamiento e identificación de laboratorio

Género *Chromobacterium*

PARTE I: BACILOS CURVOS: *CAMPYLOBACTER*, *WOLINELLA*, *ARCObACTER*, *HELICObACTER* Y BACTERIAS RELACIONADAS

Reseña histórica

El microorganismo clasificado actualmente como *Campylobacter jejuni* fue descubierto en 1931 por Jones y cols.¹⁵⁷ como agente causal de la disentería invernal en el ganado. Transcurrieron 36 años antes de que King describiera un grupo de bacilos curvos móviles microaerófilos aislados de la sangre de niños con disentería aguda, que designó como “vibriones relacionados” porque eran similares en muchos aspectos a *Vibrio fetus*.¹⁷⁴ King advirtió con suspicacia que los vibriones aislados de la sangre de los niños podrían estar íntimamente relacionados con el microorganismo descrito como *V. jejuni* por Jones en 1931, el cual podría ser más importante como causa de síndromes diarreicos infantiles de etiología desconocida de que lo se había creído.

Esta era una afirmación hipotética; no obstante, transcurrieron otros 15 años antes de que esta asociación tuviera sustento en el laboratorio. En 1972, Dekeyser y cols.⁷¹ aislaron los “vibriones relacionados” de las heces de pacientes con enteritis aguda utilizando una técnica de filtración que permitía que los pequeños bacilos curvos atravesaran la membrana pero retenía los microorganismos fecales más grandes. Siguieron otras distintas comunicaciones, que conectaron los vibriones relacionados (*V. fetus* subespecie *jejuni*; *C. jejuni*) con gastroenteritis en seres humanos, con una distribución en todo el mundo.^{26,27,164} Desde entonces, esta incidencia relativa ha sido la experiencia en la mayoría de los laboratorios clínicos, aunque durante los últimos años las tasas de aislamiento han disminuido en cierto grado.

La historia del descubrimiento de *Helicobacter pylori* (antes llamado *Campylobacter pyloridis* y luego *C. pylori*) es aun más reciente. Se adjudica a Warren y Marshall su “descubrimiento” en Perth, Australia, en 1982;³²⁸ sin embargo, han aparecido en la literatura médica muchas descripciones anteriores de microorganismos espiralados en muestras de biopsia de mucosa gástrica humana que se remontan a comienzos de este siglo.^{105,180} Poco después del cultivo exitoso de esta bacteria utilizando la singular “atmósfera para *Campylobacter*” se le ha prestado mucha atención, ya que puede ser la causa más frecuente de una infección, ya que puede ser la causa más frecuente de infección gastrointestinal humana y de gastritis.²⁵⁷

Clasificación de *Campylobacter* y taxones relacionados

La clasificación de los bacilos gramnegativos microaerófilos ha cambiado mucho en las últimas décadas. Vandamme y

cols.,^{317,320} utilizando distintas técnicas moleculares, como hibridación de DNA-rRNA, análisis de secuencia de RNA ribosómico (rRNA) 16S y análisis de inmunotipificación, determinaron que las especies de *Campylobacter* y los taxones relacionados pertenecen al mismo grupo filogenético, al que denominaron superfamilia rRNA VI. Cinco géneros, entre ellos *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* y “*Flexispira*” (más tarde ubicada en el género *Helicobacter*) fueron incluidos en la superfamilia rRNA VI. Las características que diferencian estos géneros relacionados se mencionan en el cuadro 8-1. Solnick y cols. también describieron dos microorganismos espiralados gástricos humanos no cultivables, “*Gastrosprillum hominis*” 1 y 2, que han identificado como helicobacterias mediante análisis de rRNA 16S y que nombraron provisoriamente “*Helicobacter heilmannii*”.²⁸⁷

Los estudios de Thompson y cols.³¹¹ mostraron que las especies bacterianas incluidas en la superfamilia rRNA VI podrían separarse en tres grupos rRNA distintos. Estos autores comunicaron que sólo los microorganismos que comprendían el grupo rRNA I (*C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. hyointestinalis*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*) eran verdaderas campilobacterias. Paster y Dewhirst²⁵² observaron una estrecha relación entre *Wolinella curva*, *Wolinella recta*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides ureolyticus* y las campilobacterias verdaderas que forman el grupo I de homología de RNA y sugirieron colocar todos los miembros del grupo de las campilobacterias en el género *Campylobacter*. Vandamme y cols.³²⁰ confirmaron los hallazgos de Thompson y cols.³¹¹ y Paster y Dewhirst²⁵² y propusieron una descripción corregida del género *Campylobacter* para incluir todos los microorganismos ubicados en el grupo I de homología y transferir *W. curva* y *W. recta* al género *Campilobacter* como *C. curvus* y *C. rectus*, respectivamente. Hace poco, Vandamme y cols.³¹⁶ propusieron la reclasificación de *B. gracilis* como *Campylobacter gracilis*. Sin embargo, aunque [*B. ureolyticus*] es considerado miembro de la familia *Campylobacteraceae*, hasta ahora no ha sido renombrado y queda una especie *incertae sedis* que espera el aislamiento y la caracterización de otras bacterias similares a *B. ureolyticus*.

El grupo rRNA II contenía un conjunto homogéneo de microorganismos para los cuales Vandamme y cols.³²⁰ propusieron la designación de género de *Arcobacter*, el cual incluye ahora *Arcobacter* actualmente incluye *Arcobacter nitrofigilis* (antes *Campylobacter nitrofilis*), *Arcobacter cryaerophilus* (antes *Campylobacter cryaerophila*), *Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri* y *Arcobacter skirrowii*.^{172,322}

El grupo rRNA III contenía miembros de tres géneros diferentes: *Helicobacter*, *Wolinella*, “*Flexispira*” y una especie sin nombre, CLO-3. Vandamme y cols. corrigieron la descripción del género *Helicobacter* y propusieron la transferencia de *Campylobacter cianedi* y *C. fennelliae* al género *Helicobacter*

Cuadro 8-1 Características para diferenciar *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Helicobacter* y "*Flexispira*"

GÉNERO	REDUCCIÓN DE NITRATOS	CRECIMIENTO EN GLICINA AL 0,5%	HIDRÓLISIS DE UREA	CRECIMIENTO A			MORFOLOGÍA CELULAR	VAINAS FLAGELARES
				15 °C	30 °C	42 °C		
<i>Arcobacter</i>	+	ND	V	+	+	—	Bacilos curvos y espiralados	Ausentes
<i>Campylobacter</i>	+	V	—	—	+	V	Bacilos curvos y espiralados	Ausentes
<i>Wolinella</i>	+	—	—	—	—	D	Espiralados	Ausentes
<i>Helicobacter</i>	V	+	V	—	V	V	Bacilos curvos y espiralados	Presentes
" <i>Flexispira</i> "	—	+	+	—	—	+	Bacilos fusiformes rectos	Presentes

+: 90% o más de las cepas son positivas; —: 90% o más de las cepas son negativas; V: variable, 11%-89% de las cepas son positivas; D: reacción débil; ND: no disponible.
Modificado de Vandamme P, Falsen E, Rossau R et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41:88-103, 1991.

como *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, respectivamente.³²⁰ "*Flexispira*" está incluido ahora en el género *Helicobacter*. *Wolinella succinogenes* se mantiene como la única especie del género *Wolinella*.

Especies de *Campylobacter*

Las especies de *Campylobacter* son bacterias espiraladas curvas microaerófilas (necesitan menos O₂) y capnófilas (necesitan más CO₂), móviles por medio de un único flagelo polar sin vaina. Estos microorganismos tienen un metabolismo no fermentador y no oxidativo, y obtienen energía del uso de aminoácidos y los intermediarios de cuatro y seis carbonos del ciclo de Krebs. Se los solía clasificar con las especies de *Vibrio*, hasta que algunos estudios de homología del DNA mostraron que no estaban relacionados con los vibriones. Aun entre las especies de *Campylobacter* actualmente reconocidas, existe gran diversidad genotípica y fenotípica. Los microorganismos habitan una amplia variedad de nichos ecológicos y ambientes. La mayoría de las especies se encuentran en los animales (ganado vacuno y porcino) y causan esterilidad y aborto.

CAMPYLOBACTER JEJUNI SUBESPECIE JEJUNI

Importancia clínica. *C. jejuni* subespecie *jejuni* es el patógeno humano más importante entre las campilobacterias. Tiene una distribución mundial y en los países industrializados se aísla en muestras de deposiciones diarreicas entre dos a siete veces más que *Salmonella* o *Shigella*.¹⁰ También es ubicuo en animales domésticos; las mascotas domésticas pueden portarlo y la gran mayoría de los pollos, pavos y aves acuáticas están colonizados.¹¹⁹ La leche cruda,^{56,324} aves parcialmente cocidas¹¹⁹ o agua contaminada^{48,163} son las fuentes frecuentes de infecciones humanas.¹⁰⁷ La enteritis con este microorganismo se caracteriza por dolor abdominal cólico, diarrea sanguinolenta, escalofríos y fiebre. En la mayoría de las personas, la infección es autolimitada y se resuelve en 3 a 7 días. El microorganismo puede seguir siendo excretado por los pacientes convalecientes durante 2 semanas a 1 mes. En casos de enfermedad grave, el paciente puede ser tratado con eritromicina por vía oral.

Aunque la enteritis y los síndromes diarreicos siguen siendo las manifestaciones más frecuentes de las infecciones por *Campylobacter*, otras enfermedades han surgido durante los últimos años. Se han informado casos de artritis séptica, meningitis y proctocolitis secundarios a *C. jejuni*.²⁶³ Existen

varias comunicaciones que asocian la infección por *C. jejuni* con el síndrome de Guillain-Barré, una enfermedad desmielinizante aguda de los nervios periféricos.^{122,182,270,290} Los datos de estudios serológicos y de cultivos muestran que entre el 20-40% de los pacientes con síndrome de Guillain-Barré están infectados por *C. jejuni* 1 a 3 semanas antes del inicio de los síntomas neurológicos.¹¹ Sin embargo, el riesgo de aparición del síndrome después de la infección por *C. jejuni* es muy pequeño (< 1 caso de síndrome de Guillain-Barré/1 000 infecciones por *C. jejuni*).¹⁰ No hay ninguna relación entre la gravedad de los síntomas gastrointestinales y la probabilidad de desarrollar síndrome de Guillain-Barré después de la infección por *C. jejuni*; y de hecho, aun infecciones asintomáticas pueden desencadenarlo.¹¹ En los Estados Unidos y Japón, el 30-80% de las cepas de *C. jejuni* de pacientes con síndrome de Guillain-Barré pertenecen al serotipo Penner 0:19.^{11,108} Recientemente, la infección por *C. jejuni* se ha asociado con enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado (también denominada enfermedad de las cadenas alfa).¹⁹¹ Una revisión de la epidemiología, la patogenia y las características clínicas de la infección por *C. jejuni* ha sido escrita por Allos.¹⁰

Identificación presuntiva en las heces. Puede ser posible hacer un diagnóstico presuntivo de enteritis por *Campylobacter* observando formas curvas, con forma de S, en alas de gaviota o espiraladas largas gramnegativas características en los preparados teñidos con Gram de las deposiciones diarreicas (véase lámina en color 8-1A). Se podría considerar examinar preparados húmedos o frotis teñidos de todas las muestras de deposiciones diarreicas para leucocitos polimorfonucleares y la presencia de formas bacterianas sugestivas de especies de *Campylobacter*. Las muestras de heces para especies de *Campylobacter* no son sometidas a otros procesamiento en algunos laboratorios a menos que se presenten leucocitos polimorfonucleares. El fundamento para esta práctica es que es poco probable que las especies de *Campylobacter* se aislen en cantidades clínicamente importantes de las muestras de heces desprovistas de leucocitos. El insumo de tiempo y el uso de medios de cultivo especiales para las muestras en las cuales existen pocas posibilidades de recuperar una cantidad importante de microbios no se considera un enfoque eficaz en relación con el costo.

Métodos para el aislamiento de laboratorio. El aislamiento exitoso de *C. jejuni* de las heces depende del uso de medios selectivos (p. ej., Campy-Thio, Campy-BAP), la incubación a temperatura ambiente (42 °C) y la atmósfera apropiada de incubación (oxígeno al 5%, CO₂ al 10%, nitrógeno al 85%). Se ha comu-

Cuadro 8-2 Procedimientos utilizados por distintos investigadores para crear un medio microaerófilo apropiado para el cultivo de especies de *Campylobacter*

INVESTIGADORES	PROCEDIMIENTO
Buschfeld y cols. ²⁰¹ Evacuación-reposición	Se extrajo el 75% del aire de una jarra de anaerobiosis y se rellenó a presión atmosférica con una mezcla de 10% de CO ₂ y 90% de N ₂ . Se incubaron seis placas de medios en una jarra
Serbert y cols.* Evacuación-reposición	Se extrajo el 75% de aire de una olla a presión modificada mediante una evacuación doble del recipiente hasta -38 cm de Hg y se rellenó con una mezcla de 10% de CO ₂ y 90% de N ₂ a presión atmosférica. Las placas ocuparon no más del 50% del volumen del recipiente

*Serbert GA, Hollis DG, Weaver RE et al.: 30 years of campylobacters: Biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 15:1065-1067, 1982.

modo que una técnica de filtración de membrana que se utiliza con placas de agar sangre no selectivas es tan eficaz como el uso de medios selectivos para el aislamiento de *C. jejuni*.²⁹⁵ Este método tiene la ventaja de permitir el aislamiento de campylobacterias sensibles a los antibióticos. En las últimas décadas se han utilizado medios de cultivo selectivos y condiciones especiales de incubación necesarios para aislar especies de *Campylobacter* en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica.

Se pueden utilizar varios procedimientos para proporcionar una atmósfera gaseosa apropiada para el cultivo de campylobacterias microaerófilas. Éstos incluyen procedimientos de succión y llenado de gases, uso de generadores descartables y del principio de Fortner. Dos de estos procedimientos, utilizados con éxito por distintos investigadores, se señalan en el cuadro 8-2. No se recomienda el uso de una estufa con CO₂ para incubar campylobacterias porque sólo crecen cepas que son muy aerotolerantes en la atmósfera provista. Asimismo, no se recomienda la jarra de anaerobiosis por extinción con vela porque el nivel de oxígeno (12% a 17%) es demasiado alto para el crecimiento óptimo de las campylobacterias.^{201,237}

Se han creado varios medios selectivos para permitir el aislamiento de *C. jejuni* en heces. Merino y cols.²¹⁷ evaluaron la eficacia de siete medios de aislamiento selectivos para *Campylobacter*. Los nombres de estos medios, su composición y un resumen de la evaluación de cada uno de ellos se presentan en el cuadro 8-3. En la mayoría de los laboratorios clínicos se ha utilizado el medio selectivo de Butzler, el medio de Blaser (Campy-BAP) y agar sangre de Skirrow. Sin embargo, Merino y cols.²¹⁷ hallaron que con el medio sin sangre de Preston para *Campylobacter* con cefoparazona se lograba el mayor número de aislamientos de *C. jejuni*. Karmali y cols. observaron que un medio selectivo sin sangre y basado sobre carbón (CSM), que consiste en base de agar de Columbia, carne activado, hematina, piruvato de sodio, cefoparazona, vancomicina y cicloheximida, es más selectivo que el medio de Skirrow y tiene una tasa de aislamiento mayor de *C. jejuni* de cultivos mixtos. El carbón, la hematina, el sulfato ferroso y el piruvato de sodio sirven como sustitutos de la sangre en los medios de crecimiento para campylobacterias. Se agrega caseína para ayudar a crecer a ciertas cepas de campylobacterias termófilas resistentes al ácido nalidixico que son microorganismos ambientales.

Endtz y cols.⁸² compararon un medio para motilidad selectivo sin sangre semisólido¹¹⁷ con dos CSM sin sangre, dos medios con base de sangre (medio de Skirrow y Campy-BAP de Blaser) y la técnica de filtro de membrana. Observaron que

el CSM era el medio único mejor; sin embargo, se notaron las tasas más altas de aislamiento cuando se utilizó CSM combinado con cualquier otro medio o con la técnica de filtro. Endtz y cols. también informaron que prolongar el tiempo de incubación de 48 a 72 horas condujo a un aumento de la tasa de aislamiento cualquiera que fuera el medio utilizado.⁸²

Se pueden inocular hisopados rectales o muestras de hisopos de heces directamente en un área pequeña sobre la superficie de uno de los medios selectivos con agar recomendados. Las muestras de heces formadas también pueden procesarse emulsiificando una pequeña porción (del tamaño de un maní) en solución salina con buffer de fosfato o calcio antes de inocular 1 o 2 gotas en la superficie del agar con una pipeta de Pasteur; asimismo, se pueden inocular directamente 1 o 2 gotas de muestras de heces líquidas.

En el recuadro 8-1 se muestra un bosquejo del procedimiento que permitirá el aislamiento de campylobacteres entéricos de muestras de heces. Esta técnica es compatible con la información actual de la literatura especializada acerca de los requerimientos para el cultivo de estas bacterias y su uso es apropiado en la mayoría de los laboratorios clínicos.

Se puede utilizar una técnica alternativa de filtro de membrana, como la descrita por Steele y McDermott,²⁹⁵ combinada con un medio selectivo para *Campylobacter* con resultados equivalentes (véanse lámina en color 8-1B y recuadro 8-2).

En general, no se recomienda el uso sistemático del "caldo Campy" de enriquecimiento. Los caldos de enriquecimiento pueden ser beneficiosos si las muestras de heces se retardan en el tránsito o si se dejan a temperatura ambiente demasiado tiempo. Cada director de laboratorio debe decidir si un caldo de enriquecimiento será beneficioso sobre la base de los patrones de enfermedades locales y en qué medida se podría controlar la recolección y el transporte de muestras de calidad. Como las campylobacterias son microaerófilas, tienden a crecer mejor cerca de la parte superior del tubo. Si se utiliza un caldo para *Campylobacter*, se debe seguir el siguiente procedimiento para el subcultivo:

Utilizar una pipeta plástica de polietileno de marca Falcon que se puede invertir. Colocar el extremo de la pipeta 2,5 cm por debajo de la superficie del medio y extraer continuamente una muestra a medida que se retira la pipeta. Invertir la pipeta para facilitar la mezcla de la muestra, colocar 3 gotas en una placa Campy-BAP y sembrar en estría para el aislamiento. Incubar como si se hiciera una placa de cultivo primario.

Identificación para cultivo. La aparición de colonias en uno de los medios selectivos con agar para *Campylobacter* que ha sido incubado a 42 °C en la atmósfera descrita antes ya constituye

Cuadro 8-3 Fórmulas para medios selectivos para el aislamiento de *Campylobacter jejuni*

MEDIO	BASE	ADITIVOS
Medio selectivo de Butzler	Medio de tioglicolato líquido (Difco Laboratories, Detroit MI)	Agar (3%) Sangre de carnero (10%) Bacitracina (25 000 UI/L) Novobiocina (5 mg/L) Colistina (10 000 UI/L) Cefalotina (15 mg/L) Actidiona (50 mg/L)
Agar-sangre de Skirrow	Base de agar sangre 2 (Oxoid)	Sangre de caballo lisada (7%) Vancomicina (10 mg/L) Polimixina B (2 500 UI/L) Trimetoprim (5 mg/L)
Medio de Blaser (Campy-BAR)	Base de agar para brucelas (Becton Dickinson, Microbiology Systems, Cockeysville, MD)	Sangre de carnero (10%) Vancomicina (10 mg/L) Trimetoprim (5 mg/L) Polimixina B (2 500 UI/L) Cefalotina (15 mg/L) Anfotericina B (2 mg/L)
Medio selectivo para <i>Campylobacter</i> de Preston	Caldo de nutrientes 2 (Oxoid CM67) Agar de Nueva Zelanda al 1,2%	Sangre de caballo lisada con saponina al 5% Trimetoprima (10 µg/mL) Polimixina B (5 UI/mL) Rifampicina (10 µg/mL) Cicloheximida (100 µg/mL)
Medio sin sangre para <i>Campylobacter</i> de Preston	Caldo de nutrientes 2 (Oxoid CM67) Agar de Nueva Zelanda al 1,2%	Carbón bacteriológico Desoxicolato de sodio Sulfato ferroso Piruvato de sodio Hidrolizado de caseína Cefoperazona (32 mg/L)
Medio para viriones de Butzler	Base de agar de Columbia (Oxoid CM331)	Sangre de carnero desfibrinada Cefoperazona (15 mg/L) Rifampicina (10 mg/L) Colistina (10 000 U/L) Anfotericina B (2 mg/L)
Medio de Preston modificado	Caldo de nutrientes 2 (Oxoid)	Sangre de caballo desfibrinada al 7% Cefoperazona (32 mg/L) Anfotericina B (2 mg/L) Suplemento de crecimiento para <i>Campylobacter</i> (Oxoid)
Medio selectivo sin sangre con base de carbón	Base de agar de Columbia (GIBCO)	Carbón activado (Oxoid) Hematina (0,032 g/L) Piruvato de sodio (0,1 g/L) Vancomicina (20 mg/L) Cefoperazona (32 mg/L) Cicloheximida (100 mg/L)

Datos tomados de Karmali MA, Simer AE, Roscoe M et al.: Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* 23:456-459, 1986; y Merino FJ, Agulla A, Villasante PA et al.: Comparative efficacy of seven selective media for isolating *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 24:451-452, 1986.

una prueba presuntiva de que el microorganismo pertenece a una de las especies de *Campylobacter* termófilos (principalmente *C. jejuni*). La morfología de las especies de *Campylobacter* en agar selectivo varía desde colonias grises, planas y de forma irregular que pueden ser secas o húmedas

hasta colonias redondeadas, convexas y brillantes con bordes definidos (lámina en color 8-1C, D). Las colonias tienden a formar un crecimiento confluyente a lo largo de las líneas de siembra sobre la superficie del agar. No se observan reacciones hemolíticas en agar sangre. La identificación puede confirmar-

Recuadro 8-1 Procedimiento para el aislamiento de *C. jejuni* y otras especies de *Campylobacter* entéricas de las muestras de heces

1. Utilizando una muestra de heces o una muestra de hisopo en un medio de Cary-Blair, preparar una suspensión turbia de las heces en 10 mL de caldo-infusión de encéfalo-corazón. Inocular inmediatamente una o dos placas (es preferible dos placas) de un medio selectivo para *Campylobacter* (los mejores resultados se obtienen con CSM como se señala en el texto); sembrar en estría para obtener colonias aisladas y mantener una jarra con nitrógeno (véase cap. 14) hasta inocular los medios restantes.
2. Centrifugar ligeramente la muestra (aproximadamente a 1 000 g) durante 5 minutos.
3. Extraer aproximadamente 5 mL del sobrenadante con una jeringa y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.65 µL estéril, según lo describió Butzler.⁴¹ Descartar los 3 mL primeros de líquido y utilizar 1 o 2 gotas del resto para inocular dos placas de agar chocolate sin agentes selectivos o un medio de agar sangre como el agar sangre para anaerobios de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) que sostendrá el crecimiento de *Campylobacter*. Sembrar en estrías para el aislamiento.
4. Incubar un conjunto de placas de agar selectivo para *Campylobacter* y agar chocolate a 42 °C en una atmósfera de O₂ al 5%, CO₂ al 10% y N₂ al 85% y las placas restantes a 35 °C a 37 °C en la misma atmósfera gaseosa.
5. Inspeccionar las placas después de 24, 48 y 72 horas de incubación para las colonias características de las especies de *Campylobacter* e identificar las cepas con las técnicas descritas en el texto. Las placas que no muestren crecimiento después de 24 o 48 horas de incubación deben ser retornadas durante otras 24 a 48 horas en las mismas condiciones de estufa y atmosféricas gaseosas, como ya se describió.

Además, realizando pruebas rápidas de catalasa y citocromo oxidasa (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* dan pruebas positivas en caldo). En ocasiones, algunas especies bacterianas termófilas distintas de las especies de *Campylobacter*, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, aparecen y crecen en los medios selectivos. Sin embargo, es poco probable confundir *P. aeruginosa* con *C. jejuni*. La morfología de las colonias de los dos microorganismos es diferente; si existiera alguna duda, una tinción de Gram diferenciaría rápidamente las especies de *Campylobacter* de *P. aeruginosa*.

Los preparados teñidos con Gram de colonias de *C. jejuni* después de 24 a 48 horas de incubación en agar sangre muestran formas espiraladas curvas, con forma de "S", en alas de gaviota o alargadas gramnegativas características (véase lámina en color 8-1A). Las formas cocoides se observan más a menudo en los cultivos más viejos de *C. jejuni*, sobre todo después de la exposición de las colonias a temperatura ambiente. Es importante el cumplimiento estricto del tiempo habitual que requiere la tinción de Gram porque las especies de *Campylobacter* típicamente tienen una tinción débil. Por esta razón, se podría considerar extender el tiempo de tinción de la contratincción de safranina al menos a los 10 minutos para permitir mayor intensidad de tinción.

Una vez aisladas, ambas especies de *C. jejuni* pueden identificarse con facilidad dado que son las únicas campilobacterias que hidrolizan el hipurato (véanse lámina en color 8-1E y cuadro 8-4). Además, esta especie es resistente a la cefalotina y puede ser sensible al ácido nalidíxico, aunque en ocasiones se observan cepas resistentes (véase lámina en color 8-1F).

OTRAS ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER*

***C. coli*.** *C. coli* está estrechamente relacionado con *C. jejuni* y también es un patógeno de relevancia que se transmite por vía alimentaria en los seres humanos.³⁰³ Comparte varias características de cultivo con *C. jejuni*, como la sensibilidad al ácido nalidíxico y la resistencia a la cefalotina. Puede ser diferenciado de *C. jejuni* por la prueba de hidrólisis de hipurato (*C. jejuni* hidroliza hipurato; *C. coli* no lo hace). El informe cuando se aísla este microorganismo en los laboratorios en los cuales no se realiza la prueba de hipurato debe decir "*C. jejuni/coli*". Se calcula que *C. coli* explica el 5-10% de los casos de enteritis por *Campylobacter* en los seres humanos.²²⁸ También se ha comunicado un caso de infección de las vías urinarias causado por *C. coli* resistente a las quinolonas.²⁵¹

***C. concisus*.** *C. concisus* es capaz de tener un crecimiento anaerobio y requiere hidrógeno o formato para su crecimiento. El microorganismo se aísla principalmente de los surcos gingivales humanos. Sin embargo, también puede causar enfermedad gastrointestinal, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos.^{1,190,318} La recuperación de *C. concisus* de muestras de heces requiere el uso del método del filtro (explicado en otra parte de este capítulo).

***C. fetus subespecie fetus*.** *C. fetus subespecie fetus* se asocia fundamentalmente con aborto infeccioso en ganado vacuno y ovejuno y es una causa poco frecuente de infecciones humanas. En general, las infecciones causan enfermedad sistémica y suelen afectar a las personas debilitadas por afecciones hepáticas, nefropatías crónicas, neoplasias o por inmunosupresión.^{49,256} Se ha comunicado que *C. fetus subespecie fetus* produce proctitis y proctocolitis en varones homosexuales;⁷⁴ trabajo de parto prematuro y sepsis neonatal en seres humanos;⁵⁰ aborto séptico;²⁹⁸ meningitis neonatal;¹⁸⁵ infección de prótesis de articulación de la cadera^{19,333} y endocarditis tanto en válvula nativa como protésica.⁸⁸ Antes no se creía que el microorganismo produjera gastroenteritis, pero debido a su sensibilidad a la cefalotina y su falta de crecimiento a 42 °C, es posible que no se lo aísla en los laboratorios clínicos donde se utilizan medios selectivos y un aumento de las temperaturas de incubación como un cribado para *C. jejuni*; por lo tanto, no se conoce su papel etiológico en esta infección.¹²⁷

***C. fetus subespecie venerealis*.** *C. fetus subespecie venerealis* constituye parte de la flora normal del tracto genital de los toros, pero no ha sido asociado con infecciones en humanos.²⁸³

***C. helveticus*.** *C. helveticus* es un *Campylobacter* catasala negativo y termófilo que ha sido aislado en las heces de gatos y perros domésticos.²⁹² Cabe destacar el hecho de que casi el

Recuadro 8-2 Técnica de filtro por membrana de Steele y McDermott

1. Mezclar 1 g de heces en 10 mL de solución salina estéril que contenga cuentas de vidrio. Utilizar mezclador eléctrico durante 30 segundos.
2. Colocar un filtro de membrana de triacetato de celulosa de Gelman 0.45 de 47 mm (Gelman 63069) centralmente sobre la superficie de una placa de agar para *Brucella* no selectivo que contenga agar sangre de carnero al 5%.
3. Colocar 8 a 10 gotas de suspensión de heces sobre la superficie del filtro con una pipeta de Pasteur. Tenga cuidado de que las gotas no se extiendan hasta el borde del filtro.
4. Retirar el filtro y esperar 30 minutos después de aplicar la suspensión.
5. Incubar la placa en medioambiente Campy como ya se describió.

Cuadro 8-4 Características diferenciales de campilobacterias y taxones relacionados de importancia clínica

MICROORGANISMO	CATALASA	NITRATO	SULFURO DE HIDRÓGENO- TRIPLE AZÚCAR- HIERRO	UREASA	ACETATO DE INDOXILO	HIPURATO	CRECIMIENTO					SENSIBILIDAD*				
							25 °C	37 °C	42 °C	Mac- Conkey	TMAO al 0,1%	NaCl al 1,5%	Glicina al 1%	Ácido nalidíxico	Cefalotina	
Grupo RNA I																
<i>Campylobacter coli</i>	+	+	—	—	+	—	—	+	+	+	—	—	+	V	R	
<i>C. concisus</i>	—	+	+	—	—	—	—	+	C	+	—	+	C	R	R	
<i>C. curvus</i>	—	+	+	—	V	V	—	+	V	V	ND	ND	+	C	S	
<i>C. fetus</i> subespecie <i>fetus</i>	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+	—	I	+	V	S	
<i>C. fetus</i> subespecie <i>venerealis</i>	V	+	—	—	—	—	+	+	—	+	—	V	—	V	S	
<i>C. gracilis</i>	—	+	—	—	V	—	—	+	V	V	ND	ND	+	V	S	
<i>C. helveticus</i>	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—	—	ND	V	S	S	
<i>C. hyointestinalis</i> subespe- cie <i>hyointestinalis</i>	+	+	+	—	—	—	V	+	+	+	+	—	+	R	S	
<i>C. hyointestinalis</i> subespe- cie <i>lawsonii</i>	+	+	+	—	—	—	—	+	+	V	ND	ND	V	R	S	
<i>C. jejuni</i> subespecie <i>jejuni</i>	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	+	V	R	
<i>C. jejuni</i> subespecie <i>doylei</i>	V	—	—	—	+	+	—	+	D	—	—	—	+	S	S	
<i>C. lari</i>	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	R	R	
<i>C. mucosalis</i>	—	+	+	—	—	—	C	+	+	+	C	C	C	C	S	
<i>C. rectus</i>	—	+	+	—	+	—	—	+	D	—	ND	ND	+	V	S	
<i>C. showae</i>	+	+	+	—	V	—	—	+	V	+	ND	ND	V	S	S	
<i>C. sputorum</i> biovariedad <i>bubulus</i>	—	+	+	—	—	—	—	+	C	—	+	+	+	R	S	
<i>C. sputorum</i> biovariedad <i>fecalis</i>	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	R	S	
<i>C. sputorum</i> biovariedad <i>sputorum</i>	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	C	+	+	V	S	
<i>C. upsaliensis</i>	— (d)	+	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	C	S	S	

50% de las cepas de *Campylobacter* halladas en gatos pertenecen a *C. helveticus*.³⁹ Las colonias de *C. helveticus* son adherentes en agar sangre y pueden ser separadas de otras especies termófilas (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*) en virtud de una reacción de catalasa negativa. La prueba de acetato de indoxilo es positiva y la bacteria es sensible al ácido nalidíxico y a la cefalotina.

C. hyoilei. *C. hyoilei* es el nombre para un grupo de bacterias similares aisladas en las lesiones intestinales de cerdos afectados por enteritis proliferativa.⁸ No se han comunicado cepas humanas.

C. hyointestinalis. *C. hyointestinalis*, estrechamente relacionado con *C. fetus* subespecie *fetus*, fue hallado al principio sólo en animales, sobre todo como causa de ileítis en cerdos.¹¹⁰ pero hace poco se ha informado en muestras clínicas humanas. En una comunicación, se aisló *C. hyointestinalis* de muestras de heces de cuatro personas, con diarrea acuosa no sanguinolenta. La persona más joven (8 meses) y la más anciana (79 años) fueron mujeres; los otros dos fueron varones homosexuales.⁸⁰ Se ha comunicado en Francia el caso de una mujer de 52 años con leucemia mieloide crónica y diarrea acuosa no sanguinolenta asociada con este microorganismo,²²⁰ y el aislamiento del mismo en un varón homosexual con proctitis en los Estados Unidos.⁹⁰ *C. hyointestinalis* no se aísla en muchas fórmulas de medios para *Campylobacter* porque es sensible a las cefalosporinas, como cefalotina y cefoperaxona. Aunque crece a 42 °C, el crecimiento es más exuberante a 35 °C.⁹⁰ El microorganismo también es resistente al ácido nalidíxico, es hipurato negativo y produce sulfuro de hidrógeno en agar triple azúcar hierro. La producción de sulfuro de hidrógeno en agar triple azúcar hierro depende de la prueba que se incubaba en un medioambiente microaerófilo que contiene hidrógeno.¹¹⁰

Se describió un grupo de microorganismos "similares a *C. hyointestinalis*" obtenidos de estómagos porcinos. Estas cepas son suficientemente diferentes de *C. hyointestinalis* como para justificar la creación de una clasificación separada de las subespecies, *C. hyointestinalis* subespecie *lawsonii*.²⁴⁵ La creación de esta nueva subespecie requiere corregir la descripción de *C. hyointestinalis* a *C. hyointestinalis* subespecie *hyointestinalis*. *C. hyointestinalis* subespecie *lawsonii* puede ser separada de la subespecie *hyointestinalis* por su falta de crecimiento en bilis al 1,5%. *C. hyointestinalis* subespecie *lawsonii* ha sido aislado en el intestino y el estómago de cerdos; los intestinos de hámsteres y las heces de vacas, ciervos y seres humanos; pero su patogenicidad no se conoce.²⁴⁵

C. jejuni subespecie doylei. Se ha aislado una nueva subespecie de *C. jejuni* de muestras clínicas humanas que incluyen biopsias de epitelio gástrico¹⁶⁶ y heces de niños con diarrea.²⁹⁶ La patogenicidad del microorganismo sigue siendo desconocida. *C. jejuni* subespecie *doylei* puede distinguirse con facilidad de otras campilobacterias porque no reduce los nitratos ni hidroliza el hipurato.²⁹⁶ Es sensible a la cefalotina y, por lo tanto, no se aísla en medios que contienen antibióticos tipo cefalosporinas.

C. lari. Antes llamado *C. laridis*, el microorganismo conocido ahora como *C. lari* es termófilo, halotolerante y resistente al ácido nalidíxico; por otra parte, comparte varias características con *C. jejuni* y *C. coli*.²⁸² El crecimiento anaerobio en presencia de óxido de trimetilamida (TMAO) al 0,1% y la falta de hidrólisis de acetato de indoxilo ayudan a identificar esta especie (reactivos disponibles en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Muchos laboratorios se basan sobre la resistencia al ácido nalidíxico para separar *C. lari* de *C. jejuni* y *C. coli*; sin embargo, se está observando *C. jejuni* resistente al ácido nali-

díxico con mayor frecuencia. *C. lari* es endémico en gaviotas marinas, pero es un patógeno humano infrecuente. Sin embargo, en ocasiones, produce enteritis que simula las infecciones por *C. jejuni* y pocas veces, bacteriemia, sobre todo en personas inmunodeprimidas.^{21, 58, 209, 230, 306}

C. mucosalis. *C. mucosalis*, antes clasificado como *C. sputorum* subespecie *mucosalis*, produce un pigmento amarillo y es catalasa negativo. Desde el punto de vista fenotípico, es muy similar a *C. sputorum* biovariedad *sputorum* y *bubulus* pero es capaz de crecer a 25 °C. A diferencia de la mayoría de las campilobacterias, esta especie necesita hidrógeno y formato como dador de electrones para su crecimiento, un requerimiento esencial de *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. curvus* y *C. rectus*.³¹⁷ Figura y cols.⁹² comunicaron lo que se pensó que fue el primer aislamiento de *C. mucosalis* de niños con enteritis. No obstante, este hallazgo ha sido discutido y se ha demostrado mediante estudios de sonda molecular que las cepas eran *C. concisus*.^{186, 188, 242} Es difícil separar estas dos especies sobre la base de pruebas bioquímicas solas y se ha sugerido que se deben utilizar métodos moleculares para su identificación precisa.¹⁸⁸ On²⁴² propuso el uso de varios medios que contienen distintos agentes inhibidores para separar *C. concisus* y *C. mucosalis*. Hasta ahora no existe ninguna comunicación confirmada que asocie *C. mucosalis* con infección humana.

C. showae. *C. showae* es una especie recién descrita aislada de los surcos gingivales humanos.⁸⁴ Es un bacilo recto con extremos redondeados que contiene dos a cinco flagelos unipolares sin vaina, característica singular entre las campilobacterias. El microorganismo crece en una atmósfera microaerófila en presencia de fumarato con formato o H₂, pero prefiere crecer en condiciones anaerobias. Debido a la cantidad limitada de rasgos bioquímicos confiables que se pueden utilizar para diferenciar las especies de *Campylobacter* estrechamente relacionadas, pueden ser necesarias pruebas serológicas o moleculares o perfiles proteicos para identificar positivamente esta especie.⁸⁴ No se ha demostrado una asociación con ninguna enfermedad humana.

C. sputorum. *C. sputorum* es capaz de crecimiento anaerobio y puede ser aislado de la cavidad bucal y de los surcos gingivales de los seres humanos. Si bien no se lo reconoce como agente de enfermedad humana, se han informado algunas cepas clínicas. Se describen tres biovariedades: *C. sputorum* biovariedad *bubulus*, *C. sputorum* biovariedad *sputorum* y *C. sputorum* biovariedad *fecalis*.²⁶⁹

C. upsaliensis. *C. upsaliensis* es catalasa negativo o sólo débilmente positivo y por lo tanto se la ha denominado cepa CNW de *Campylobacter*. Sin embargo, como pueden ocurrir también reacciones catalasa débiles para *C. jejuni* subespecie *doylei*, ya no se mantiene la designación CNW. A excepción de la falta de producción de catalasa o por su producción débil, este microorganismo comparte varias características con campilobacterias patógenas. Es termófilo (crece a 42 °C) y altamente sensible a los fármacos presentes en medios de aislamiento selectivos, lo que los vuelve inapropiados para el aislamiento de *C. upsaliensis*.²⁹⁷ Goossens y cols.¹¹⁶ informaron el aislamiento de 99 cepas de *C. upsaliensis* mediante el método del filtro y sólo se recuperaron cuatro cepas simultáneamente de medios selectivos.

Los animales domésticos pueden servir como reservorio de esta especie, aislada por primera vez de perros sanos, perros con diarrea y, más tarde, de gatos asintomáticos.^{102, 276} Los datos provenientes de algunos informes indican que puede ser un agente oportunista de infecciones en los niños. Lastovica y cols.¹⁸⁷ comunicaron la recuperación de *C. upsaliensis* de

hemocultivos de 16 pacientes, 10 de los cuales tenían 10 meses de edad o menos. Walmsley y Karmali¹³²⁶ comunicaron su aislamiento de las deposiciones de seis niños. Otros informes asocian el aislamiento de *Campylobacter upsaliensis* de la sangre de pacientes con enfermedad subyacente grave.^{43,60} Existe una comunicación de *C. upsaliensis* aislado en la sangre y el material fetoplacentario de una mujer embarazada de 18 semanas que sufrió un aborto espontáneo.¹²⁰ La paciente no tenía ninguna enfermedad subyacente y su único embarazo previo no tuvo complicaciones. El análisis numérico de los perfiles proteicos puso en evidencia que las cepas aisladas en la paciente y en un gato doméstico sano eran casi idénticas, lo que implicó que el gato podría haber sido la fuente de la infección.¹²⁰ La única comunicación de *C. upsaliensis* en un sitio distinto de la sangre o las heces fue la de un caso de un absceso mamario en el cual se aisló *C. upsaliensis* junto con una especie de *Propionistreptococcus* en el exudado purulento obtenido por aspiración con aguja fina del sitio infectado.¹⁰⁹ Sandstedt y Krasig²⁷⁷ describieron a *C. upsaliensis*, incluidas sus características fenotípicas y su importancia clínica.

ESPECIES DE *WOLINELLA* Y *BACTEROIDES* INCLUIDAS EN LA FAMILIA *CAMPYLOBACTERIACEAE*

Tanner y cols., en sus estudios de la taxonomía de los bacilos gramnegativos anaerobios que deprimen el agar colocaron las cepas inmóviles en el género *Bacteroides* y a las cepas móviles en el grupo de "vibriones anaerobios" (que incluyen *Wolinella recta*, *W. curva* y *Campylobacter concisus*).^{304,305} Las cepas inmóviles son separadas sobre la base de la producción de ureasa en *B. ureolyticus* (ureasa positiva) y *B. gracilis* (ureasa negativa; véase cuadro 8-5). Todas estas especies están incluidas ahora en la familia *Campylobacteriaceae* y se las considera verdaderas campilobacterias.^{317,320}

***B. gracilis*.** El nombre *Bacteroides gracilis* fue propuesto por Tanner y cols.³⁰⁴ para un grupo de bacterias que corroen el agar originariamente consideradas anaerobias. En 1995, Vandamme y cols. propusieron la transferencia de este microorganismo al género *Campylobacter* como *C. gracilis*.³¹⁶ Estas bacterias se encuentran en los surcos gingivales de seres humanos y han sido aisladas primariamente de sitios de infección tisular profunda. Johnson y cols. informaron que el 83% de las muestras en las cuales se aisló *C. gracilis* se obtuvieron de pacientes con infecciones viscerales graves o de cabeza y cuello.¹⁰⁹ *C. gracilis* es microaerófilo y asacarolítico y se asemeja a las campilobacterias en casi todas las características fenotípicas. Las células individuales se tiñen como gramnegativas y son pequeñas y no ramificadas, y a menudo tienen extremos aguzados como redondeados. El crecimiento es estimulado en cultivos de caldo por el formato y el fumarato. Pueden diferenciarse de otras campilobacterias por la ausencia de flagelos y de actividad de oxidasa.³⁰⁴ Las cepas de *C. gracilis* parecen menos sensibles a los antibióticos que las especies estrechamente relacionadas [*B. ureolyticus*], y se ha comunicado que sólo el 67% son sensibles a la penicilina.¹⁵⁵ Se describió un medio selectivo para el aislamiento de *C. gracilis* que contiene base de agar tripticasa soja, formato, fumarato, nitrato y dos agentes selectivos: ácido nalidíxico y teicoplanina.³¹⁶

***Bacteroides ureolyticus*.** El análisis de secuencia de RNA ribosómico ubica claramente a [*B. ureolyticus*] como miembro de la familia *Campylobacteriaceae*; sin embargo, no está claro si se ramifica fuera del grupo *Campylobacter* (y debe ser colocado en un género nuevo) o dentro de él (y debe ser incluido en el

género *Campylobacter*).³¹⁶ [*B. ureolyticus*] difiere de las campilobacterias en su composición de ácidos grasos, su metabolismo proteolítico y su capacidad para hidrolizar la urea.³¹⁶ Se han aislado cepas de [*B. ureolyticus*] en pacientes con úlceras superficiales, infecciones de tejidos blandos, uretritis no gonocócica no producida por clamidias y enfermedad periodontal.^{76,77,95,96} En un estudio de Johnson y cols. se observó que las cepas de [*B. ureolyticus*] eran uniformemente sensibles a penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol y aminoglucósidos.¹⁵⁵

***C. curvus*.** *C. curvus* fue denominado originariamente *Wolinella curva*.^{305,320} Las células se tiñen como gramnegativas, son cortas y ligeramente curvas. También pueden presentarse células helicoidales o rectas. Las cepas muestran una motilidad rápida en "saeta" y son asacarolíticas. El microorganismo crece en condiciones anaerobias y en atmósferas de O₂ al 5% que contienen H₂. No ocurre ningún crecimiento en aire enriquecido con CO₂ al 10%. Todos los cultivos necesitan formato y fumarato para el crecimiento en caldo. Algunas cepas muestran una morfología de corrosión en medios de agar. Las cepas fueron aisladas exclusivamente de fuentes humanas e incluyen conductos radiculares dentales, absceso alveolar y sangre.³⁰⁵ En el cuadro 8-5 se presentan las características que permiten distinguir *C. curvus* de especies similares.

***C. rectus*.** *C. rectus* fue denominado originariamente *Wolinella recta*.^{304,320} Desde el punto de vista microscópico, las células aparecen pequeñas y rectas con extremos redondeados y se tiñen como gramnegativos. Las cepas muestran motilidad rápida en saeta y son asacarolíticas. El crecimiento es anaerobio; sin embargo, algunas cepas pueden crecer en una atmósfera de O₂ al 5% pero no en aire enriquecido con CO₂ al 10%. El crecimiento en caldo es estimulado por formato y fumarato. Los nitratos y nitritos se reducen, y tanto oxidasa como catalasa son negativas. En el cuadro 8-5 se detallan otras características de identificación. *C. rectus* se encuentra en los surcos gingivales de los seres humanos.³⁰⁴ Spiegel y Telford²⁹¹ comunicaron el aislamiento de este microorganismo junto con *Actinomyces viscosus* de una masa actinomicótica de la pared torácica. Se ha aislado *C. rectus* en dos pacientes del University of Illinois Hospital, en uno de ellos, con antecedentes de 18 años de alcoholismo y de 8 meses de dolor torácico derecho, se aisló en un nódulo pulmonar, y en el otro paciente, con una masa pulmonar, se aisló en un hemocultivo.

Género *Arcobacter*

Las especies de *Arcobacter* son aerotolerantes; crecen en presencia de niveles atmosféricos de oxígeno.²⁴⁴ Otras características útiles para distinguir las especies de "*Campylobacter*" aerotolerantes de otros campilobacteres son hidrólisis de acetato de indoxilo, crecimiento a 15 °C, 25 °C y 36 °C pero no a 42 °C y la incapacidad para hidrolizar hipurato (véase cuadro 8-4). Vandamme y cols. han mostrado que los arcobacteres pueden ser separados en cinco grupos principales, que fueron identificados mediante datos de hibridación de DNA-DNA como *A. cryaerophilus* (dos subgrupos distintos), *A. butzleri*, *A. nitrofigilis* y *A. skirrowii*.³²²

***A. cryaerophilus*.** *A. cryaerophilus* (antes *C. cryaerophila*) crece bien en condiciones aerobias, aunque puede requerir condiciones microaerófilas para el aislamiento inicial. El crecimiento óptimo ocurre a 30 °C y el microorganismo no crece a 42 °C. Desde el punto de vista bioquímico, esta especie se asemeja a *C. fetus* subespecie *fetus*; sin embargo, *A. cryaerophilus* es acetato de indoxilo positivo, mientras que *C. fetus* subespecie *fetus*

Cuadro 8-5 Características útiles para diferenciar *Campylobacter curvus*, *C. Rectus*, *C. gracilis*, [*Bacteroides ureolyticus*] y *Wolinella succinogenes*

CARACTERÍSTICA	<i>C. CURVUS</i>	<i>C. RECTUS</i>	<i>C. GRACILIS</i>	[<i>B. UREOLYTICUS</i>]	<i>W. SUCCINOGENES</i>
Fuente	Clínica humana	Clínica humana	Clínica humana	Clínica humana	Rumen bovino
Morfología					
Predominan células curvas o helicoidales	+	-	-	-	+
Predominan células rectas	-	+	+	+	-
Células con extremos aguzados	+	-	-	-	+
Motilidad	+	+	-	-	+
Ureasa	-	-	-	+	-
Crecimiento en glicina al 1%	+	+	ND	ND	-
Hidrólisis de acetato de indoxilo	+	+	V	ND	-

+: 90% o más de las cepas son positivas; -: 90% o más de las cepas son negativas; V: variable, 11% a 89% de las cepas son positivas; ND: resultados no disponibles. Modificado de Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL: *Wolinella curva* sp. nov.: "*Vibrio succinogenes*" of human origin. *Int J Syst Bacteriol* 34:275-282, 1984.

no lo es (véase cuadro 8-4). La mayoría de las cepas son sensibles al ácido nalidíxico y resistentes a la cefalotina. En una comunicación de Borczyk y cols.³⁰ que comparó el crecimiento de *A. cryaerophilus* en CMS, agar sangre de Skirrow y agar cefsulodina-irgasán-novobiocina (CIN), se observó que el crecimiento más abundante se obtenía en agar CIN incubado durante 24 a 48 horas a 25 °C y 36 °C. Se han aislados microorganismos semejantes a *A. cryaerophilus* en las heces de un hombre infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) con diarrea intermitente; sin embargo, luego se observó que esta cepa era *A. butzleri*.^{307,308}

A. nitrofigilis. *A. nitrofigilis* (antes *Campylobacter nitrofigilis*) es una especie criófila que crece en condiciones óptimas a 25 °C. Es urea positivo y no patógeno para los seres humanos.

A. butzleri. Kiehlbauch y cols. en los CDC¹⁷² han comunicado que las cepas de campilobacterias aerotolerantes no conforman un grupo homogéneo. La mayoría de las cepas aisladas en humanos, tanto estadounidenses como de otros países, forman un grupo distinto por homología de DNA al que denominaron *Campylobacter butzleri* (que se ha cambiado a *Arcobacter butzleri* luego de la aceptación de la designación del nuevo género para este grupo de microorganismos).³²² Las cepas de *A. butzleri* pueden ser separadas de *A. cryaerophilus* demostrando aerotolerancia tanto a 30 °C como a 36 °C (*A. cryaerophilus* es aerotolerante a 30 °C pero no a 36 °C). Además, *A. butzleri* crece en agar de MacConkey y en medios que contienen glicina y nitrato (y reduce nitrato a nitrito) y en NaCl al 1,5% y al 3,5%. *A. cryaerophilus* da las reacciones opuestas.¹⁷² La mayoría de las cepas de *A. butzleri* aisladas en seres humanos se obtuvieron de deposiciones diarreicas;^{172,195,321} sin embargo, el microorganismo pocas veces fue aislado del contenido abdominal, líquido peritoneal y sangre.^{172,332}

A. skirrowii. *A. skirrowii* es la especie descrita más nueva de *Arcobacter*. Las cepas se han aislado principalmente de los líquidos prepucciales de toros y algunas de fetos abortados y heces diarreicas de vacas, cerdos y ovejas. No se ha establecido la importancia clínica de esta nueva especie.

Género *Helicobacter*

(Los nombres propuestos que no han sido validados por el Comité Internacional sobre Bacteriología Sistemática están encerrados entre comillas).

El género *Helicobacter* comprende 23 especies validadas formalmente. Las especies de *Helicobacter* son microaerófilas estrictas con una morfología espiralada o helicoidal. Muchas especies muestran una actividad de ureasa fuerte. La cepa "flexispira" de las especies de *Helicobacter* (antes "*Flexispira rapini*") es el nombre propuesto para un microorganismo relacionado estrechamente con *Helicobacter* pero que tiene forma de cigarro más que curva y fusiforme. Las especies incluidas en los géneros *Helicobacter* tienen flagelos con vaina. Ninguna especie de *Campylobacter* o de *Wolinella* los tiene (véase cuadro 8-1).

H. PYLORI

Esta especie fue denominada inicialmente *Campylobacter pyloridis* y luego *Campylobacter pylori*. El análisis molecular proporcionó pruebas que mostraron que este microorganismo no pertenece al género *Campylobacter*.¹¹⁵ Las características que lo distinguen de las campilobacterias son sus múltiples flagelos con vaina, su fuerte hidrólisis de la urea y su perfil singular de ácidos grasos (un alto porcentaje del ácido 14:0, un bajo porcentaje del ácido 16:0 y la presencia del ácido 3-OH-18:0). La secuenciación del rRNA 16S ha demostrado que está estrechamente relacionado con *Wolinella succinogenes*. Sin embargo, existen muchas diferencias bioquímicas y de crecimiento entre *H. pylori* y *W. succinogenes* que indican que estas especies no deben ser del mismo género. *W. succinogenes* es catalasa negativo, ureasa negativo, no tiene actividad de γ -glutamiltanspeptidasa ni de fosfatasa alcalina, y no crece a 30 °C ni en glicina al 0,5%; *H. pylori* tiene las características opuestas.

H. pylori se encuentra sólo en las células epiteliales mucossecretantes del estómago. Las pruebas sugieren que es el agente causal de la gastritis antral crónica activa²⁰⁷ y un factor importante en la patogenia de la enfermedad ulcerosa pépti-

Además, existen pruebas firmes de que está relacionado con los adenocarcinomas gástricos y con el desarrollo del linfoma no Hodgkin gástrico.^{250,288} La gastritis por *H. pylori* está difundida en muchos países del mundo y puede ser una de las infecciones humanas crónicas más frecuentes. La definición de *H. pylori* como agente causal de la úlcera duodenal sigue siendo controversial. Para excelentes revisiones, véase el trabajo de Blaser,²⁵ Buck³⁶ y Dunn y cols.⁷⁸

Las cepas de *H. pylori* son microaerófilas (CO₂ al 10%, O₂ al 5%, N₂ al 85%) y también crecen en el aire con mayor contenido de CO₂ (10%). La temperatura óptima para el aislamiento es de 35 °C a 37 °C, aunque algunas cepas crecen a 42 °C. También se ha observado que la humedad elevada favorece el crecimiento. La mayoría de las cepas tardan 3 a 5 días en crecer y algunas requieren 7 días de incubación antes de que se observe el crecimiento. Pueden cultivarse en medios no selectivos que contienen sangre y producen pequeñas colonias grises y translúcidas. La tinción de Gram característica (bacilos pequeños, curvos y ligeramente pletóricos) y reacciones positivas para catalasa, oxidasa y ureasa proporcionan una identificación.

OTRAS ESPECIES DE *HELICOBACTER* DE IMPORTANCIA CLÍNICA

Se han aislado varias especies de *Helicobacter* distintas de *H. pylori* de seres humanos y se asocian con enfermedades.^{289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990,991,992,993,994,995,996,997,998,999,1000}

Helicobacter sin nombre CLO-3 (véase cuadro 8-6).^{97,215,288,293} *H. cinaedi*. *H. cinaedi*, originariamente designado como CLO-1, antes conocido como "*Campylobacter cinaedi*", ha sido aislado de hisopados rectales tomados de varones homosexuales sintomáticos y asintomáticos.^{91,313} También se lo describió como causa de bacteriemia en dos varones homosexuales con tuberculosis concurrente,²⁵⁴ en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{61,70,273} y en otro que era HIV seropositivo pero no tenía SIDA.²³⁶ Sin embargo, los informes sugieren que las infecciones por *C. cinaedi* no están limitadas a varones homosexuales o bisexuales. Por ejemplo, Vandamme y cols.³¹⁹ comunicaron el aislamiento de *H. cinaedi* en la sangre de dos mujeres sin ningún registro de contacto sexual con hombres homosexuales y en las deposiciones de tres menores, dos de ellos niñas.

Orlicek y cols. informaron un caso de septicemia y meningitis causado por *H. cinaedi* en un recién nacido.²⁴⁶ Como *H. cinaedi* ha sido identificado como habitante intestinal normal de hámsteres^{111,299} y la madre del recién nacido tuvo hámsteres domésticos durante los dos primeros trimestres del embarazo, es probable que hayan servido como reservorio para la transmisión del microorganismo a la madre y que el recién nacido se colonizara durante el parto.²⁴⁶ Kielbauch y cols. comunicaron que el espectro clínico de enfermedad asociado con la infección por *H. cinaedi* incluye fiebre, bacteriemia y celulitis recurrente, y la mayoría de los pacientes tienen signos de infección sistémica, como leucocitosis y a menudo trombocitopenia.¹⁷³ Estos mismos autores informan que el tratamiento con penicilina, tetraciclina o aminoglucósidos puede ser más eficaz que con cefalosporinas, eritromicina o ciprofloxacina.¹⁷³

Cuadro 8-6 Especies de *Helicobacter* y microorganismos relacionados

ESPECIES	HUÉSPEDES	SITIO DE AISLAMIENTO
<i>H. acinonychis</i>	Guepardos	Mucosa gástrica
<i>H. bilis</i>	Ratones	Bilis, hígado, intestino
<i>H. bizzozeronii</i>	Perros	Mucosa gástrica
<i>H. canis</i>	Perros, seres humanos	Heces
<i>H. cinaedi</i>	Seres humanos, hámsteres	Sangre, hisopados rectales (seres humanos), intestinos (hámsters)
<i>H. felis</i>	Gatos, perros	Mucosa gástrica
<i>H. fennelliae</i>	Seres humanos	Sangre, hisopados rectales
<i>H. hepaticus</i>	Ratones	Hígado, intestino
<i>H. muridarum</i>	Ratas, ratones	Intestino
<i>H. mustelae</i>	Hurones	Mucosa gástrica
<i>H. nemestrinae</i>	Monos macacos de cola de cerdo	Mucosa gástrica
<i>H. pametensis</i>	Aves salvajes (golondrina, gaviota), cerdos	Heces
<i>H. pullorum</i>	Pollos, seres humanos	Intestinos, hígado (pollos), heces (seres humanos)
<i>H. pylori</i>	Seres humanos, monos, gatos	Mucosa gástrica
Especie de <i>Helicobacter</i> cepa flexispira	Ovejas, perros, seres humanos	Hígado (ovejas), estómago (perros), heces (seres humanos)
<i>H. heilmannii</i>	Guepardos, seres humanos	Mucosa gástrica
CLO-3	Seres humanos	Hisopados rectales

Burman y cols. también han comunicado la asociación de lesiones cutáneas y artritis debidas a bacteriemia por *H. cinaedi*.³⁸ La mayoría de las veces el aislamiento en sangre se logró con instrumentos de hemocultivo automático después de 5 o más días de incubación. En general, los microorganismos no se observan en la tinción inicial de Gram del material de hemocultivo, pero se pueden visualizar mediante campo oscuro o tinción con naranja de acridina. *H. cinaedi* crece sólo a 37 °C, muestra una resistencia intermedia a la cefalotina (disco de 30 µg) y reduce el nitrato a nitrito. Se pueden encontrar otras características genotípicas y fenotípicas en la comunicación de Kiehlbauch y cols.¹⁷¹ El único reservorio natural hasta ahora conocido de *H. cinaedi* es el tracto intestinal de los hámsteres, que puede servir como reservorio de infecciones humanas.^{111,299}

***H. fennelliae*.** Designado originariamente CLO-2 y antes conocido como "*Campylobacter fennelliae*",³¹³ este microorganismo tiene el olor característico de los polvos de limpieza de hipoclorito.⁹¹ Es sensible a la cefalotina y no reduce los nitratos a nitrito. Como sucede con *H. cinaedi*, *H. fennelliae* se ha aislado en hisopados rectales de varones homosexuales sintomáticos y asintomáticos.⁹¹ Existe una comunicación de este microorganismo aislado de la sangre de un hombre bisexual de 31 años con antecedentes de abuso de drogas intravenosas y serología positiva para HIV.²³⁶

CLO-3. Especie sin nombre descrita originariamente por Fennell y cols.,⁹¹ CLO-3 puede ser separado de los otros CLO por su capacidad para crecer a 42 °C, su resistencia a la cefalotina y su incapacidad para reducir el nitrato (véase cuadro 8-4). Se ha aislado en el hisopado rectal de un varón homosexual sintomático.⁹¹

Especie de *Helicobacter* cepa "flexispira" ("*Flexispira rappini*"). Especie de *Helicobacter* cepa "flexispira" (antes "*Flexispira rappini*") es el nombre propuesto³⁵ para un microorganismo que es ureasa positivo y posiblemente muy relacionado desde el punto de vista genómico con *H. pylori*.³²⁰ Sin embargo, es un microorganismo recto no espiralado y fusiforme, con una superficie corrugada debido a la presencia de fibras periplasmáticas. Tiene múltiples flagelos bipolares. No tiene fosfatasa alcalina ni crece a 30 °C pero sí a 42 °C y es resistente al metronidazol (5 µg), mientras que *H. pylori* tiene las características opuestas.¹¹⁵ Se separa de las campilobacterias por las reacciones negativas para catalasa y nitrato y la incapacidad para crecer en glicina al 1%.¹⁴ La especie de *Helicobacter* cepa "flexispira" ha sido aislada en muestras de heces de seres humanos con síntomas de gastroenteritis y en hemocultivos, en deposiciones de perros^{14,268} y en fetos abortados de ovejas.^{175,176,268,289,309}

"*Helicobacter heilmannii*" ("*Gastrospirillum hominis*"). "*Helicobacter heilmannii*" es una bacteria espiralada no cultivada que se encuentra en la mucosa gástrica humana y es más grande y más apretadamente espiralada que *H. pylori*. El microorganismo es helicoidal, tiene 3,5-7,5 fm de longitud y 0,9 µm de diámetro con extremos truncados aplanados en las puntas, seis a ocho espirales y hasta 12 flagelos con vaina de 28 nm de diámetro en cada polo.²¹² McNulty y cols. propusieron el nombre "*G. hominis*". Sin embargo, Solnick y cols.²⁸⁷ mostraron que "*Gastrospirillum*" es miembro del género *Helicobacter* y propusieron el nombre "*H. heilmannii*" en honor de Konrad Heilmann, histopatólogo alemán que describió la primera serie grande de pacientes infectados por el microorganismo.¹²⁸ Heilmann y Borchard informaron que la prevalencia de infección por "*Gastrospirillum*" en pacientes que se presentaron para la endoscopia era inferior al 1%.¹²⁸ "*H. heilmannii*" parece ser ubicuo en animales domésticos, lo que sugiere que la infección humana puede adquirirse como zoonosis.^{75,100,129} La infección humana por esta bacteria puede acompañarse por una

gastritis crónica similar a la observada con la infección por *H. pylori*.^{72,94,128,192,212,222,286}

ESPECIES DE *HELICOBACTER* NO HUMANAS

Algunas especies de *Helicobacter* han sido aisladas de animales. Entre éstas están *H. acinonychis*,⁷⁹ *H. bilis*,¹⁰⁴ *H. bizzozeronii*,¹²³ *H. canis*,²⁹⁴ *H. felis*,²⁵³ *H. hepaticus*,⁹⁹ *H. muridarum*,¹⁹³ *H. mustelae*,^{98,103,115} *H. nemestrinae*³⁴ y *H. pullorum*.^{40,293} En general, estas bacterias se encuentran en el estómago y el tubo digestivo bajo.¹⁰¹ Cuando están presentes en el estómago, suelen asociarse con gastritis en el animal huésped. Algunas de estas cepas también han sido aisladas en seres humanos (véase cuadro 8-6).

OTROS BACILOS GRAMNEGATIVOS MICROAERÓFILOS

***Wolinella succinogenes*.** Es la especie tipo del género *Wolinella*, definida en la actualidad como anaerobia, catalasa negativa y sulfuro de hidrógeno positiva.³⁰⁴ Sin embargo, se ha demostrado que *W. succinogenes* es oxidasa positiva y capaz de utilizar O₂ como aceptor terminal de electrones en condiciones microaerófilas (O₂ al 2%), pero no bajo niveles atmosféricos de O₂. Estos hallazgos, junto con otras pruebas sobre el sistema de transporte de electrones, indican que *W. succinogenes* no es un anaerobio, sino un microaerófilo que requiere H₂.³¹¹ No ha sido asociado con infecciones humanas.

***Sulterella wadsworthensis*.** Wexler y cols. propusieron el nombre *S. wadsworthensis* para un grupo de bacterias identificadas originariamente como *C. gracilis* pero que diferían en características genéticas y bioquímicas de las cepas de *C. gracilis* típicas.³³¹ Estos microorganismos son bacilos rectos gramnegativos que crecen en una atmósfera microaerófila o en condiciones anaerobias. Se diferencian de *C. gracilis* y de las especies de *Campylobacter* por ser oxidasa negativos, ureasa negativos y acetato de indoxilo negativos; resistentes a discos de bilis al 20% y por no reducir el tetracloruro de tetrazolio en condiciones aerobias. Han sido aislados principalmente de infecciones humanas del aparato gastrointestinal.³³¹

Identificación definitiva de campilobacteres y bacterias relacionadas

La morfología de las colonias y las características en la tinción de Gram de *C. jejuni* según se describieron antes también corresponden a la mayoría de las otras especies de *Campylobacter*. Sin embargo, la identificación definitiva de las especies depende de la determinación de las características fenotípicas presentadas en el cuadro 8-4 o cuando estas pruebas no proporcionan la identificación de una especie, las técnicas moleculares.

La sensibilidad diferencial al ácido nalidíxico y la cefalotina puede ser útil para distinguir las especies más frecuentemente halladas de *Campylobacter* según el esquema del recuadro 8-3 si la cepa es sensible al ácido nalidíxico. Como las cepas clínicas de *C. jejuni* y *C. coli* resistentes al ácido nalidíxico se encuentran cada vez con mayor frecuencia, estas pruebas se han tornado menos útiles.

Luechtefeld y Wang²⁰² también observaron que la resistencia de *C. jejuni* al cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) es útil para distinguir *C. fetus*. La prueba para la hidrólisis de hipurato es de valor para separar *C. jejuni* de la especie estrechamente relacionada *C. coli*. La mayoría de las cepas de *C. jejuni* hidrolizan

Cuadro 8-3 Identificación definitiva de las campilobacterias halladas con mayor frecuencia

	ÁCIDO NALIDÍXICO	CEFALOTINA	TTC*	HIDRÓLISIS DE HIPURATO	HIDRÓLISIS DE ACETATO DE INDOXILO
<i>C. jejuni</i> subespecie <i>jejuni</i>	V	R	R	+	+
<i>C. coli</i>	S	R	R	-	+
<i>C. curvus</i> subespecie <i>fetus</i>	R	S	S	-	-
<i>C. lari</i>	R	R	S	-	-

*TTC: cloruro trifeníltetrazolio.

el hipurato a ácido benzoico y glicina.¹²⁶ El procedimiento rápido de Hwang y Ederer para la hidrólisis de hipurato, descrito en el capítulo 12, es apropiado para evaluar las cepas clínicas de especies de *Campylobacter*. Morris y cols.²²³ describen un método más sensible para detectar ácido benzoico utilizando cromatografía gas-líquido (GLC). Esta aplicación es una extensión del procedimiento comunicado antes por Kodaka y cols.,¹⁷⁹ que utilizaron un medio de hipurato-formato-fumarato para detectar no sólo hidrólisis de hipurato mediante GLC sino también la utilización de formato y fumarato.

Mills y Gherna²¹⁹ describieron el uso de una prueba rápida para detectar la hidrólisis de acetato de indoxilo por especies de *Campylobacter*. Algunos estudios han mostrado que todas las cepas de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. curvus*, *C. helveticus*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* y *Helicobacter fennelliae* hidrolizan el acetato de indoxilo, mientras que la mayoría de los otros campilobacteres son negativos.^{135,219,243,261} Otras varias características bioquímicas y físicas pueden ser útiles para separar las distintas especies de *Campylobacter* y similares a *Campylobacter* (véase cuadro 8-4). Una revisión extensa de los métodos de identificación para campilobacterias, helicobacterias y microorganismos relacionados ha sido publicada por On.²⁴³

Identificación rápida de campilobacteres a partir de colonias y muestras de heces

En la mayoría de los casos la aparición de colonias pequeñas, tostadas a grises y acuosas que tienden a aplanarse en agar selectivo para *Campylobacter*, y que muestran una forma en "S" y una morfología en alas de gaviota características en la tinción de Gram y que son oxidasa y catalasa positivas, será suficiente para establecer el diagnóstico de campilobacteriosis en los pacientes con síndrome diarreico.

Hodge y cols.¹³⁶ recomiendan el uso de técnicas de inmunofluorescencia directa en el cribado rápido de muestras de heces de pacientes con síndrome diarreico agudo. Este enfoque tiene la posibilidad de eliminar las conjeturas involucradas en la interpretación de los frotis teñidos con Gram. Sin embargo, no se dispone de reactivos comerciales.

PRUEBAS DIFERENTES DEL CULTIVO

Se han utilizado las pruebas de aglutinación del látex para la identificación de especies de *Campylobacter*. Estas pruebas utilizan colonias aisladas para identificar *C. jejuni* y *C. coli* pero no distinguen entre ambos.^{138,229} Su capacidad para identificar correctamente *C. lari* es variable.

También se pueden utilizar sondas de ácidos nucleicos para la confirmación de especies de *Campylobacter* en cultivo.²⁶² La

prueba de identificación de cultivos de *Campylobacter* AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA) se basa en una sonda de DNA que proporciona una identificación rápida de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* directamente de las colonias bacterianas.³¹⁰ La sonda es no radiométrica y está marcada con un éster quimioluminescente de acridinio. Las reacciones se leen en un luminómetro.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DIRECTOS

Se han creado inmunoanálisis enzimáticos para evaluar las propiedades de virulencia de *C. jejuni* y para la detección directa de antígeno de *Campylobacter* en muestras de heces (ProSpecT *Campylobacter*, Alexon-Trend, Inc., Ramsey, MN).^{134,177} La prueba para *Campylobacter* ProSpecT que se comercializa es menos sensible que el cultivo (sensibilidad, 80% a 96% en los estudios publicados), pero es altamente específica para *C. jejuni/C. coli*.^{81,134,312} El ensayo no produce reacciones cruzadas con *C. upsaliensis*; sin embargo, esta especie se encuentra pocas veces en el laboratorio clínico. Varios investigadores han ideado pruebas de PCR para la detección directa de especies de *Campylobacter* en muestras de heces.^{181,199,204} No obstante, antes de que puedan ser transferidas al laboratorio clínico, se necesita un procedimiento técnicamente sencillo y práctico para la extracción de DNA de las muestras de heces que elimine los inhibidores de la PCR.

Cultivo y aislamiento de *Helicobacter pylori* MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE *H. PYLORI*

Para el diagnóstico de gastritis asociada con *H. pylori*, la tinción histológica y el cultivo de muestras de biopsia han sido considerados las pruebas de referencia (*gold standard*).¹⁸ Las muestras apropiadas incluyen las biopsias gástricas y duodenales. Las muestras deben ser frescas y su transporte no se debe diferir por más de 3 horas. Las muestras pueden mantenerse hasta durante 5 horas si se las almacena a 4 °C. El tejido debe mantenerse húmedo mediante el agregado de 2 mL o menos de solución isotónica estéril.

PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO

Moler las muestras en un molinillo de vidrio esmerilado brinda un crecimiento mayor que picar o frotar la muestra en una superficie de agar. El material debe inocularse en un medio de agar sangre no selectivo, como placas de agar infusión de encéfalo y corazón para brucelas (BHI) o agar tripticosa soja con el agregado de sangre de carnero o caballo al 5%. Se observa escaso crecimiento en las placas comerciales de agar chocolate; por lo tanto, no se recomienda este medio. Como estas bacterias son sensibles a la cefalotina, *H. pylori* no crece en ningún medio

selectivo que contenga cefalosporinas. Muchos laboratorios han tenido buenos resultados utilizando agar de Thayer-Martin modificado como medio selectivo para el aislamiento de *H. pylori* en cultivos mixtos. Las placas se incuban a 37 °C en un medioambiente microaerófilo y húmedo. En general, el crecimiento se observa en 3 a 5 días. Los datos no publicados de los experimentos llevados a cabo en el Laboratorio de Microbiología del University of Illinois Hospital se muestran en el cuadro 8-7. Debido al peligro de utilizar un jarro para anaerobios sin un catalítico, recomendamos el uso de la jarra Campy GasPak (columna 2 en el cuadro 8-7). El crecimiento ocurrió en la jarra Campy GasPak pero no en la Poly Bag con una mezcla de gases Campy (columna 4 en el cuadro 8-7), presumiblemente porque el agua agregada al sistema anterior proporciona la humedad necesaria para el crecimiento.

IDENTIFICACIÓN DE *H. PYLORI*

Las colonias de *H. pylori* son pequeñas, grises, translúcidas y débilmente β-hemolíticas. La tinción de Gram pone en evidencia bacterias gramnegativas curvas y de tinción pálida con formas en alas de gaviota y "U" características. Se puede hacer una identificación presuntiva con reacciones positivas para oxidasa y catalasa, y una reacción de ureasa extremadamente rápida (en minutos). En el cuadro 8-4 se mencionan otras características de identificación.

PRUEBA DE UREASA EN BIOPSIA (PRUEBA CLO)

Una técnica más rápida, pero algo menos sensible y específica que las pruebas mencionadas, es la técnica de ureasa en biopsia (prueba CLO). En esta prueba, se introduce la muestra de biopsia mucosa en un medio que contiene urea y un colo-

rante sensible al pH. Si la muestra contiene ureasa, la urea se desdobla y el amoníaco resultante produce una elevación del pH y un cambio ulterior en el color del indicador. Esta prueba puede dar resultados falsos negativos cuando la presencia del microorganismo es muy escasa, o resultados falsos positivos si aparecen en la muestra otros microorganismos que desdoblan la urea.²¹³

PRUEBAS NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

La infección por *H. pylori* se puede diagnosticar mediante ensayos invasivos que requieren endoscopia (cultivo, tinción, PCR, prueba CLO) o mediante ensayos no invasivos en los cuales no es necesaria la endoscopia. En la última categoría se incluyen el método de la ureasa, la detección de antígeno y la serología.

Método de la ureasa. Se describieron dos métodos de la ureasa. El primero, denominado prueba de la urea y el aire espirado, requiere que el paciente ingiera urea marcada con ¹⁴C disuelta en agua, seguido por la recolección de muestras de aire espirado que son analizadas para detectar la presencia de ¹⁴CO₂ a los 60 minutos. Un segundo método utiliza urea radiomarcada que contiene ¹⁵N.¹⁵⁴ Después de su ingestión, la urea radiomarcada es degradada en amoníaco y dióxido de carbono por la ureasa de *H. pylori* en el estómago. El amoníaco se absorbe en la sangre y se excreta con la orina. Se evalúa la cantidad de [¹⁵urea], que refleja la magnitud de la infección por *H. pylori*, midiendo la abundancia y la tasa de excreción de ¹⁵N en amoníaco en la orina. Se comunica que la sensibilidad de la prueba de excreción de ¹⁵NH₄ es del 96% con una especificidad del 100% cuando se compara con los pacientes que eran *H. pylori* positivos mediante cultivo y tinción de Gram.¹⁵⁴

Cuadro 8-7 Comparación de los medios de cultivo y las condiciones atmosféricas para el crecimiento de *Helicobacter pylori*

MEDIOS DE AGAR	CONDICIONES DE INCUBACIÓN*				
	Jarra de anaerobiosis sin catalítico	Jarra Campy GasPak	Jarra de anaerobiosis con catalítico	Poly Bag (mezcla Campy Gas)*	Aire atmosférico con CO ₂ al 5%
Brucela con sangre de carnero al 5%	Mejor crecimiento β-hemolítico	Muy buen crecimiento β-hemolítico	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Tripticasa soja con sangre de carnero al 5%	Muy buen crecimiento	Buen crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Infusión de cerebro y corazón con sangre de caballo al 5%	Muy buen crecimiento	Buen crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Chocolate (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Chocolate (GIBCO)	Colonias pequeñas	Colonias pequeñas	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Chocolate (recién preparado)	Colonias muy pequeñas	Colonias muy pequeñas	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Campy-BAR (de Blaser)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento

*Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C y leídos después de 5 días.
¹O₂ al 5%; CO₂ al 10%; N₂ al 85%.
 Datos de K. Ristow; University of Illinois Hospital, Chicago IL.

Detección de antígeno. Existe un preparado comercial de enzimmunoanálisis (ELISA) para la detección directa de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces para utilizarlo en el diagnóstico y el seguimiento (Premier Platinum HpSA, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH). Algunos estudios han mostrado que la prueba de sensibilidad es aproximadamente del 89% y la especificidad, 94% a 95%.^{205,221}

Métodos serológicos. Las pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra *H. pylori* se han utilizado principalmente para estudios epidemiológicos, pero también pueden utilizarse para controlar la eficacia del tratamiento. El formato principal es la prueba ELISA para la detección de IgG, aunque existen pruebas de aglutinación del látex. También se puede detectar IgA e IgM pero son menos útiles desde el punto de vista del diagnóstico. Un problema intrínseco es establecer un valor basal de positividad dado que, en ciertas poblaciones, la prevalencia de títulos elevados de anticuerpos es relativamente alta. En un estudio extenso de reclutas del ejército, Smoak y cols.²⁸⁵ observaron una tasa de positividad global del 26,3%. Esta tasa aumentó del 24,0% en el grupo de 17 a 18 años al 43% en el grupo de 24 a 26 años. La repositividad para los negros fue del 44%, para los hispanos, del 38% y para los blancos, del 14%.

PRECISIÓN DE LAS PRUEBAS INVASIVAS Y NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

Cutler y cols.⁶⁸ evaluaron la precisión de varias pruebas para determinar la infección por *H. pylori* que incluyen la prueba de la urea y el aire espirado, la medición de las concentraciones de anticuerpos de IgG e IgA en suero, y las muestras de biopsias antrales para la prueba CLO, histología y tinción de Warthin-Starry. Estos autores observaron que la tinción de Warthin-Starry tenía la mejor sensibilidad y especificidad, aunque la prueba CLO, la de la urea y el aire espirado y las concentraciones de IgG no fueron estadísticamente diferentes para determinar el diagnóstico correcto. Estos autores arribaron a la conclusión de que la prueba de la urea y el aire espirado y la serología IgG no invasivas son tan precisas para predecir la condición de *H. pylori* en pacientes no tratados como las pruebas invasivas CLO y Warthin-Starry. La ausencia de inflamación antral crónica excluye con precisión la infección por *H. pylori*.⁶⁸

HELICOBACTERES ENTEROHEPÁTICOS

La mayoría de los helicobacteres intestinales aislados de seres humanos (p. ej., *H. canadiensis*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*) son ureasa negativos. La diferenciación entre estas helicobacterias catalasa positivas y ureasa negativas de las campilobacterias entéricas similares a *C. jejuni* puede ser difícil. Los estudios de temperatura pueden ser útiles, ya que *H. cinaedi* y *H. fennelliae* no crecen a 42 °C (*C. jejuni* y *C. coli* lo hacen). *C. jejuni* y *C. coli* también hidrolizan el acetato de indoxilo, mientras que *H. cinaedi*, no. *H. pullorum* puede distinguirse de *C. coli* sobre la base de su resistencia al ácido nalidíxico.

PARTE II: FAMILIAS DE VIBRIONACEAE Y AEROMONADACEAE

Filogenia de *Vibrionaceae*

El nombre *Vibrionaceae* fue propuesto originariamente por Whittam en 1965 con la intención de agrupar algunos bacilos

gramnegativos no entéricos fermentadores que eran oxidasa positivos y móviles por medio de flagelos polares. Este agrupamiento se hizo porque era conveniente al objetivo de diferenciar estos microorganismos de las enterobacterias y no implicaba siempre una relación taxonómica entre las especies incluidas. Los *Vibrionaceae* abarcaban en otra época cuatro géneros: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*. Sin embargo, en las últimas décadas distintos métodos para el análisis de ácidos nucleicos han revolucionado la taxonomía microbiana y han conducido a la reestructuración de esta familia a lo largo de líneas filogenéticas y el establecimiento de dos géneros nuevos: *Listonella* y *Shewanella*, y de una familia nueva: *Aeromonadaceae*.^{66,203,271} La ubicación filogenética correcta del género *Plesiomonas* sigue sin resolver.

Género *Vibrio*

Las especies de *Vibrio* tienen tanto interés histórico como contemporáneo. *V. cholerae* es el agente etiológico del cólera asiático en los seres humanos, una enfermedad diarreica potencialmente grave que ha sido un azote para la humanidad durante siglos. Descrito por primera vez y nombrado por Pacini en 1854, fue aislado 32 años más tarde por Koch, que lo denominó "bacilo en coma" debido al aspecto curvo o en forma de coma característico de las células bacterianas individuales.

Se han producido siete pandemias de cólera desde 1816-1817. La más reciente, causada por *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, comenzó en 1961 en Indonesia, se propagó rápidamente a Asia, Europa, África y el Pacífico Sur y alcanzó Sudamérica y América Central en 1991. Además, se han comunicado algunas epidemias menores de síndromes diarreicos e infecciones extraintestinales causados por los serogrupos no O1 de *V. cholerae* y por varias especies halófilas descritas recientemente en los Estados Unidos en varios estados de la costa del Golfo desde comienzos de la década de 1970.^{143,162} La mayoría de las infecciones ocurrieron después de la ingestión de mariscos contaminados y mal cocidos. También se informaron infecciones de heridas luego de traumatismos al nadar o trabajar en aguas infectadas o por la exposición a animales marinos.¹⁴³

El punto de este comentario es que los microbiólogos clínicos deben tener presente la posibilidad de hallar especies de *Vibrio* en muestras de heces diarreicas y deben mantenerse informados sobre el modo de aislar e identificar las distintas especies. Quienes trabajan en laboratorios no costeros tienen menos posibilidades de encontrarlos que los que trabajan en hospitales de la costa del Golfo; no obstante, con los viajes por el mundo y el envío de mariscos a los mercados del interior, todos deben estar alertas.

TAXONOMÍA

Las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en los casos clásicos de cólera pandémico se aglutinan en lo que se ha designado antisuero O1. Las cepas que no se aglutinan en este antisuero se denominan *V. cholerae* no O1 (si se determina esta especie bioquímicamente) u otros distintos nombres de especies de vibriónes, como *V. parahaemolyticus* o *V. mimicus*. Dado que la especie no O1 no suele causar síndromes diarreicos tan graves ni potencialmente mortales como la especie O1 o puede asociarse más a menudo con infecciones extraintestinales, la diferenciación temprana entre los dos grupos puede adquirir una importancia clínica considerable. Aunque se han identificado 35 o más especies de *Vibrio*, todos son microorganismos ambienta-

les salvo 11, se denominan “especies marinas de vibriones” y no han sido asociados con infecciones humanas.¹⁵²

DESCRIPCIÓN Y SÍNDROMES CLÍNICOS ASOCIADOS DE ESPECIES DE *VIBRIO* DE IMPORTANCIA HUMANA

Las especies que se aíslan en seres humanos y potencialmente producen enfermedad pueden dividirse en dos grupos: *Vibrio cholerae* y los vibriones no coléricos.

***Vibrio cholerae*.** *Vibrio cholerae* es el agente etiológico del cólera epidémico y endémico en los seres humanos. Dentro de la especie, existen muchas diferencias entre las cepas tanto en potencial patogénico como epidémico (cuadro 8-8). Las cepas pueden ser divididas según las diferencias en la composición de su pared celular (antígeno O somático) que forma la base del esquema de serotipificación que clasifica los microorganismos en 139 serogrupos diferentes. Todos comparten el antígeno flagelar (H) común. A mediados de la década de 1930 se determinó que todas las cepas pandémicas eran aglutinadas con un único antisuero designado 01. Las cepas de *V. cholerae* tipo 01 pueden separarse, además, en uno de tres serogrupos: Inaba, Ogawa e Hikojima. Estos serogrupos son importantes para estudios epidemiológicos. Por ejemplo, la pandemia actual de cólera que comenzó en 1961 es causada por el serogrupo Ogawa, mientras que un foco de cólera que es endémico en la región de la costa del golfo de los Estados Unidos se asocia con *V. cholerae* serotipo Inaba 01.¹⁶⁸ En enero de 1991, apareció simultáneamente el cólera epidémico en varias ciudades costeras del Perú y desde entonces ha sido comunicado en Ecuador, Chile, Colombia, Brasil y los Estados Unidos. Este brote aparentemente se debe también a una cepa distinta de la cepa pandémica y ha sido identificado como serotipo Inaba 01, biotipo El Tor.⁵¹

Las cepas epidémicas de la serovariedad 01 pueden dividirse a su vez en las biovariedades clásica y El Tor. El Tor es un biotipo de *V. cholerae* activamente hemolítico que fue aislado en la estación El Tor Quarantine en Egipto. Se ha observado que la cepa El Tor es más resistente y más capaz de sobrevivir en el medioambiente; además, se han informado portadores crónicos de la cepa El Tor en la bibliografía.¹⁶⁷ Actualmente, se reconoce el vibrión El Tor como biotipo de *V. cholerae* y es responsable de la mayoría de los brotes epidémicos actuales del cólera clásico. La pandemia actual de cólera que comenzó en 1961 es causada por la biovariedad El Tor, al igual que los bro-

tes de la costa del Golfo y Sudamérica. La biovariedad clásica casi ha desaparecido, salvo por raros aislamientos en la India. Algunos estudios de Bangladesh indican que el biotipo clásico ha resurgido.¹⁵²

Cólera: reseña histórica mundial. Se han producido siete pandemias de cólera en la reseña histórica registrada; se sabe que las tres últimas se deben al *Vibrio cholerae* serogrupo 01. La séptima pandemia de cólera, originada en Clebes, Indonesia, en 1961, se propagó a todo el mundo y alcanzó el continente sudamericano en 1991. El surgimiento y la rápida propagación del cólera causado por un nuevo serotipo designado 0139 Bengala en octubre de 1992 en nueve países (India, Bangladesh, Paquistán, Tailandia, Nepal, Malasia, Burma, Arabia Saudita y China) sugiere la posibilidad del inicio de la octava pandemia.^{7a,89,206,300} Para una sinopsis de la pandemia de cólera de los siglos XIX y XX, se remite al lector a la revisión publicada por Lacey.¹⁸³

***Vibrio cholerae* 0139 Bengala toxigénico.** En octubre de 1992, comenzó una epidemia de enfermedad similar al cólera en Madrás, India, y se propagó a Calcuta, Bangladesh y muchos otros lugares de la India y el sudeste de Asia.²²⁴ La cepa no pudo ser identificada como ninguno de los 138 tipos conocidos de *V. cholerae* y por lo tanto representaba un nuevo serogrupo, 0139 (sinónimo Bengala para indicar su primer aislamiento de las áreas costeras de la bahía de Bengala).^{7a} La cepa produjo epidemias grandes de cólera en Bangladesh, India y países vecinos y, durante una época, reemplazó en gran parte a las cepas de *V. cholerae* 01 en las áreas afectadas. Desde 1996 hasta 2002, la mayoría de los casos de cólera en Bangladesh fueron causados por *V. cholerae* 01 biotipo El Tor, pero en marzo de 2002, volvió a surgir *V. cholerae* 0139 como el patógeno predominante.⁸⁹ Existen tres puntos importantes para considerar en relación con este nuevo serotipo: 1) los síntomas asociados con la infección por *V. cholerae* 0139 sugieren que es indistinguible del cólera causado por *V. cholerae* 01 y debe ser tratado con el mismo reemplazo rápido de líquidos, 2) la rápida propagación de *V. cholerae* 0139 indica que la inmunidad preexistente contra *V. cholerae* 01 ofrece poco beneficio protector o ninguno, y los viajeros a las áreas afectadas no deben asumir que la vacunación contra el cólera es protectora contra la cepa *V. cholerae* 0139, y 3) los métodos de identificación de laboratorio de *V. cholerae* 01 dependen de la detección del antígeno 01 sobre la superficie de la bacteria y, por lo tanto, no identifican la cepa nueva.⁵³ Los rasgos fenotípicos, serológicos

Cuadro 8-8 Características de *Vibrio cholerae*

MÉTODO DE CLASIFICACIÓN	ASOCIADOS CON EPIDEMIAS	NO ASOCIADOS CON EPIDEMIAS
Serogrupos	1	No 01 (serogrupos 02-0138)*
Biotipos	Clásico, El Tor	Biotipos no aplicables a cepas no 01
Serotipos	Inaba, Ogawa, Hikojima	Estos tres serotipos no son aplicables a cepas no 01
Toxina	Producen la toxina del cólera	Habitualmente no producen la toxina del cólera; a veces producen otras toxinas*

*Un serogrupo designado 0139 Bengala apareció en Calcuta, Bangladesh y otras partes de la India en 1992; produce la toxina del cólera en cantidades similares a las producidas por *V. cholerae* 01 y se ha propagado en proporciones epidémicas a través del subcontinente Indio.

y toxigénicos de *V. cholerae* 0139 Bengala han sido comunicados por Nair y cols.²³¹

Cólera: hemisferio occidental. En enero de 1991, el cólera epidémico, que no había sido comunicado en Sudamérica en el siglo XX, apareció simultáneamente en varias ciudades costeras del Perú y se propagó con rapidez a toda Sudamérica y América Central.^{121,249}

En los Estados Unidos, existe un foco ambiental pequeño del *V. cholerae* potencialmente epidémico a lo largo de la costa del Golfo.¹⁶⁹ El cólera causado por esta cepa ha sido ligado en la mayoría de los casos con cangrejos mal cocidos u ostras crudas obtenidos de esta costa. En 1973, se comunicó en Texas el primer caso de cólera en los Estados Unidos desde 1911.³³⁰ Esto fue seguido en 1978 por la comunicación de 11 casos en Louisiana y en 1981 con otros dos brotes en Texas que comprendieron 18 casos.²³ Se observó que los cangrejos obtenidos de estuarios cercanos eran el vehículo de la infección en los casos de Louisiana, mientras que el más grande de los dos brotes de Texas se rastreó hasta la contaminación de arroz cocido luego del enjuague accidental con agua del medioambiente que contenía la cepa del brote.¹⁶⁷ En la actualidad, se sabe que 44 infecciones por *V. cholerae* 01 toxigénicas fueron adquiridas en los Estados Unidos entre 1973 y 1987.¹⁵² Todas fueron resultado de las exposiciones en Louisiana y Texas cerca de la costa del Golfo. En 1991, se comunicaron 26 casos de cólera en los Estados Unidos; 18 estuvieron vinculados con el brote de Sudamérica.⁵² En 1992, se comunicaron 103 casos de cólera en los Estados Unidos: 75 fueron asociados con un brote a bordo del vuelo de Aerolíneas Argentinas entre la Argentina y Los Angeles en febrero de 1992. En 1993 y 1994, se comunicaron 22 y 47 casos de cólera en los Estados Unidos, respectivamente. De éstos, 65 (94%) se asociaron con viajes al exterior. Tres de estos fueron casos de *V. cholerae* 0139 confirmados por cultivo en viajeros al Asia.⁵⁴ Desde 1995 a 2000, se comunicaron 14 casos de cólera; 6 se asociaron con un foco ambiental endémico y 8, con mariscos importados.²²⁵

Los serotipos no 01 de *V. cholerae* han sido asociados con casos aislados de enfermedad diarreica, aunque la mayoría de las cepas no 01 no producen la toxina del cólera, pero parecen producir una enterotoxina diferente. También se han aislado cepas de heridas e infecciones sistémicas. En una revisión de casos de bacteriemia por *V. cholerae* no 01, Safrin y cols.²⁷⁴ comunicaron que la tasa de casos fatales para 13 pacientes en los cuales se conoció el resultado fue del 61,5%. La mayoría de los casos conocidos han ocurrido en pacientes inmunodeprimidos, sobre todo con procesos malignos hematológicos o cáncer. Pitak y Gindorf²⁶⁰ informaron un caso de celulitis bacteriémica causado por *V. cholerae* no 01 que se adquirió en un lago de agua dulce tierra adentro en el norte de Illinois.

Patología de la gastroenteritis inducida por *Vibrio cholerae*. *V. cholerae* es el prototipo de los síndromes diarreicos en los cuales la enfermedad no es causada por invasión tisular de los microorganismos sino a través de la producción de toxinas que afectan el intercambio intrainestinal normal de agua y electrolitos. Las cepas toxigénicas generan una toxina que se une a un receptor sobre la membrana de la célula epitelial, activa la adenilatociclasa y produce niveles elevados de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) e hipersecreción de sal y agua, lo que conduce a la diarrea característica en "agua de arroz" del cólera. En el recuadro 8-4 se proporciona un relato breve de la secuencia paso a paso de la gastroenteritis inducida por *V. cholerae*. La figura 8-1 es una ilustración esquemática del modo de acción de la toxina colérica. Para una revisión amplia del cólera que incluye patogenia y factores de

Recuadro 8-4 Secuencia que conduce a la gastroenteritis inducida por *V. cholerae*

1. Los microorganismos ingeridos en aguas contaminadas deben pasar primero las secreciones altamente ácidas del estómago. Se calcula que se necesitan 10^{10} microorganismos por mililitro para sobrevivir al pasaje gástrico en las personas sanas; se necesitan sólo unos 100 microorganismos por mililitro en las personas hipoclorhídricas, ya sea debido a una gastrectomía previa o por la ingestión de antiácidos en el tratamiento de la enfermedad ulcerosa gástrica.
2. Para producir enfermedad, las células bacterianas de *V. cholerae* deben adherirse a las células epiteliales de la mucosa gástrica e intestinal. Estas bacterias son móviles y secretan mucina, dos propiedades que ayudan a la penetración de la capa protectora de mucina que reviste la superficie de la mucosa gastroentérica. La fijación de las bacterias es un mecanismo complejo que requiere el reconocimiento por parte de las células bacterianas de un marcador de superficie sobre las células epiteliales al que se pueden unir.
3. *V. cholerae* produce una molécula de enterotoxina compuesta por dos subunidades: una subunidad A (activa) y una subunidad B (fijadora). La subunidad A está compuesta por dos péptidos: A_1 con actividad de toxina y A_2 , que facilita la penetración de la subunidad A en la célula. La subunidad B une la molécula de toxina a los receptores gangliósidos G_{M1} específicos de la toxina del cólera sobre la membrana de la célula epitelial intestinal. Hay cinco subunidades B por molécula de toxina, dispuestas en un anillo alrededor de un centro que contiene la enzima A_1 . La unión inicial ocurre rápidamente, seguida de un cambio conformacional lento en la molécula de la toxina, que conduce a la internalización de la enzima A_1 en la célula huésped; por lo tanto, existe una fase de latencia corta (15 a 60 minutos) entre el momento en que se ingiere el agua infectada por cólera y el comienzo de los síntomas. A través de una serie de pasos, A_1 cataliza la ADP-ribosilación de la proteína reguladora G_s (estimuladora), que la traba en el estado activo. La proteína G_s actúa para retornar la adenilatociclasa de su forma inactiva a su forma activa, lo que a su vez produce una elevación intracelular en el AMP cíclico (AMPc; véase fig. 8-1).²¹⁸
4. El AMP cíclico impide la reabsorción de iones sodio a través de la membrana del ribete en cepillo de la célula epitelial intestinal y la excreción de bicarbonato de sodio y potasio en la luz intestinal. El quilo intestinal tiene altas concentraciones de sodio y cloro (isotónico), bicarbonato (dos veces la concentración del plasma) y potasio (tres a cinco veces la concentración del plasma). Por lo tanto, el agua pasa pasivamente desde las células epiteliales a la luz intestinal en respuesta a los altos gradientes de presión osmótica, siguiendo el viejo adagio, "donde va el sodio, va el agua".
5. Por lo tanto, existe una secreción difusa de líquido desde las células epiteliales intestinales y la acumulación de grandes cantidades de agua en la luz intestinal. El ritmo de producción de líquido aumenta entre 3 y 10 horas después de la exposición. La pérdida de líquido persiste hasta durante 5 días en los pacientes que no reciben antibióticos, después de lo cual las células bacterianas del intestino se eliminan por un mecanismo desconocido del huésped. El resultado son grados variados de deshidratación y desequilibrio electrolítico que pueden conducir a acidosis metabólica, hipopotasemia, shock y muerte en los casos extremos.

virulencia, se remite al lector a las publicaciones de Koper y cols., y Sack y cols.^{161,272}

Tratamiento y prevención de las infecciones por *Vibrio cholerae*. La mayoría de *V. cholerae* son destruidos rápidamente por la tetraciclina; sin embargo, la secreción de líquido puede persistir durante varias horas después del tratamiento por el efecto de la toxina que ya está ligada a las células mucosas. La corrección de las pérdidas hidroelectrolíticas es esencial y se necesita hasta un litro o más de líquido por hora. La antibioticoterapia

Cuadro 8-9 Características de las especies de *Vibrio* de importancia clínica distintas de *V. cholerae*

ESPECIE	HÁBITAT NATURAL, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA; MODOS DE INFECCIÓN HUMANOS	MEDIOS PARA EL CRECIMIENTO ÓPTIMO EN CULTIVOS DE LABORATORIO	REACCIONES BIOQUÍMICAS CLAVES	SÍNDROMES CLÍNICOS
<i>V. alginolyticus</i>	Hábitat: medioambiente marino Infección: exposición de la piel traumatizada a agua salada o animales infectados	Suplemento de NaCl necesario para el crecimiento en medios no selectivos. Crece en agar sangre y medios entéricos Colonias amarillas en agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS)	Lisina + Arginina - Voges-Proskauer + NaCl al 8% + NaCl al 10% V	Asociado con infecciones de tejidos blandos: parece también tener un papel etiológico en las infecciones de heridas y óticas
<i>V. damsela</i> CDC grupo EF-5 (transferido al género <i>Photobacterium</i>)	Hábitat: medioambiente marino Infección: exposición de la piel lesionada o de heridas traumáticas a animales marinos infectados o agua marina contaminada	Requiere NaCl al 1% en medios de cultivo no selectivos. Buen crecimiento en agar sangre. Colonias verdes en agar TCBS. Crecimiento óptimo a 25 °C	Arginina + Voges-Proskauer + Fermentación: Glucosa + Manitol - Galactosa + Trehalosa +	Asociado con infecciones de heridas humanas
<i>V. fluvialis</i>	Hábitat: todo el mundo; endémico en Bangladesh. En los Estados Unidos: costa del Golfo, Nueva York y estuarios de la costa noroccidental del Pacífico Infección: ingestión o contacto con agua contaminada	Suplemento de Na ⁺ de los medios de cultivo menos críticos que otras especies de <i>Vibrio</i> halofílicas. Colonias amarillas en agar TCBS	Arginina + NaCl al 6% + Glucosa (gas) - Hidrólisis de esculina - Aminovalerato + Glutarato -	Gastroenteritis y síndrome diarreico similares al cólera: diarrea acuosa, vómitos, deshidratación; probablemente inducidos por enterotoxina
<i>V. parvulus</i>	Hábitat: endémico en las aguas marinas y los estuarios de Asia Infección: ingestión o contacto con agua contaminada	Suplemento de Na ⁺ para el crecimiento óptimo en medios de cultivo no selectivos Colonias amarillas en agar TCBS	Glucosa (gas) + Hidrólisis de esculina - Aminovalerato - Glutarato +	Aislado en pacientes con diarrea y gastroenteritis, sobre todo turistas que regresan de Asia
<i>V. cholerae</i>	Hábitat: medioambiente marino en la costa del Golfo y los estados de la bahía de Chesapeake Infección: consumo de mariscos crudos	Suplemento de NaCl al 1-2% necesario para el crecimiento. Escaso crecimiento en agar TCBS o de MacConkey. Cribado para colonias oxidasas positivas en agar sangre	Indol + Lisina - Arginina - Ornitina - Motilidad (después de 7 días) - Urea -	Aislado en pacientes con diarrea y gastroenteritis. Se comunica la invasión del torrente circulatorio en pacientes con anomalías hepáticas
<i>V. metschnikovii</i>	Hábitat: en todo el mundo en aguas dulces y marinas salobres, ríos, aguas de desecho; también en camarones, cangrejos y langostas Infección: causa del cólera de las aves de corral; exposición o ingestión de agua o animales contaminados	Crece bien en la mayoría de los medios de aislamiento de laboratorio. El suplemento de sodio no es tan crítico como para otros vibriones halofílicos. Colonias amarillas en agar TCBS	Oxidasa - Nitrato - Voges-Proskauer +	Asociado con casos raros y aislados de infecciones humanas: septicemia, infecciones urinarias, heridas, peritonitis
<i>V. mimicus</i>	Hábitat: aguas costeras, y ostras y camarones Infección: ingestión de mariscos mal cocidos (sobre todo ostras)	Crece en medios de aislamiento entérico. Colonias verdes en TCBS	Sacarosa - Manitol + Ornitina + Lipasa V Voges-Proskauer - Polimixina S	Síndrome diarreico relacionado con la producción de toxinas termolábiles y termoestables; también infecciones óticas del nadador

(Continúa)

Cuadro 8-9 Características de las especies de *Vibrio* de importancia clínica distintas de *V. cholerae* (cont.)

ESPECIE	HÁBITAT NATURAL, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA; MODOS DE INFECCIÓN HUMANOS	MEDIOS PARA EL CRECIMIENTO ÓPTIMO EN CULTIVOS DE LABORATORIO	REACCIONES BIOQUÍMICAS CLAVES	SÍNDROMES CLÍNICOS
<i>V. parahaemolyticus</i>	Hábitat: distribución mundial en aguas dulces y saladas. Endémico en Japón Infección: ingestión de mariscos contaminados: peces y mariscos crudos	Crecimiento lento en medios no selectivos. Cribado de colonias oxidasa positivas en agar sangre. Colonias verdes en agar TCBS	Lisina + Arginina – Voges-Proskauer – Lactosa – Salicina – Ureasa V Indol +	Gastroenteritis aguda: náuseas, vómitos, cólicos abdominales, fiebre, escalofríos Prueba de Kanagawa positiva Extraintestinales: heridas y septicemia
<i>V. vulnificus</i> (<i>Vibrio</i> lactosa positiva)	Hábitat: agua costera y estuarios Infección: ingestión de ostras crudas; exposición de heridas traumáticas a animales marinos infectados o agua contaminada	NaCl al 1% necesario para el crecimiento. Crecimiento bueno en agar-sangre. Colonias verdes (85%) o amarillas (15%) en agar TCBS	Lactosa + Lisina + Arginina – Salicina +	Septicemia potencialmente mortal; mortalidad del 50%. Alta asociación con enfermedad hepática preexistente. Las heridas son dolorosas, con necrosis cutánea y muscular

S: sensible, 90% o mayor; V: variable, 11-89%; +: positivo, 90% o mayor; –: negativo, 90% o mayor.

los cepas clínicas se aíslan de heridas superficiales^{83,210,258,279} o del oído externo.^{124,152} También se ha comunicado conjuntivitis,¹⁹⁷ gastroenteritis aguda,²⁶⁵ bacteriemia^{29,83,149} y fascitis necrosante¹¹⁴ causadas por *V. alginolyticus*.

***V. carchariae*.** *V. carchariae* es un patógeno de los tiburones, pero se ha informado un caso de infección de una herida en una niña de 11 años atacada por un tiburón mientras caminaba por el agua hasta el nivel de las rodillas en la costa de Carolina del Sur.²⁵⁵ *V. carchariae* puede ser diferenciado de especies similares desde el punto de vista bioquímico (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) por hidrólisis negativa de gelatina a 22 °C, motilidad negativa a 36 °C y reacción de ornitina descarboxilasa negativa. Las otras especies tienen las reacciones opuestas.

***V. cincinnatiensis*.** La infección humana causada por esta especie de *Vibrio* es rara. Ha sido aislado en sangre y líquido cefalorraquídeo de un paciente de 70 años con bacteriemia y meningitis.³¹ El paciente fue tratado con ampicilina (día 1) y moxalactam durante 9 días, y se recuperó sin complicaciones.

***V. damsela* (*Photobacterium damsela*).** *V. Damsela*, antes denominado grupo CDC EF-5, ha sido comunicado como causa de infecciones de heridas humanas, fundamentalmente después de la exposición a agua salada.^{64,139,226} La mayoría de las cepas son resistentes a la penicilina y sensibles a gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina. MacDonell y Colwell²⁰³ propusieron trasladar *V. damsella* al género *Listonella*. Con posterioridad, Smith y cols. sugirieron que *L. damsela* debe ser reasignado al género *Photobacterium*.²⁸⁴

V. fluvialis Antes designado como CDC grupo EF-6, *V. fluvialis* ha sido aislado de seres humanos con diarrea. Esta especie fue aislada en cultivos fecales de más de 500 pacientes con diarrea en el Cholera Research Laboratory en Bangladesh durante un período de 9 meses entre 1976-1977.¹⁴⁴ En los

Estados Unidos, el microorganismo ha sido aislado en una herida de un paciente en Hawái, en agua y sedimento en la bahía de Nueva York, en mariscos de Louisiana, en agua y mariscos de los estuarios del Pacífico noreste, en un hombre de 81 años de Laredo, Texas, con diarrea,³⁰² en las deposiciones de un lactante de un mes de vida¹³¹ y en las deposiciones de un hombre de 43 años con SIDA.¹³⁷

***V. furnissii*.** Antes designado como *V. fluvialis* biogrupo 2, *V. furnissii* ha sido aislado de pacientes con gastroenteritis aguda al menos en dos brotes de intoxicación alimentaria³³ y de las heces de un lactante de un mes de vida.¹³³

***V. hollisae*.** Antes designado como grupo EF-13 de los CDC, *V. hollisae* ha sido aislado principalmente en muestras de heces de personas con diarrea y dolor abdominal y antecedente de ingesta de mariscos crudos.^{4,130,226} Se describieron raros casos de infección sistémica causada por *V. hollisae* y más a menudo involucran una sepsis bacteriana en personas con deficiencias inmunes subyacentes.^{200,264} Las pruebas sugieren que *V. hollisae* puede compartir con *V. vulnificus* una predilección por la invasión del torrente circulatorio en personas con anomalías hepáticas.²⁶⁴

***V. metschnikovii*.** *V. metschnikovii*, antes grupo entérico 16 de los CDC, se aísla a menudo del medioambiente, pero pocas veces de muestras clínicas humanas. El primer caso documentado de infección humana fue de la sangre de un paciente con colecistitis en el Cook County Hospital en Chicago.¹⁵³ Más recientemente, Hansen y cols. comunicaron dos casos de septicemia por *V. metschnikovii*: un caso fatal en un paciente con cirrosis hepática, insuficiencia renal y diabetes; y otro de una mujer de 82 años con problemas respiratorios y una lesión infectada en la pierna, que fue tratada con éxito.¹²⁵ Las cepas aisladas en humanos remitidas a los CDC para identificación incluyen dos provenientes de muestras de orina y cuatro, de fuentes desconocidas.⁸⁶

V. mimicus Antes clasificado como *V. cholerae* sacarosa negativo, *V. mimicus* ha sido aislado en mariscos y agua y en deposiciones diarreicas humanas e infecciones óticas.^{69,281}

V. parahaemolyticus. *V. parahaemolyticus* produce gastroenteritis en seres humanos luego de la ingestión de mariscos contaminados,²²⁵ cuyo mecanismo no fue dilucidado. Desde 1986, se ha comunicado la propagación pandémica de infecciones por *V. parahaemolyticus* debidas a un único clon en varios países asiáticos.³¹⁵ Los síntomas son diarrea acuosa a veces sanguinolenta, cólicos abdominales, náuseas, vómitos, fiebre, hipertermia leve y escalofríos. En general, la enfermedad es leve a moderada y autolimitada, con una duración de 2 a 3 días. También se describieron infecciones extraintestinales por *V. parahaemolyticus*, principalmente de heridas en contacto con agua salada, aunque pocas veces se comunicó una septicemia primaria.²²⁵ Ha aparecido un biotipo urea positivo que ha sido la causa de varios brotes recientes, a menudo asociados con la ingestión de ostras crudas contaminadas.^{5,184,237,239} Janda y cols.¹⁵² ponen en evidencia que el 70% de los cultivos de *V. parahaemolyticus* remitidos para la identificación al Laboratorio de Enfermedades Microbianas en el Laboratorio del Departamento de Salud de Berkeley, California, fueron ureasa positivos. Se han informado hallazgos similares en la costa noroccidental del Pacífico.¹⁷⁰

Más del 95% de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de pacientes con diarrea son Kanagawa positivas; es decir, hemolizan los eritrocitos humanos en agar de Wagatsuma.¹⁶⁰ La hemolisina es tanto citotóxica como cardiotóxica. Sólo alrededor del 1% de las cepas aisladas de medioambientes marinos son Kanagawa positivas.¹⁵² La consecuencia es que la actividad de hemolisina de Kanagawa se asocia con la patogenia de la gastroenteritis por *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la asociación de hemolisina de Kanagawa con la patogenia nunca fue probada y de hecho Honda y cols.¹⁴² informan que 11 de 12 cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas en pacientes durante un brote de gastroenteritis en 1985 en las Maldivas fueron Kanagawa negativos.

En general, la rehidratación es el único tratamiento necesario.

V. vulnificus. Antes clasificado en el grupo EF-3 de los CDC, *V. vulnificus* fue denominado al principio *Vibrio lactosa* positivo por Hollis y cols. en 1976.¹³⁹ *V. vulnificus* es una especie particularmente virulenta asociada con infecciones de heridas después de la exposición a agua salada contaminada y septicemias primarias y muerte luego del consumo de mariscos contaminados (habitualmente ostras crudas).^{55,57,225} Una alta tasa de mortalidad (40-60%) se asocia con las infecciones sépticas.¹⁵² Los microorganismos alcanzan el torrente circulatorio e invaden la mucosa intestinal. Los pacientes con enfermedad hepática son particularmente susceptibles a la septicemia.^{24,85,301}

Las condiciones médicas que predisponen a la bacteriemia por *V. vulnificus* incluyen disfunción hepática y síndromes que conducen a un aumento del depósito de hierro: cirrosis crónica, hepatitis, talasemia mayor, hemocromatosis y antecedentes de consumo importante de alcohol.¹⁵² Los síntomas principales asociados con la sepsis son fiebre, escalofríos y vómitos, que comienzan unas 38 horas después de ingerir ostras crudas. La diarrea no suele ser un componente del síndrome.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE VIBRIOS EN EL LABORATORIO

Existen cuatro posibles enfoques del abordaje de laboratorio del aislamiento de las especies de *Vibrio* de muestras clínicas:

1. Utilizar procedimientos normales y no realizar ningún esfuerzo específico por buscar especies de *Vibrio*.
2. Utilizar procedimientos y medios de siembra normales, y buscar colonias oxidasa positivas.
3. Incorporar agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS) como placa extra para los coprocultivos y también para otras muestras probables, como las de heridas, sangre, ojo y oído.
4. Utilizar otros procedimientos especiales para aumentar el aislamiento de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y otras especies de *Vibrio*.

Para los laboratorios del medioeste de los Estados Unidos, donde los cultivos positivos para especies de *Vibrio* pueden ser pocos, parece más apropiado el primero o el segundo enfoque. En los laboratorios cercanos a los océanos, sobre todo los localizados en las áreas endémicas, puede estar indicado el tercero o el cuarto enfoque. Sin embargo, las desventajas del uso sistemático de agar TCBS son el mayor costo para una recuperación relativamente baja y que es posible que algunas especies o cepas de *Vibrio* no crezcan bien en agar TCBS. En estos casos, puede estar indicado todavía el uso de un medio selectivo o un enriquecimiento en caldo alcalino, que se explicará en una sección posterior.

Recolección de muestras, procesamiento y selección de medios. Se debe notificar al personal de laboratorio si el médico sospecha un síndrome colérico o infecciones extraintestinales por especies de *Vibrio*. Las muestras deben ser recogidas tan pronto como se presente la enfermedad. En los estadios diarreicos agudos de la enfermedad, las muestras pueden recolectarse del recto con un catéter de goma blando o un hisopo o de una pequeña porción de las heces líquidas evacuadas. El cultivo del vómito también puede producir microorganismos, sobre todo en las primeras etapas de la enfermedad.

Las muestras deben transportarse en recipientes cerrados para preservar la humedad y transferirse a medios de cultivo lo antes posible. En general, las especies de *Vibrio* son muy sensibles al desecamiento, la exposición a la luz solar y el desarrollo de un pH ácido. También son inhibidas fácilmente por la flora intestinal normal o por microorganismos contaminantes. Si no se pueden preparar cultivos de inmediato, las especies de *Vibrio* se mantienen viables en medio de transporte semisólido de Cary-Blair durante un período prolongado. Se debe evitar el uso de un medio de transporte salino con glicerol y buffer. Si no se cuenta con un medio de transporte, se puede embeber en la muestra de heces una tira de 5 cm × 1.25 cm de papel secante grueso, colocarla en una bolsa de plástico sellada y luego enviarla hasta el laboratorio de referencia más cercano.¹⁶⁸ Las muestras sospechosas de albergar especies de *Vibrio* deben ser inoculadas en agar sangre de carnero al 5% y agar de MacConkey. Cada supervisor de laboratorio debe determinar si se debe inocular también una placa de agar TCBS, un tubo de enriquecimiento alcalino con agua peptonada o ambos según la prevalencia de enfermedades relacionadas con *Vibrio* en cada localidad. Si no se utiliza agar TCBS, se deben evaluar las colonias hemolíticas que aparecen en agar sangre de carnero después de una incubación durante toda la noche para detectar actividad de citocromo oxidasa. Se puede tocar en forma individual y evaluar de inmediato cada colonia representativa para la reacción de oxidasa utilizando reactivo de Kovac o se puede dejar caer una o dos gotas de este reactivo en un área sobre la superficie de la placa donde se presentan las colonias sospechosas. El rápido desarrollo de color azul indica una prueba positiva. Las colonias oxidasa positivas pueden ser transferidas a agar TCBS para la identificación de

otras especies utilizando características bioquímicas y otras características.

Los caldos de enriquecimiento con agua peptonada alcalina (APW) deben cultivarse en agar TCBS para una mejor evaluación de las colonias que crecen después de otras 24 a 48 horas de incubación. El APW que contiene peptona al 1% y NaCl al 1% a un pH de 8.6 es un caldo de enriquecimiento de uso simple que puede recomendarse en situaciones en que se anticipan bajas concentraciones de microorganismos en la muestra (p. ej., en estadios de convalecencia de la enfermedad). El pH alto del medio sirve para suprimir el crecimiento de muchas bacterias intestinales comensales mientras permite la multiplicación desinhibida de *V. cholerae*. Se deben realizar subcultivos en agar TCBS o agar gelatina dentro de las 12 a 18 horas, dado que otros microorganismos pueden comenzar a crecer exageradamente en el caldo después de una incubación prolongada. APW también es un medio de transporte excelente si las muestras no pueden entregarse de inmediato al laboratorio para el procesamiento. Se recomienda colocar aproximadamente 1 mL de líquido o 1 gramo de heces formadas en 10 mL de APW en un tubo con tapa a rosca; como alternativa, se pueden colocar hisopados rectales en un tubo que contiene 1 a 2 mL de APW.¹⁶⁸

Identificación presuntiva de especies de *Vibrio* sobre la base de la morfología de las colonias y microscópica. Los vibriones crecen fácilmente en la mayoría de los medios de aislamiento; el crecimiento de todas las especies aumenta con el agregado de NaCl al 1% al medio. En los casos típicos, las colonias son lisas, convexas, de consistencia cremosa, blanco grisáceas y tienen bordes continuos. En ocasiones, se encuentran colonias rugosas que se adhieren al agar. Algunos vibriones marinos pueden moverse en forma ascendente sobre la superficie de los medios de agar, asociados con la formación de células largas con flagelos laterales. Este fenómeno no se observa en la mayoría de las cepas aisladas en los seres humanos.

Desde el punto de vista microscópico, se observan bacilos gramnegativos rectos o curvos (véase lámina en color 8-2D). La característica curva de las células se puede advertir mejor en la fase estacionaria temprana en los cultivos en caldo; en la fase de crecimiento logarítmico, se entremezclan formas cocoides rectas o redondeadas. Aunque se puede realizar un diagnóstico presuntivo de cólera observando gran cantidad de bacilos curvos en las muestras de heces con tinción directa de Gram, se necesita la recuperación del microorganismo en cultivo para la identificación definitiva.

Las reacciones diferenciales en agar TCBS son útiles para hacer una identificación presuntiva de *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Después de 18 a 24 horas de incubación en agar TCBS, *V. cholerae* crece como colonias amarillas lisas, de 2 a 4 mm de diámetro con un centro opaco y una periferia transparente (véase lámina en color 8-2A). Las colonias de *V. alginolyticus*, que también fermentan la sacarosa, producen, además, colonias amarillas en agar TCBS; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, que no utilizan sacarosa, producen colonias verdes azuladas (véase lámina en color 8-2B). En agar gelatina *V. cholerae* crece como colonias transparentes rodeadas de un halo opaco que indica licuefacción de la gelatina (véase lámina en color 8-2C). O'Brien y Colwell describieron un agar taurocolato-telurito-gelatina modificado para la diferenciación entre *V. cholerae* (β -galactosa positivo) y *V. parahaemolyticus* (β -galactosa sobre la base de la hidrólisis de 4-metilumbeliferil- β -D-galactosa, además de la determinación de hidrólisis de gelatina y reducción de telurito.²⁴⁰

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE LAS ESPECIES DE *VIBRIO*

Los miembros del género *Vibrio* son anaerobios facultativos capaces tanto de metabolismo respiratorio como fermentativo. Sin embargo, como crecen y reaccionan en medios de prueba para hidratos de carbono designados para el metabolismo fermentativo, son clasificados con los fermentadores. El hábitat natural para las especies de *Vibrio* es acuático, tanto en agua dulce como salada. El crecimiento y la reactividad bioquímica de la mayoría de las especies aumentan en medios de prueba diferenciales complementados con cloruro de sodio al 1% y al 2%.

La mayoría de las especies de *Vibrio* producen citocromo oxidasa, una característica que las separa de las enterobacterias. Por lo tanto, están incluidas en el grupo de fermentadores oxidasa positivos —especies de *Aeromonas*, especies de *Plesiomonas* y especies de *Chromobacterium*— de los cuales deben ser diferenciadas (cuadro 8-10). Como *V. cholerae* fermenta la glucosa, se observa una reacción que combina profundidad ácida/agar inclinado (pico de flauta) alcalino en agar hierro de Kligler. Como también se fermenta la sacarosa, se observa una combinación profundidad ácida/porción inclinada ácida en agar triple azúcar hierro. *V. cholerae* produce tanto lisina como ornitina descarboxilasas.

Los trabajadores de laboratorio que utilizan agar lisina hierro para evaluar las cepas aisladas en heces observarán que *V. cholerae*, *A. hydrophila* y *P. shigelloides* producen una combinación agar inclinado violeta/profundidad violeta debido a la descarboxilación de lisina. Se puede utilizar arginina para separar *V. cholerae* (negativo) de *Aeromonas* y *Plesiomonas* (positivo). La mayoría de las cepas de *A. hydrophila* hidrolizan la esculina, lo que las distingue de los otros microorganismos incluidos en el cuadro 8-10. Las diferencias en la utilización de lactosa, sacarosa, manitol e inositol también sirven para diferenciar estos géneros.

V. cholerae, que incluye el biotipo El Tor, puede ser distinguido de otras especies de *Vibrio* por su capacidad para producir una prueba de la cuerda positiva (véase lámina en color 8-2E). Para realizar esta prueba, se mezclan colonias bacterianas con algunas gotas de desoxicolato de sodio al 0.5% en un portaobjetos de vidrio. Se introduce un ansa inoculadora en la mezcla y se la separa de la gota. *V. cholerae* produce una cuerda larga que se vuelve más tenaz después de 60 segundos o más (otros vibriones pueden dar una reacción de la cuerda inicial que disminuye o desaparece 45 a 60 segundos más tarde). Una aglutinación positiva en portaobjetos con antisuero O polivalente también es útil para diferenciar *V. cholerae* de otras cepas estrechamente relacionadas (véase lámina en color 8-2F). El biotipo El Tor se puede distinguir de las cepas clásicas de *V. cholerae* por varias características (cuadro 8-11). Las cepas El Tor son activamente β -hemolíticas en agar sangre (véase lámina en color 8-2G) y capaces de aglutinar eritrocitos de pollo (véase lámina en color 8-2H). La prueba de los eritrocitos de pollo se realiza mezclando un manojito de eritrocitos de pollo lavados (suspensión al 2.5% en solución salina) con células bacterianas de un cultivo puro por evaluar. El agrupamiento visible de los eritrocitos indica el biotipo El Tor, a diferencia de las cepas 01 clásicas de *V. cholerae* que carecen de esta propiedad. Las cepas clásicas de *V. cholerae* son sensibles a 50 UI de polimixina B en la prueba de difusión en disco; las cepas El Tor son resistentes. Las cepas El Tor también son Voges-Proskauer positivas, mientras que las cepas clásicas de *V. cholerae* son Voges-Proskauer negativas. Lesmana y cols. describieron una prueba CAMP modificada para diferenciar el bioti-

Cuadro 8-10 Bacilos gramnegativos fermentadores oxidasa positivos: características diferenciales de *Aeromonas hydrophila*, *Pleisomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum* y *Vibrio cholerae*

CARACTERÍSTICAS	A. HYDROPHILA	P. SHIGELLOIDES	C. VIOLACEUM	V. CHOLERAЕ
Agar hierro de Kligler (agar inclinado/ profundidad/sulfuro de hidrógeno)	K/A/-	K - A/A/-	K/A/-	K/A/-
Catalasa	+	+	+	+
Esculina	+	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+
ONPG	+	+	-	+
Indol	+	+	-	+
Voges-Proskauer	(+)	-	-	(-)
Lisina descarboxilasa	+	+	-	+
Ornitina descarboxilasa	-	+	-	+
Hidratos de carbono:				
Lactosa	(-)	(+)	-	-
Sacarosa	+	-	(-)	+
Manitol	+	-	-	+
Inositol	-	+	-	-
Crecimiento en peptona, 1% con:				
NaCl al 0%	+	+	+	+
NaCl al 7%	-	-	-	-
NaCl al 11%	-	-	-	-

+ 90% o más de las cepas son positivas; (+), 51-89% de las cepas son positivas, (-) 10-50% de las cepas son positivas; - menos del 10% de las cepas son positivas; V: variable;
K/A: alcalino/ácido; K - A/A: alcalino a ácido/ácido; ONP: o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido.

po clásico (CAMP negativo) del biotipo El Tor (CAMP positivo fuerte).¹⁹⁶ Las cepas *V. cholerae* 0139 también demuestran una reacción CAMP positiva fuerte, mientras que las cepas no 01 y no 0139 dan una reacción CAMP positiva débil. La prueba se realiza inoculando una cepa de *S. aureus* productora de betalisisina (ATCC 25178) en una placa de agar sangre de carnero al 5% haciendo una única línea recta y luego inoculando las especies de *Vibrio* por evaluar en una línea perpendicular a la estría de *S. aureus* y a algunos milímetros de ella. Las placas se incuban en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela a 37 °C durante 18 a 20 horas y se observan para detectar zonas de hemólisis sinérgica (véase protocolo 8-1). Para los laboratorios capaces de realizar pruebas de sensibilidad a fagos IV, las cepas El Tor son resistentes a este fago.

Como primer paso en la identificación de especies de *Vibrio*, Nelly y cols.¹⁶⁸ han diseñado un esquema dicotómico para separar en seis grupos sobre la base de sus reacciones con siete pruebas: requerimiento de NaCl al 1% para el crecimiento en caldo con nutrientes; producción de oxidasa; reducción de nitrato a nitrito; fermentación de mio-inositol y producción de arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa. Su esquema se reproduce en el cuadro 8-12. El agrupamiento de las especies de esta forma proporciona una identificación presuntiva simple de la mayoría de las cepas clínicas. Se pueden obtener otras reacciones claves y una correlación clínica consultando el cuadro 8-9. Overnam y cols.²⁴⁸ recomendaron el uso de la banda API 20E para realizar las pruebas bioquímicas necesarias para hacer identificaciones de los miembros más hallados de los *Vibrionaceae*. Sin embargo, una evaluación más reciente de los sistemas de identificación comerciales mostró que los seis métodos identificaban correctamente sólo el 63% al 81% de las especies de *Vibrio* evaluadas.²⁴¹ Para *V. cholerae* en particular la precisión varió del 50% al 97%. Por lo tanto, los autores arribaron a la conclusión de que se deben tomar

precauciones extremas en la interpretación de los resultados de los sistemas comerciales de identificación de las especies de *Vibrio*.

Métodos distintos del cultivo. Se ha creado una prueba de tirta reactiva inmunocromatográfica para la detección rápida de *V. cholerae* 01 y 0139 en las muestras de heces. En una evaluación de la prueba en Madagascar y Bangladesh, donde el cólera es endémico, la sensibilidad varió del 94% al 100% y la especificidad, del 84% al 100%.²³⁵ Bhuiyan y cols. modificaron el procedimiento realizando un enriquecimiento durante 4 horas en agua peptonada alcalina antes del ensayo con tirta reactiva.²² Con este otro paso, la sensibilidad y la especificidad, respectivamente, fueron del 96% y del 92% para *V. cholerae* 01 y del 93% y el 98% para *V. cholerae* 0139.

Cuadro 8-11 Diferenciación entre biotipos de *Vibrio cholerae*

PRUEBA	CLÁSICO	EL TOR
Prueba de la cuerda	+	+
β-hemolítico en agar sangre de carnero	-	+
Prueba de CAMP	-	+
Prueba de Voges-Proskauer	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Sensibilidad a 50 U de polimixina B	S	R
Sensibilidad a fago IV	S	R

+: prueba positiva; -: prueba negativa; S: sensible; R: resistente..

Cuadro 8-12 Ocho pruebas diferenciales claves para dividir las 12 especies de *Vibrio* de importancia clínica en seis grupos

PRUEBA	REACCIONES DE LAS ESPECIES EN:											
	GRUPO 1		GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5			GRUPO 6			
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. carchariae</i>
Crecimiento en caldo de nutrientes												
Sin agregado de NaCl	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Con agregado de NaCl al 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato nitrito	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de <i>mi</i> o-inositol	—	—	V	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginina dihidrolasa	—	—	V	—	—	+	+	+	—	—	—	—
Lisina descarboxilasa	+	+	V	V	—	V	—	—	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	—	—	—	—	—	—	V	+	V	—

Todos los datos son para reacciones dentro de los 2 días de 35 °C a 37 °C; +: la mayoría de las cepas (en general 90-100%) son positivas; —: la mayoría de las cepas son negativas (en general 0-10% positivas); V: variable, entre 10-89% son positivas. Los resultados claves están recuadrados.

Tomado de Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III: *Vibrio*. En Ballows A (ed): *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed, pp 384-395. @TFN: Washington DC, American Society for Microbiology, 1991.

Géneros *Listonella*, *Photobacterium* y *Shewanella*

MacDonell y Colwell²⁰³ propusieron reestructurar los *Vibrionaceae* para incluir el establecimiento de dos géneros nuevos, *Listonella* y *Shewanella*, dentro de la familia. A través de estudios de secuenciación de ribonucleótidos rRNA 5S algo complejos y análisis de agrupamiento, estos autores arribaron a la conclusión de que varias especies de *Vibrio*, en especial *V. anguillarum*, *V. pelagius* y *V. damsela* deben ser transferidas a un nuevo género propuesto *Listonella* como *L. anguillara*, *L. damsela* y *L. pelagia*. También concluyeron, a partir de estos estudios, que *Alteromonas* (*Pseudomonas*) *putrefaciens* y *Alteromonas* *hanedai* deben comprender el género nuevo *Shewanella* junto con una nueva especie propuesta: *Shewanella* *benthica*. Después del trabajo de MacDonell y Colwell, Smith y cols. sugirieron que *L. damsela* fuera reasignado al género *Photobacterium* como *P. damsela* sobre la base de los datos fenotípicos.²⁸⁴ Los miembros de los géneros *Listonella*, *Photobacterium* y *Shewanella* se asocian con un medioambiente marino y son patógenos para los peces.

Los miembros del género *Shewanella* (en especial *S. putrefaciens*) son bacilos gramnegativos rectos o curvos, móviles por medio de un único flagelo polar. Las colonias características tienen forma de cúpula, son circulares, ligeramente viscosas o mucoides y suelen ser pardo rojizas o color rosa salmón. Tienen actividad de citocromo oxidasa y producen abundante sulfuro de hidrógeno en agar hierro de Kligler. Los nitratos son reducidos a nitritos y las pruebas de gelatinasa, ornitina descarboxilasa y DNasa son positivas. Se ha aislado *S. putrefaciens* de muestras clínicas humanas, lo cual se explica en detalle en el capítulo 5 de este texto.

Aeromonas y Plesiomonas

Hace varios años, las especies de *Aeromonas* estaban incluidas con las especies de *Vibrio*, y *Plesiomonas* *shigelloides*, en

los *Vibrionaceae*.²⁰ Sin embargo, a partir de pruebas genéticas moleculares, las especies de *Aeromonas* han sido ubicadas en una familia separada: *Aeromonadaceae*.^{66,203} También se ha propuesto colocar *Plesiomonas* en el género *Proteus*. En el cuadro 8-10 se enumeran las diferencias fenotípicas entre las especies de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.¹¹²

Género *Aeromonas*

Como lo indica la denominación de especie hidrófila (con afinidad por el agua), el hábitat natural de las especies de *Aeromonas* es el agua dulce o el agua salada, donde suelen causar enfermedades infecciosas en animales acuáticos de sangre fría. Estas bacterias también residen en sifones de fregaderos y cañerías de desagües y pueden aislarse en grifos de agua corriente y suministros de agua destilada, que son fuentes potenciales de infecciones hospitalarias.

TAXONOMÍA

El género *Aeromonas* ha sufrido considerables revisiones taxonómicas y de nomenclatura durante los últimos años. Sólo se reconocieron cinco especies en 1988.¹⁵¹ Para el año 2000, la cantidad de genomoespecies publicadas válidas se había elevado a 14.¹⁵⁸ En el cuadro 8-13 se mencionan las especies actuales con nombre. A mediados de la década de 1970, el género *Aeromonas* fue dividido en dos grupos: psicrófilico y mesófilico. *A. salmonicida*, un patógeno de los peces, es la única especie en el grupo psicrófilico. Es inmóvil y no crece a 37 °C. El grupo mesófilico de las especies móviles son patógenos humanos potenciales.

IMPORTANCIA CLÍNICA

Se describieron cuatro categorías de infecciones humanas: gastroenteritis, celulitis e infecciones de heridas, septicemia y otras infecciones. Sin embargo, a medida que se ha ampliado

Cuadro 8-13 Especies del género *Aeromonas*

ESPECIES DE AEROMONAS	AISLADO EN: Seres humanos/Patógeno	ENFERMEDAD ASOCIADA	
		Gastrointestinal	Otras*
<i>A. hydrophila</i>	Sí/sí	✓	✓
<i>A. caviae</i>	Sí/sí	✓	✓
<i>A. media</i>	Sí/sí	✓	
<i>A. eucrenophila</i>	Sí/no		
<i>A. veronii</i>			
biovariedad <i>sobria</i>	Sí/sí	✓	✓
biobariedad <i>veronii</i>	Sí/sí	✓	✓
<i>A. jandaei</i>	Sí/sí	?	✓
<i>A. trota</i>	Sí/no		
<i>A. schubertii</i>	Sí/sí		
<i>A. encheleia</i>	Sí/no		
<i>A. allosaccharophila</i>	Sí/no		
<i>A. sobria</i>	No/no		
<i>A. popoffii</i>	No/no		
<i>A. bestiarum</i>	Sí/no		
<i>A. salmonicida</i>	Sí/no		

*Predominantemente septicemia y heridas, que incluyen heridas asociadas con el uso de sanguijuelas medicinales. Pocas veces se han cultivado especies de *Aeromonas* de infecciones oculares, respiratorias, óseas y urinarias; meningitis; colecistitis; endocarditis y peritonitis.

nuestro conocimiento sobre *Aeromonas*, ha aumentado la categoría de otras enfermedades.¹⁴⁷

Janda y otros autores¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ han revisado el espectro de enfermedades infecciosas de las especies de *Aeromonas* y arribaron a la conclusión de que existen fundadas evidencias que apoyan que las especies de *Aeromonas* son agentes causales de diarrea, aunque los datos no son absolutos. Por una parte, estos autores citan varias comunicaciones que indican que hay pocas diferencias importantes entre las personas sintomáticas y asintomáticas que albergan especies de *Aeromonas* en las heces.^{93,140,314} Por el contrario, otras comunicaciones relacionan las especies de *Aeromonas* con gastroenteritis.^{37,118} Watson y cols.³²⁹ propusieron que los factores de virulencia de las especies de *Aeromonas* que producen infecciones intestinales son similares a aquellos de otros patógenos entéricos, es decir, adherencia de las células bacterianas a la mucosa intestinal, producción de toxina e invasión mucosa. Alrededor del 20% de sus pacientes con infecciones intestinales por especies de *Aeromonas* tenían síntomas de disentería similares a los causados por las especies de *Shigella* y por cepas invasoras de *Campylobacter jejuni*. La mayoría de las cepas invasoras incluidas en su estudio, según lo determina la invasividad en cultivo celular, fueron *A. sobria*; una minoría eran *A. hydrophila*. La mayoría de *A. sobria* y *A. hydrophila* producen una toxina extraíble similar a la del cólera (toxina Asao) que causa diarrea acuosa.^{59,238} La idea previa de que *A. caviae* no produce una enterotoxina, no es invasor y no se considera un patógeno humano¹¹³ puede ser cuestionada a la luz de algunos informes en los cuales se observó que esta especie era una causa de gastroenteritis.^{12,106,233,234}

Las infecciones de heridas, que varían en gravedad desde leves, fundamentalmente infecciones cutáneas (p. ej., celulitis), hasta infecciones graves que afectan músculo, articulaciones o hueso, constituyen la segunda afección más frecuente causada por especies de *Aeromonas*, después de la gastroenteritis. Las circunstancias clínicas asociadas con las infecciones de heridas por *Aeromonas* incluyen laceraciones/abrasiones asociadas con deportes acuáticos, heridas por punción u otra lesión penetrante, lesiones por aplastamiento (p. ej., accidente de vehículo de motor) y procedimientos médicos invasivos (p. ej., cirugía intraabdominal, cateterismo).¹⁴⁷ En algunos casos, no se reconoce ningún traumatismo precedente ni acontecimiento precipitante.

Se propusieron cuatro categorías de personas que desarrollan septicemia por *Aeromonas*, sobre la base de la puerta de entrada, el estado patológico subyacente, el estado inmunitario y la exposición a agua dulce. Las dos categorías más frecuentes son los adultos inmunodeprimidos y los lactantes de menos de 2 años que tienen trastornos clínicos subyacentes asociados (p. ej., neoplasias, enfermedad hepatobiliar, diabetes) y *Aeromonas* en el tubo digestivo. La septicemia por *Aeromonas* en estos grupos de pacientes puede ser rápidamente mortal, sobre todo en aquellos con cirrosis hepática o neoplasia subyacente.¹⁸⁹ Una tercera categoría son las personas que desarrollan sepsis secundaria por *Aeromonas* a partir de una mionecrosis relacionada con un traumatismo. La cuarta y más pequeña categoría incluye a los adultos sin ningún defecto subyacente que están expuestos a fuentes de agua dulce. También se describió bacteriemia por *Aeromonas* en pacientes quemados.¹⁶ La mayoría de los casos de septicemia por *Aeromonas* en seres humanos son causados por una de cuatro especies: *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* y *A. jandaei*.^{147,178} *A. schubertii* también ha sido responsable de algunos casos de bacteriemia.

Son infrecuentes otras infecciones por *Aeromonas* e incluyen infecciones del aparato urinario, enfermedad hepatobiliar, meningitis, infecciones óticas, endocarditis, síndrome urémico hemolítico, peritonitis, enfermedad del aparato respiratorio e infecciones oculares.^{15,28,42,63,227}

Las especies de *Aeromonas* de importancia clínica descritas recientemente incluyen *A. schubertii*¹³² (antes grupo entérico 501 de los CDC, manitol, sacarosa e indol negativo), que ha sido incriminado como causa de infecciones de heridas;⁴⁷ *A. veronii*¹³³ (antes grupo entérico 77 de los CDC, ornitina descarboxilasa positivo), del cual se ha comunicado que produce bacteriemia, infecciones de heridas y diarrea;^{6,133,159} y *A. jandaei* (antes *A. sobria* genoespecie DNA grupo 9, sacarosa, esculina y celobiosa negativos).⁴⁶ *A. trota* tiene un perfil bioquímico singular, que incluye reacciones negativas para hidrólisis de esculina, fermentación de arabinosa y la prueba de Voges-Proskauer; reacciones positivas para fermentación de celobiosa, descarboxilación de lisina y utilización de citrato, y sensibilidad a ampicilina.^{45,65}

Este hallazgo puede invalidar el uso de medios selectivos que contienen ampicilina (se explica en la sección anterior) para el cribado de muestras de heces para especies de *Aeromonas*. *A. trota* se ha aislado casi exclusivamente de muestras fecales. *A. allosaccharophila* es otra especie de *Aeromonas* mesofílica nueva aislada de anguiluchos (anguilas jóvenes) enfermos y de las heces de un paciente con diarrea.²⁰⁸ Si bien se asemeja más estrechamente a *A. sobria*, puede distinguirse de éste porque utiliza L-arabinosa y L-histidina como única fuente de carbono. Además, esta especie es singular en su capacidad para producir ácido a partir de D-melibiosa y D-rafinosa, o L-ramnosa o de utilizarlos.²⁰⁸

ESPECIES DE *AEROMONAS* EN SANGUIJUELAS MEDICINALES

La sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis* ha gozado de un resurgimiento como tratamiento para la congestión venosa luego de la cirugía microvascular o plástica. Lamentablemente, las especies de *Aeromonas* están presentes en el intestino de la sanguijuela, donde ayudan en la degradación de los eritrocitos ingeridos. En consecuencia, un número creciente de infecciones por *Aeromonas* se ha asociado con la aplicación de sanguijuelas.^{156,247,278} Aunque algunos de los pacientes tuvieron episodios relativamente triviales de secreción de heridas, otros sufrieron episodios importantes de celulitis, absceso, pérdida tisular y sepsis.^{7,198,216} Se ha recomendado que la aplicación de sanguijuelas se restrinja a tejidos con perfusión arterial para reducir la contaminación de tejidos necróticos con *Aeromonas*. Además, se ha propuesto la administración profiláctica de antibióticos cuando se aplican sanguijuelas.¹⁹⁸

ASLAMIENTO EN EL LABORATORIO DE ESPECIES DE *AEROMONAS* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS

Se deben utilizar agares diferenciales o selectivos cuando se sospecha *Aeromonas* como agente etiológico de gastroenteritis o cuando se remiten muestras de heces para la investigación en pacientes en los que el pico de los síntomas diarreicos ha cedido (recuadro 8-5). La mayoría de las cepas crecen en medios entéricos selectivos como fermentadores de lactosa y, por lo tanto, pueden ser pasados por alto como microorganismos entéricos poco importantes o comensales.

Recuadro 8-5 Agares selectivos utilizados para cultivar *Aeromonas*

1. Agar sangre (con ampicilina o sin ella): el agar sangre se puede hacer selectivo incorporando 10 µg/mL de ampicilina. Janda y cols.¹⁵⁰ recomiendan el uso de un agar sangre de carnero selectivo que contiene ampicilina (agar SB-A) para mejorar la recuperación de especies de *Aeromonas* de las muestras de heces.
2. Agua peptonada alcalina (APW, pH 8,6): inicialmente desarrollado para el aislamiento de especies de *Vibrio*. APW puede utilizarse para aislar las aeromonas presentes en baja cantidad (10 UFC/mL) en las heces. Después del enriquecimiento durante toda la noche, APW es subcultivado en el medio de agar de elección.
3. Agar CIN: desarrollado originariamente para el aislamiento de *Yersinia enterocolitica*. CIN agar también es apropiado para la recuperación de *Aeromonas* de las heces.
4. Agares entéricos: desoxicolato, MacConkey y xilosa-lisina-desoxicolato proporcionaron las mayores eficacias de siembra global de ocho agares entéricos de rutina evaluados para la recuperación de especies de *Aeromonas* de las heces.⁷³

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE ESPECIES DE *AEROMONAS*

Las especies de *Aeromonas* son citocromo oxidasa positivas y se las puede excluir rápidamente de las enterobacterias mediante una prueba de oxidasa. Se puede colocar una gota o dos de tetrametil-*p*-fenilenediamina-dihidrócloruro (reactivo de oxidasa) sobre las colonias superficiales y se observa la evolución de un cambio de color negro característico de las colonias de las especies de *Aeromonas*. Las especies de *Aeromonas* mesofílicas son móviles con flagelos polares en lugar de peritricos similares a las especies de *Pseudomonas*; sin embargo, las especies de *Aeromonas* pueden ser diferenciadas de las últimas porque utilizan glucosa de forma fermentativa en lugar de oxidativa y la mayoría de las especies de *Aeromonas* son indol positivas (las especies de *Pseudomonas* son negativas). Las características fenotípicas de las especies de *Aeromonas*,⁴⁴ revisadas por Altwegg y cols.¹³ y más recientemente por Abbott y cols.,¹⁵¹ se resumen en el cuadro 8-14. Janda y Duffey¹⁵¹ señalan que un inconveniente en la identificación de las especies de *Aeromonas* es que algunos de los equipos de prueba semiautomáticos miniaturizados no pueden distinguir con eficacia entre las especies de *Aeromonas* y *Vibrio fluvialis*. No obstante, el último sólo pocas veces se encuentra en los laboratorios clínicos y puede diferenciarse de las especies de *Aeromonas* por su capacidad de crecimiento en soluciones salinas al 6,5%, para producir colonias amarillas en agar TCBS (sacarosa positivo) y su sensibilidad al agente vibriostático 0/129.¹⁵¹

Namdari y Bottone²³² también describen el fenómeno suicida para la rápida diferenciación de las especies de *Aeromonas*. Este fenómeno se expresa cuando crecen cepas desconocidas en medios de caldo que contienen glucosa al 0,5%. La glucosa aportada suprime el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que conduce a la acumulación de ácido acético y a la muerte celular. *A. hydrophila* es no suicida, aerógena y esculina positiva; *A. sobria* es suicida variable, aerógena y esculina negativa; y *A. caviae* es suicida, anaerógena y esculina positiva. Otros estudios sobre las características bioquímicas y las propiedades serológicas del género *Aeromonas* han sido publicados por Janda y cols. y por Abbott y cols.^{2,148}

Género *Plesiomonas*

El término *plesiomonas* deriva de la palabra griega “vecino”, lo que indica una estrecha asociación con *Aeromonas*. Sin embargo, como ya se mencionó, las especies de *Aeromonas* han sido reclasificadas dentro de su propia familia y se cree que *Plesiomonas* está más estrechamente relacionada con *Proteus* que con *Aeromonas*.^{203,271} y en la actualidad está incluido en la familia de las enterobacterias. *P. shigelloides* es la única especie en el género.

P. shigelloides es ubicuo en las aguas superficiales y en el suelo e infecta distintos animales de sangre fría (ranas, víboras, tortugas, lagartijas). Los seres humanos se infectan fundamentalmente por la ingestión de alimentos contaminados o no lavados. Aunque se aísla menos a menudo en las heces humanas que las especies de *Aeromonas*, la gastroenteritis inducida por *Plesiomonas* ha sido comunicada en niños²¹¹ y en adultos.¹⁴⁰ En el último estudio, 28 de 31 pacientes con gastroenteritis no tenían otros microorganismos que explicaran los síntomas agudos. En Tailandia se informó una tasa de portación de hasta un 5,5%.²⁵⁹

La gastroenteritis relacionada con *plesiomonas* en los seres humanos suele manifestarse como una diarrea acuosa leve en la cual las deposiciones no tienen sangre y ni mucina. Se puede observar colitis grave o enfermedad similar al cólera en los pacientes inmunosuprimidos o con neoplasias gastrointestinales.²⁶⁷ La infección es más prevalente en las regiones subtropicales y tropicales del mundo y durante los meses cálidos del verano. Es probable que la patogenicidad esté relacionada con la producción de una enterotoxina enteropatogénica; Sanyal y cols. demostraron que 13 cepas clínicas que estudiaron producían una acumulación importante de líquido en la prueba del asa ileal.²⁷⁷ La diarrea asociada con *P. shigelloides* ha ocurrido en epidemias pero también en casos aislados. Se describió luego del consumo de mariscos mal cocidos y como causa de diarrea de los viajeros.¹⁴¹ También se comunicaron algunos casos esporádicos de infecciones extraintestinales que incluyen septicemia, meningitis neonatal, celulitis, artritis séptica y colecistitis aguda.^{32,62,266} Hay informes de una infección abrumadora posesplenectomía con *P. shigelloides* en un paciente curado de enfermedad de Hodgkin⁶⁷ y disentería y colitis pseudomembranosa persistentes asociadas con *P. shigelloides* en una mujer de 42 años de Bangladesh.³²³ El espectro de enfermedades clínicas y los factores patógenicos asociados con las infecciones por *Plesiomonas* han sido revisados por Brenden y cols.³²

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO

P. shigelloides es un bacilo gramnegativo móvil, recto, redondeado y corto con flagelos polares y generalmente lofotrico (las especies de *Vibrio* y las especies de *Aeromonas* son monotricas). El microorganismo crece bien en agar sangre de carnero y en la mayoría de los medios entéricos. Los microorganismos aislados son no hemolíticos en agar sangre de carnero, y en 24 horas a 30 °C a 35 °C (el crecimiento es óptimo a 30 °C), las colonias miden en promedio 1,5 mm de diámetro y son grises, brillantes, lisas y opacas y pueden estar ligeramente elevadas en el centro. *P. shigelloides* se aísla fácilmente en agares entéricos como agar de MacConkey, desoxicolato, Hektoen y xilosa-lisina-desoxicolato. Sin embargo, los medios selectivos que contienen ampicilina y se utilizan con frecuencia para las especies de especies de *Aeromonas* no son apropiados para su aislamiento.³²⁵

Cuadro 8-14 Diferenciación de *Pleisomonas shigelloides* y especies de *Aeromonas* de importancia clínica

MICROORGANISMO	HEMÓLISIS DE SANGRE DE CARNERO	OXIDASA	MOTILIDAD	DNASA	INDOL	VOGES- PROS- KAUER	DESCARBOXILASA			ESCOLINA	GAS A PARTIR DE GLUCOSA	FERMENTACIÓN			
							Lisina	Ornitina	Arginina			l-arabinosa	Sacarosa	Manitol	Inositol
Complejo <i>A. hydrophila</i>															
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Complejo <i>A. caviae</i>															
<i>A. caviae</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>A. media</i>	ND	+	-	+	V	-	-	-	+	+	-	+	-	ND	ND
<i>A. eucrenophila</i>	ND	+	+	+	ND	-	-	-	+	+	+	V	V	+	-
<i>A. sobria</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	V	+	+	-
<i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	V	-	+	+	-
<i>A. veronii</i> biotipo <i>veronii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>A. jandaei</i>	+	+	+	ND	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>A. schubertii</i>	V	+	+	+	-	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. trota</i>	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>P. shigelloides</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+

+: 90% o más de las cepas son positivas; -: 90% o más de las cepas son negativas; V: variable, 11-89% de las cepas son positivas; ND: resultados no disponibles. Las áreas sombreadas indican reacciones claves. Datos tomados de las referencias ^{3 y 13,32,45,132,133,151,280}.

P. shigelloides fermenta la glucosa; por lo tanto, la profundidad de los tubos de agar hierro de Kligler o agar triple azúcar-hierro se presenta amarilla. Aparece como un no fermentador de la lactosa en agar de MacConkey y puede confundirse con especies de *Shigella*. La reacción de citocromo oxidasa es positiva y se produce indol. *P. shigelloides* descarboxila arginina, lisina y ornitina. No produce DNasa ni proteasas extracelulares, y fermenta el inositol, pero no el manitol. Estas características claves lo separan de las cuales es separado de las especies de *Aeromonas*. Otras características identificadoras se enumeran en el cuadro 8-14.

P. shigelloides puede ser resistente a penicilina, ampicilina, ampicilina y otras penicilinas sensibles a las β -lactamasas. La mayoría de las cepas son sensibles a los aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y a quinolonas, ciprofloxacina y norfloxacina.^{32,36}

Género *Chromobacterium*

Se hace aquí una breve mención del género *Chromobacterium* porque algunas cepas son fermentadores oxidasa positivos y pueden confundirse con especies de *Aeromonas* y de *Vibrio*. *Chromobacterium violaceum* es la especie encontrada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos, aunque rara vez se asocia con enfermedad humana. Crece bien en agar sangre y la mayoría de las cepas producen abundante pigmento violeta que facilita el reconocimiento. En el cuadro 8-10 se muestran sus principales características bioquímicas. Además, la capacidad del microorganismo para utilizar citrato, reducir nitratos e hidrolizar fuertemente la caseína también es útil para la identificación definitiva.

REFERENCIAS

1. Aabenhus R, Permin H, On SL, Andersen LP. Prevalence of *Campylobacter concinns* in diarrhea of immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis* 2002;4:248-252.
2. Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reaction, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 2003;41:2348-2357.
3. Abbott SL, Cheung WKW, Kroske-Bystrom S, Malekzadeh T, Janda JM. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1992;30:1262-1266.
4. Abbott SL, Janda JM. Severe gastroenteritis associated with *Vibrio cholerae* infection: report of two cases and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:310-312.
5. Abbott SL, Powers C, Kaysner CA, Takeda, Ishibashi M, Joseph SW, Janda JM. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the west coast of the United States and Mexico. *J Clin Microbiol* 1989;27:2891-2893.
6. Abbott SL, Serve H, Janda JM. Case of *Aeromonas veronii* (DNA Group 10) bacteremia. *J Clin Microbiol* 1994;32:3091-3092.
7. Abrutyn E. Hospital-associated infection from leeches. *Ann Intern Med* 1988;109:356-358.
8. Albert MJ. Minireview. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J Clin Microbiol* 1994;32:2345-2349.
9. Alderton MR, Korolik V, Coloe PJ, Dewhirst FE, Paster BJ. *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:61-66.
10. Allen DA, Austin B, Colwell RR. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:599-604.
11. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-1206.
12. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clin Infect Dis* 1995;20:1092-1101.
13. Altwegg M. *Aeromonas caviae*: An enteric pathogen? *Infection* 1985;13:228-230.
14. Altwegg M, Steigerwalt AG, Altwegg-Bissig R et al. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1990;28:258-264.
15. Archer IR, Romero S, Ritchie AE et al. Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:101-105.
16. Baddour LM, Baselski VS. Pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* complex: epidemiologic, clinical, and microbiologic features. *South Med J* 1988;81:461-463.
17. Barillo DI, McManus AT, Cioffi WG, McManus WF, Kim SH, Pruitt BA Jr. *Aeromonas bacteremia* in burn patients. *Burns* 1996;22:48-52.
18. Barrett TJ, Patton CM, Morris GK. Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization. *Lab Med* 1988;19:96-102.
19. Barthel JS, Everett ED. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: The "gold standard" and the alternatives. *Rev Infect Dis* 1990;12:S107-S114.
20. Bates CJ, Clarke TC, Spencer. Prosthetic hip joint infection due to *Campylobacter fetus* [letter]. *J Clin Microbiol* 1994;32:2037.
21. Baumann P, Schubert RHW. Family II.: Vibrionaceae Vernon 1965, 5245 In Krieg NR, Holt JC (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1, p. 516-550. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
22. Blaser MJ, Leaper S, Owen RJ et al. Description of *Campylobacter lardis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr Microbiol* 1983;8:231-238.
23. Bhuiyan NA, Qadri F, Faruque ASG, Malek MA, Salam MA, Nato F, Fournier JM, Chanteau S, Sack DA, Nair GB. Use of dipsticks for rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2003;41:3939-3941.
24. Blake PA, Allegra DT, Synder JD, et al. Cholera—a possible endemic focus in the United States. *N Engl J Med* 1980;302:305-309.
25. Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC. Disease caused by a marine vibrio: clinical characteristics and epidemiology. *N Engl J Med* 1979;300:1-4.
26. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis* 1992;15:386-393.
27. Blaser MJ, Berkowitz ID, Laforee FM et al. *Campylobacter enteritis*: Clinical and epidemiological features. *Ann Intern Med* 1979;91:179-185.
28. Blaser MJ, Wells JG, Feldman RA et al. *Campylobacter enteritis* in the United States. *Ann Intern Med* 1983;98:360-365.
29. Bogdanovic R, Cobeljic M, Markovic V et al. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Pediatr Nephrol* 1991;5:293-295.
30. Bonner JR, Coker AS, Bertyman CR, Pollock HM. Spectrum of *Vibrio* infections in a Gulf coast community. *Ann Intern Med* 1983;99:464-469.
31. Borczyk A, Rosa SD, Lior H. Enhanced recognition of *Campylobacter cryaerophila* in clinical and environmental specimens. Presented before the annual meeting of the American Society for Microbiology, 1991, abstract C-267, p. 386.
32. Brayton PR, Botie RB, Colwell RR et al. *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen. *J Clin Microbiol* 1986;23:104-108.
33. Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Rev Infect Dis* 1988;10:303-316.
34. Brenner DJ, Hickman-Brenner FW, Lee JV et al. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibriofluviensis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J Clin Microbiol* 1983;18:816-824.
35. Bronsdon MA, Goodwin CS, Sly LI et al. *Helicobacter nemestrinae* sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:148-153.
36. Bryner JH, Littleton J, Gates C et al. Paper presented before the XIV International Congress of Microbiology, Manchester, England, 1986.
37. Buck GE. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:1-12.
38. Burke V, Gracey M, Robinson J, et al. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. *J Infect Dis* 1983;148:68-74.
39. Burman WJ, Cohn DL, Reves RR, Wilson ML. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1995;20:564-570.
40. Burnens AP, Angeloz-Wick B, Nicolet J. Comparison of *Campylobacter* carriage rates in diarrhoeic and healthy pet animals. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin* 1992;39:175-180.
41. Burnens AP, Stanley J, Morgentsern R, Nicolet J. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum* [letter]. *Lancet* 1994;344:1569-1570.
42. Butzler JP. Infections with *Campylobacter*. In Williams JD, Heremans W (eds): *Modern Topics in Infectious Diseases*, p. 214-239. London, Medical Books Ltd, 1978.
43. Carta F, Pinna A, Zanetti S, Cana A, Sotgiu M, Fadda C. Corneal ulcer caused by *Aeromonas* species. *Am J Ophthalmol* 1994;118:530-531.
44. Carnahan AM, Beadling J, Watsky D, Ford N. Detection of *Campylobacter upsaliensis* from a blood culture by using the BacT/Alert system. *J Clin Microbiol* 1994;32:2598-2599.
45. Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 1991;29:2843-2849.
46. Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR et al. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1991;29:1206-1210.
47. Carnahan AM, Fanning GR, Joseph SW. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 A. sobria), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1991;29:560-564.
48. Carnahan AM, Marii MA, Fanning GR et al. Characterization of *Aeromonas shubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *J Clin Microbiol* 1989;27:1826-1830.
49. Centers for Disease Control. Waterborne *Campylobacter* gastroenteritis, Vermont. *MMWR* 1978;27:207.
50. Centers for Disease Control. *Campylobacter* sepsis associated with "nutritional therapy"—California. *MMWR* 1981;30:294-295.
51. Centers for Disease Control. Premature labor and neonatal sepsis caused by *Campylobacter fetus* subspecies fetus—Ontario. *MMWR* 1984;33:483-489.

51. Centers for Disease Control. Cholera-Peru, 1991. MMWR 1991;40:108-110.
52. Centers for Disease Control. Cholera-New Jersey and Florida. MMWR 1991;40:287-289.
53. Centers for Disease Control. Imported cholera associated with a newly described toxigenic *Vibrio cholerae* O139 strain-California, 1993. MMWR 1993;42:501-503.
54. Centers for Disease Control. Update: *Vibrio cholerae* O1-western hemisphere, 1991-1994, and *V. cholerae* O139-Asia, 1994. MMWR 1995;44:21-219.
55. Centers for Disease Control. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters-Los Angeles, 1996. MMWR 1996;45:621-624.
56. Centers for Disease Control. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program-Wisconsin, 2001. MMWR 2002;51:548-549.
57. Chiang SR, Chuang YC. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis and antimicrobial therapy. J Microbiol Immunol Infect 2003;36:81-88.
58. Chiu C-H, Kuo C-Y, Ou JT. Chronic diarrhea and bacteremia caused by *Campylobacter lari* in a neonate [letter]. Clin Infect Dis 1995;21:700-701.
59. Chopra AK, Houston CW, Genaun CT et al. Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. J Clin Microbiol 1986;24:661-664.
60. Chusid MJ, Wortmann DW, Dunne WM. "Campylobacter upsaliensis" sepsis in a boy with acquired hypogammaglobulinemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1990;13:367-369.
61. Cimolai N, Gill MJ, Jones A et al. "Campylobacter cinaedi" bacteremia: Case report and laboratory findings. J Clin Microbiol 1987;25:942-943.
62. Claesson Beh, Holmlund Dew, Lindhagen CA et al. *Plesiomonas shigelloides* in acute cholecystitis: A case report. J Clin Microbiol 1990;28:985-987.
63. Clark NM, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system report of 15 cases and review of the literature. Clin Infect Dis 2003;37:506-513.
64. Clarridge JE, Zigelboim-Daum S. Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. J Clin Microbiol 1985;21:302-306.
65. Collins MD, Martinez-Murcia AJ, Cai J. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, a revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1993;43:855-856.
66. Colwell RR, MacDonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. Int J Syst Bacteriol 1986;36:473-477.
67. Curti AJ, Lin JH, Szabo K. Overwhelming postsplenectomy infection with *Plesiomonas shigelloides* in a patient cured of Hodgkin's disease: A case report. Am J Clin Pathol 1985;83:522-524.
68. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 1995;109:136-141.
69. Davis BR, Fanning GR, Madden JM et al. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J Clin Microbiol 1981;14:631-639.
70. Decker CF, Martin GI, Barham WB, Paparello SF. Bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a patient infected with the human immunodeficiency virus [letter]. Clin Infect Dis 1992;15:178-179.
71. Dekeyser P, Gossuin-Detrait M, Butzler JP et al. Acute enteritis due to related vibrio: First positive stool cultures. J Infect Dis 1972;125:390-392.
72. Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL. Spiral organisms in the gastric antrum. Lancet 1997;ii:96.
73. Desmond E, Janda JM. Growth of *Aeromonas* species on enteric agars. J Clin Microbiol 1986;23:1065-1067.
74. Devlin HR, McIntyre L. *Campylobacter fetus* in homosexual males. J Clin Microbiol 1983;18:999-1000.
75. Dubois A, Tarnawski A, Newell W, Fiala N, Wojciech D, Stachura J, Krivan H, Heman-Ackah LM. Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. Gastroenterol 1991;100:884-889.
76. Duerden BI, Eley A, Goodwin L, Magee JT, Hindmarch JM, Bennett KW. A comparison of *Bacteroides ureolyticus* isolates from different clinical sources. J Med Microbiol 1989;29:63-73.
77. Duerden BI, Goodwin L, O'Neil TCA. Identification of *Bacteroides* species from adult periodontal disease. J Med Microbiol 1987;24:133-137.
78. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-741.
79. Eaton KA, Dewhurst FE, Radin MJ, Fox JG, Paster BJ, Krakowka S, Morgan DR. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. Int J Syst Bacteriol 1993;43:99-106.
80. Edmonds P, Patton CM, Gniffin PM et al. *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. J Clin Microbiol 1987;25:685-691.
81. Endtz HP, Ang CW, Van Den Braak N, Luijendik A, Jacobs BC, de Man P, van Duin JM, van Belkum A, Verbrugh HA. Evaluation of a new commercial immunoassay for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:794-797.
82. Endtz HP, Ruijs GJHM, Zwinderman AH et al. Comparison of six media, including a semioil agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. J Clin Microbiol 1991;29:1007-1010.
83. English VL, Lindberg RB. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from wounds and blood of a burn patient. Am J Med Technol 1977;43:989-993.
84. Etoh Y, Dewhurst FE, Paster BJ, Yamamoto A, Goto N. *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Bacteriol 1993;43:631-639.
85. Farmer JJ III. *Vibrio* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia and the sea. Lancet 1979;2:903.
86. Farmer JJ III, Hickman-Brenner FW, Fanning GR et al. Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. J Clin Microbiol 1988;26:1993-2000.
87. Farmer JJ III, Hickman-Brenner FW, Kelly MT. *Vibrio*. In: Lennette EH (ed): Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. pp. 282-301. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1985.
88. Farrugia DC, Eykyn SJ, Smyth EG. *Campylobacter fetus* endocarditis: two case reports and review. Clin Infect Dis 1994;18:443-446.
89. Farugue SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Ahmad QS, Faruque ASG, Salam MA, Ramamurthy T, Nair GB, Weintraub A, Sack DA. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. Emerg Infect Dis 2003;9:1116-1122.
90. Fennell CL, Rompalo AM, Totten PA et al. Isolation of "Campylobacter hyointestinalis" from a human. J Clin Microbiol 1986;24:146-148.
91. Fennell CL, Toner PA, Quinn TC et al. Characterization of *Campylobacter* like organisms isolated from homosexual men. J Infect Dis 1984;149:58-66.
92. Figura N, Guglielmetti P, Zanchi A, Partini N, Armellini D, Bayeli PF, Bugnoli M, Verdiani S. Two cases of *Campylobacter mucosalis* enteritis in children. J Clin Microbiol 1993;31:727-728.
93. Figura N, Marri L, Verdiani S, et al. Prevalence, species differentiation and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. J Clin Microbiol 1986;23:595-599.
94. Fisher R, Samisch W. "Gastropirillum hominis": another four cases. Lancet 1990;ii:59.
95. Fontaine EAR, Borriello SP, Taylor-Robinson D, Davies HA. Characteristics of a gram-negative anaerobe isolated from men with nongonococcal urethritis. J Med Microbiol 1984;17:129-140.
96. Fontaine EAR, Bryant TN, Taylor-Robinson D, Borriello SP, Davies HA. A numerical taxonomic study of anaerobic gram-negative bacilli classified as *Bacteroides ureolyticus* isolated from patients with nongonococcal urethritis. J Gen Microbiol 1986;132:3137-3146.
97. Fox JG, Chien CC, Dewhurst FE, Paster BJ, Shen Z, Melho PL, Woodward DL, Rodgers FG. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. J Clin Microbiol 2000;38:2546-2549.
98. Fox JG, Chilvers T, Goodwin CS et al. *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. Int J Syst Bacteriol 1989;39:301-303.
99. Fox JG, Dewhurst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins Jr MJ, Gorelick PL, Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 1994;32:1238-1245.
100. Fox JG, Lee A. Gastric *Campylobacter*-like organisms: their role in gastric disease of laboratory animals. Lab Animal Sci 1989;39:543-553.
101. Fox JG, Lee A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. Lab Anim Sci 1997;47:222-255.
102. Fox JG, Maxwell KO, Taylor NS, Rumsick CD, Edmonds P, Brenner DJ. "Campylobacter upsaliensis" isolated from cats as identified by DNA relatedness and biochemical features. J Clin Microbiol 1989;27:2376-2378.
103. Fox JG, Taylor NS, Edmonds P et al. *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* subsp. nov. isolated from the gastric mucosa of ferrets (*Mustela putorius furo*), and an emended description of *Campylobacter pylori*. Int J Syst Bacteriol 1988;38:367-370.
104. Fox JG, Yan LL, Dewhurst FE, Paster BJ, Shames B, Murphy JC, Hayward A, Belcher JC, Mendes EN. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. J Clin Microbiol 1995;33:445-454.
105. Freedberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am J Dig Dis 1940;7:443-445.
106. Fritsche D, Dahn R, Hoffmann G. *Aeromonas punctata* subsp. *caviae* as the causative agent of acute gastroenteritis. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1975;233:232-235.
107. Frost JA. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Symp Ser Soc Appl Microbiol 2001;90:855-955.
108. Fujimoto S, Yuki N, Itoh T, Amako K. Specific serotype of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre Syndrome [letter]. J Infect Dis 1992;165:183.
109. Gaudreau C, Lamothe F. *Campylobacter upsaliensis* isolated from a breast abscess. J Clin Microbiol 1992;31:1354-1356.
110. Gebhart CJ, Edmonds P, Ward GE et al. "Campylobacter hyointestinalis" sp. nov.: A new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. J Clin Microbiol 1985;21:715-720.
111. Gebhart CJ, Fennell CL, Murtaugh MP, Stamm WE. *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. J Clin Microbiol 1989;27:1692-1694.
112. George WL, Jones MJ, Nakata MM. Phenotypic characteristics of *Aeromonas* species isolated from adult humans. J Clin Microbiol 1986;23:1026-1029.
113. George WL, Nakata MM, Thompson J et al. *Aeromonas*-related diarrhea in adults. Arch Intern Med 1985;145:2207-2211.
114. Gomez JM, Fajardo R, Palino JF, Arias CA. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol 2003;41:3427-3429.
115. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 1989;39:397-405.
116. Goossens H, Pot B, Vlaes L, et al. Characterization and description of "Campylobacter upsaliensis" isolated from human feces. J Clin Microbiol 1990;28:1039-1046.

107. Goossens H, Vlaes L, Galand I et al. Semisolid blood-free selective-motility medium for the isolation of campylobacters from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1989;27:1077-1080.
108. Gracey M, Burke V, Robinson J. *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet* 1982;2:1304-1306.
109. Grant IH, Richardson NJ, Bokkenheuser VD. Broiler chickens as potential source of *Campylobacter* infections in humans. *J Clin Microbiol* 1980;11:508-510.
110. Grogan R, Diker KS. Abortion associated with *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:3093-3094.
111. Guilmann JP. Epidemic cholera in Latin America: spread and routes of transmission. *J Trop Med Hyg* 1995;98:419-427.
112. Hadden RDM, Gregson NA. Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Symp Ser Appl Microbiol* 2001;90:145S-154S.
113. Hanninen M-L, Happonen I, Saari S, Jalava K. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:160-166.
114. Hansen W, Crockaert F, Yourassowsky E. Two strains of *Vibrio* species with unusual biochemical features isolated from ear tracts. *J Clin Microbiol* 1979;9:152-153.
115. Hansen W, Freney J, Benyagoub H, Letouzay M-N, Gigi J, Wauters G. Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2529-2530.
116. Harvey SM. Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol* 1980;11:435-437.
117. Harvey SM, Greenwood JR. Probable *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1983;18:1278-1279.
118. Heilmann KL, Borchard F. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* 1991;32:137-140.
119. Henry GA, Long PH, Burns JL, Charbonneau DL. Gastric spirillosis in beagles. *Am J Vet Res* 1987;48:831-836.
120. Hickman FW, Farmer JJ III, Hollis DG et al. Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. in patients with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1982;15:395-401.
121. Hickman-Brenner FW, Brenner DJ, Steigerwalt AG, et al. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio parvulus* isolated from a stool sample of one patient. *J Clin Microbiol* 1984;20:125-127.
122. Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ et al. *Aeromonas schubertii* a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1561-1564.
123. Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol* 1987;25:900-906.
124. Hindiyyeh M, Jense S, Hohmann S, Benett H, Edwards C, Aldeen W, Croft A, Daly J, Motrice S, Carroll KC. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool specimens by an enzyme immunoassay and surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the greater Salt Lake City area. *J Clin Microbiol* 2000;38:3076-3079.
125. Hodge DS, Borczyk A, Wat L-L. Evaluation of the indoxyl acetate hydrolysis test for differentiation of campylobacters. *J Clin Microbiol* 1990;28:1482-1483.
126. Hodge DS, Prescott JF, Shewen PE. Direct immunofluorescence microscopy for rapid screening of *Campylobacter* enteritis. *J Clin Microbiol* 1986;24:863-865.
127. Hodge Jr TW, Levy CS, Smith MA. Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* infection in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;21:237-238.
128. Hodinka RL, Gilligart PH. Evaluation of the *Campyslide* agglutination test for confirmatory identification of selected *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol* 1988;26:47-49.
129. Hollis DC, Weaver RE, Baker CN et al. *Halophilic vibrio* species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1976;3:425-431.
130. Holmberg SD, Farmer JJ III. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:633-639.
131. Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW et al. *Plesiomonas enteric* infections in the United States. *Ann Intern Med* 1986;105:690-694.
132. Honda S-I, Goto I, Minematsu I et al. Gastroenteritis due to Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* 1987;1:331-332.
133. Hughes JM, Hollis DG, Gangarosa EJ et al. Noncholera *Vibrio* infections in the United States: Clinical, epidemiological, and laboratory features. *Ann Intern Med* 1978;88:602-616.
134. Huq MI, Alam AKMJ, Brenner DF et al. Isolation of *Vibrio*-like group EF-6 from patients with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1980;11:621-624.
135. Husmann M, Gries C, Jehnichen P, Woelfel T, Gerken G, Ludwig W, Bhakdi S. *Helicobacter* sp. strain Mainz isolated from an AIDS patient with septic arthritis: case report and nonradioactive analysis of 16S rRNA sequence. *J Clin Microbiol* 1994;32:3037-3039.
136. Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:397-410.
137. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;27:332-344.
138. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1930-1933.
139. Janda JM, Brenden R, DeBenedetti JA et al. *Vibrio alginolyticus* bacteremia in an immunocompromised patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;5:337-340.
140. Janda JM, Dixon A, Raucher B et al. Value of blood agar for primary plating and clinical implications of simultaneous isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* from a patient with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1984;20:1221-1222.
141. Janda JM, Duffey PS. Mesophilic aeromonads in human disease: Current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev Infect Dis* 1988;5:980-997.
142. Janda JM, Powers C, Hryant RG et al. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:245-267.
143. Jean-Jacques W, Rajashekaraiya KR, Farmer JJ III et al. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. *J Clin Microbiol* 1981;14:711-712.
144. Jicong W, Guolong L, Zhenhua Z, Yanglong M, Qiang C, Jingchuan W, Sulong Y. $^{15}\text{NH}_4$ excretion test: a new method for detection of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol* 1992;30:181-184.
145. Johnson CC, Reinhardt JF, Edelsein MAC, Mulligan ME, George WL, Finegold SM. *Bacteroides gracilis*, an important anaerobic bacterial pathogen. *J Clin Microbiol* 1985;22:799-802.
146. Jones BL, Wilcox MH. *Aeromonas* infections and their treatment. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:453-461.
147. Jones FS, Orcutt M, Little RB. *Vibrios (Vibrio jejuni n. sp.)* associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med* 1931;53:853-864.
148. Joseph SW, Carnahan AM. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News* 2000;66:218-223.
149. Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. *J Clin Microbiol* 1991;29:565-569.
150. Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit Rev Microbiol* 1982;10:77-124.
151. Kaper JB, Morris Jr JG, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:48-86.
152. Kaper JB, Nataro JP, Roberts NC et al. Molecular epidemiology of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in the U.S. gulf coast region. *J Clin Microbiol* 1986;23:652-654.
153. Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S, Tveit I, Natas O, Bevanger L, Digranes A. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: A prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 2003;158:234-242.
154. Karmali MA, Fleming PC. *Campylobacter* enteritis. *Can Med Assoc J* 1979;120:1525-1532.
155. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M et al. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* 1986;23:456-459.
156. Kaper G, Dickgiesser N. Isolation from gastric epithelium of *Campylobacter*-like bacteria that are distinct from "*Campylobacter pyloridis*." *Lancet* 1985;1:111-112.
157. Kelly MT. Cholera: A worldwide perspective. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S101-S105.
158. Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III, Vibrio. In: Balows A (ed): *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed, chap 37, pp. 384-395. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991.
159. Kelly MT, Peterson JW, Saries HE Jr et al. Cholera on the Texas gulf coast. *JAMA* 1989;261:1598-1599.
160. Kelly MT, Strohm EMD. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific northwest. *J Clin Microbiol* 1989;27:2820-2822.
161. Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Cameron DN, Steigerwalt AG, Makowski JM, Baker CN, Patton CM, Wachsmuth IK. Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol* 1995;33:2940-2947.
162. Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Nicholson MA et al. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J Clin Microbiol* 1991;29:376-385.
163. Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 1994;121:90-93.
164. King EO. Human infections with *Vibrios fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis* 1957;101:119-128.
165. Kirkbride CA, Gates CE, Collins JE. Abortion in sheep caused by a non-classified, anaerobic, flagellated bacterium. *Am J Vet Res* 1986;47:259-262.
166. Kirkbride CA, Gates CE, Collins JE, et al. Ovine abortion associated with an anaerobic bacterium. *J Am Vet Med Assoc* 1985;186:789-791.
167. Klipstein FA, Engert RF, Short HB. Enzyme-linked immunosorbent assays for virulence properties of *Campylobacter jejuni* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1986;23:1039-1043.
168. Ko W-C, Chuang Y-C. *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. *Clin Infect Dis* 1995;20:1298-1304.
169. Kodaka H, Lombard GL, Dowell VR Jr. Gas-liquid chromatography technique for detection of hippurate hydrolysis and conversion of fumarate to succinate by microorganisms. *J Clin Microbiol* 1982;16:962-964.
170. Koenitz W. Ueber das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma Ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1906;22:872.
171. Kulkarni SP, Lever S, Logan JMJ, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:241-247.
172. Kuroki S, Haruta T, Yoshioka M, Kobayashi Y, Nuhna M, Nakanishi H. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:149-151.
173. Lacey SW. Cholera: calamitous past, ominous future. *Clin Infect Dis* 1995;20:1409-1419.
174. Lam S, Yeo M. Urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain. *J Clin Microbiol* 1980;12:57-59.

185. La Scolea LJ. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* meningitis in a neonate. Clin Microbiol Newsl 1985;7:125-126.
186. Lastovica A, Le Roux E, Warren R, Klump H. Clinical isolates of *Campylobacter mucosalis* [letter]. J Clin Microbiol 1993;31:2835-2836.
187. Lastovica AJ, Le Roux E, Penner IL. "Campylobacter upsaliensis" isolated from blood cultures of pediatric patients. J Clin Microbiol 1989;27:657-659.
188. Lastovica AJ, Le Roux E, Warren R, Klump H. Additional data on clinical isolates on *Campylobacter mucosalis* [letter]. J Clin Microbiol 1994;32:2338-2339.
189. Lau SM, Peng MY, Chang FY. Outcomes of *Aeromonas* bacteremia in patients with different types of underlying disease. J Microbiol Infect 2000;33:241-247.
190. Lauwers S, Van Etterijck R, Breynaen I et al. Isolation of *C. upsaliensis* and *C. concisus* from human faeces. Presented before the annual meeting of the American Society for Microbiology, 1991. abstract C-266, p 386.
191. Lecuit M, Abachin E, Manin A, Poyan C, Pochart P, Suarez F, Bengoufa D, Feuillard J, Lavergne A, Gordon JI, Berche P, Guillemin L, Lortholary O. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. N Engl J Med 2004;350:239-248.
192. Lee A. Human gastric spirilla other than *C. pylori*. In: Blaser MJ, ed. *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York, Igaku-Shoin Medical Publishers, 1989; pp. 225-240.
193. Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, Paster BJ, Dewhirst FE, Fraser GJ, Fox JG, Sly LI, Romaniuk PJ, Trust TJ, Kourprach S. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. Int J Syst Bacteriol 1992;42:27-36.
194. Lee K, Baron EJ, Summanen P, Finegold SM. Selective medium for isolation of *Bacteroides gracilis*. J Clin Microbiol 1990;28:1747-1750.
195. Lerner J, Brumberger V, Preac-Mursic V. Severe diarrhea associated with *Aerobacter butzleri*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:660-662.
196. Lesmana M, Alben MJ, Subekti D, Richie E, Tjaniadi P, Walz SE, Lebron CI. Simple differentiation of *Vibrio cholerae* O139 from *V. cholerae* O1 and non-O1, non-O139 by modified CAMP test. J Clin Microbiol 1996;34:1038-1040.
197. Lessner AM, Webb RM, Rabin B. *Vibrio alginolyticus* conjunctivitis. Arch Ophthalmol 1985;103:229-230.
198. Lineaweaver WC, Hill MK, Buncke CM, Follansbee S, Buncke HJ, Wong RKM, Manders EK, Grouing JC, Anthony J, Mathes SJ. *Aeromonas hydrophila* infections following use of medical leeches in replantation and flap surgery. Ann Plast Surg 1992;29:238-244.
199. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol 1997;35:2568-2572.
200. Lowry PW, McFarland LM, Threefoot HK. *Vibrio hollisae* septicemia after consumption of catfish [letter]. J Infect Dis 1986;154:730-731.
201. Luechtefeld NW, Reller LB, Blaser MJ et al. Comparison of atmospheres of incubation for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from animal specimens: 5% oxygen versus candle jar. J Clin Microbiol 1982;15:53-57.
202. Luechtefeld NW, Wang W-L. Hippurate hydrolysis by and triphenyltetrazolium tolerance of *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol 1982;15:137-140.
203. MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella. Syst Appl Microbiol 1985;6:171-182.
204. Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens. J Clin Microbiol 2003;41:2980-2986.
205. Maicristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter ML, Hirschl AM. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1998;36:2772-2774.
206. Mandal BK. Epidemic cholera due to a novel strain of *V. cholerae* non O1—the beginning of a new pandemic? J Infect 1993;27:115-117.
207. Marshall BJ. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. J Infect Dis 1986;153:650-657.
208. Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Caray E, Collins MD. *Aeromona allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett 1992;91:199-206.
209. Maninot M, Jaulhac B, Moog R, De Martino S, Kehrli P, Monteil H, Piemont Y. *Campylobacter lari* bacteremia. Clin Microbiol Infect 2001;4:96-97.
210. Matsiota-Bernard P, Nauciel C. *Vibrio alginolyticus* wound infection after exposure to sea water in an air crash. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:474-475.
211. McNeeley D, Ivy P, CraR JC et al. Plesiomonas: Biology of the organism and diseases in children. Pediatr Infect Dis 1984;3:176-181.
212. McNulty CAM, Dent JC, Curry A, Uff JS, Ford GA, Gear MWL, Wilkinson SP. New spiral bacterium in gastric mucosa. J Clin Pathol 1989;42:585-591.
213. McNulty CAM, Dent JC, Uff JS et al. Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test: An assessment in 1445 patients. Gut 1989;30:1058-1062.
214. McTighe AH. Pathogenic *Vibrio* species: Isolation and identification. Lab Management August 1982, pp. 43-46.
215. Melito PL, Munro C, Chipman PR, Woodward DL, Booth TF, Rodgers FG. *Helicobacter winhamensis* sp. nov., a novel *Helicobacter* sp. isolated from patients with gastroenteritis. J Clin Microbiol 2001;39:2412-2417.
216. Mercer NSG, Beere DM, Bomemisza AJ, Thomas P. Medical leeches as sources of wound infection. Br Med J 1987;294:937.
217. Merino FJ, Agulla A, Villasant PA et al. Comparative efficacy of seven selective media for isolating *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 1986;24:451-452.
218. Middlebrook IL, Dorland RB. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. Microbiol Rev 1984;48:199-221.
219. Mills CK, Ghera RL. Hydrolysis of indoxyl acetate by *Campylobacter* species. J Clin Microbiol 1987;25:1560-1561.
220. Minet J, Grosbois B, Megraud F. *Campylobacter hyointestinalis*: An opportunistic enteropathogen? J Clin Microbiol 1988;26:2659-2660.
221. Monteiro L, de Mascarel A, Sarraquela AM, Bergey B, Barberis C, Talby P, Roux D, Shouler L, Goldfain D, Lamouliane H, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive method and evaluation of two new tests. Am J Gastroenterol 2001;96:353-358.
222. Morris A, Ali MR, Thomsen L, Hollis B. Tightly spiral shaped bacteria in the human stomach: an other cause of active chronic gastritis? Gut 1990;31:139-143.
223. Morris GK, El Sherbeeny MR, Patton CM et al. Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* sp. J Clin Microbiol 1985;22:714-718.
224. Morris Jr JG. *Vibrio cholerae* 0139 Bengal: emergence of a new epidemic strain of cholera. Infect Agents Dis 1995;4:41-46.
225. Morris Jr JG. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin Infect Dis 2003;37:272-280.
226. Morris JG Jr, Wilson R, Hollis DG et al. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet 1982;i:1294-1296.
227. Munoz P, Fernandez-Baca V, Pelaez T, Sanchez R, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. *Aeromonas peritonitidis*. Clin Infect Dis 1994;18:32-37.
228. Nachamkin I. *Campylobacter* infections. Current Opinion in Infectious Diseases 1993;6:72-76.
229. Nachamkin I, Barbagallo S. Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. J Clin Microbiol 1990;28:817-818.
230. Nachamkin I, Stowell C, Skalina D et al. *Campylobacter lari* causing bacteremia in an immunocompromised host. Ann Intern Med 1984;101:55-57.
231. Nair GB, Shimada T, Kurazono H et al. Characterization of phenotypic, serological, and toxigenic traits of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal. J Clin Microbiol 1994;32:2775-2779.
232. Namdari H, Bottone EJ. Suicide phenomenon in mesophilic aeromonads as a basis for species identification. J Clin Microbiol 1989;27:788-789.
233. Namdari H, Bottone EJ. Microbiological and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. J Clin Microbiol 1990;28:837-840.
234. Namdari H, Bottone EJ. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. J Clin Microbiol 1990;28:1796-1798.
235. Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guenole A, Bhuiyan NA, Sack DA, Nair GB, Fournier JM, Chanteau S. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:476-478.
236. Ng VL, Hadley WK, Fennell CL et al. Successive bacteremias with "Campylobacter cinaedi" and "Campylobacter fennelliae" in a bisexual male. J Clin Microbiol 1987;25:2008-2009.
237. Nolan CM, Ballard J, Kaysner CA et al. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis: An outbreak associated with raw oysters in the Pacific northwest. Diagn Microbiol Infect Dis 1984;2:119-128.
238. Notermans S, Havelaar A, Jansen W et al. Production of "Asao toxin" by *Aeromonas* strains isolated from feces and drinking water. J Clin Microbiol 1986;23:1140-1142.
239. Oberhofer TR, Podgore JK. Urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute gastroenteritis. J Clin Microbiol 1982;16:581-583.
240. O'Brien M, Colwell R. Modified taurocholate-tellurite-gelatin agar for improved differentiation of *Vibrio* species. J Clin Microbiol 1985;22:1011-1013.
241. O'Hara CM, Sowers EG, Bopp CA, Duda SB, Strockbine MA. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae. J Clin Microbiol 2003;41:5654-5659.
242. On SLW. Confirmation of human *Campylobacter concisus* isolates misidentified as *Campylobacter mucosalis* and suggestions for improved differentiation between the two species. J Clin Microbiol 1994;32:2305-2306.
243. On SLW. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. Clin Microbiol Rev 1996;9:405-422.
244. On SLW. Taxonomy of *Campylobacter*, *Aerobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. Symp Ser Soc Appl Microbiol 2001;90:1S-15S.
245. On SLW, Bloch B, Holmes B, Hoste B, Vandamme P. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolates from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. Int J Syst Bacteriol 1995;45:767-774.
246. Orlick SL, Welch DP, Kuhls T. Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. J Clin Microbiol 1993;31:569-571.
247. Ouderkirk JP, Bekhor D, Turett GS, Murali R. *Aeromonas* meningitis complicating medicinal leech therapy.
248. Overman TL, Kessler JF, Seabolt JP. Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid Ni-T for identification of member- of the family Vibrionaceae. J Clin Microbiol 1985;22:778-781.
249. Pan-American Health Organization. Cholera in the Americas. Epidemiol Bull 1995;16:11-13.
250. Parsonnet J, Isaacson PG. Bacterial infection and MALT lymphoma. N Engl J Med 2004;350:213-215.
251. Pacual A, Martinez-Martinez L, Garcia-Gestoso ML, Romero J. Urinary tract infection caused by quinolone-resistant *Campylobacter coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:690-691.
252. Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogeny of campylobacters, woliniellas, Bacteroides gracilis, and Bacteroides ureolyticus by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. Int J Syst Bacteriol 1988;38:56-62.
253. Paster BJ, Lee A, Fox JG et al. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. Int J Syst Bacteriol 1991;41:31-38.

264. Pasternak J, Bolivar R, Hopfer RL et al. Bacteremia caused by *Campylobacter*-like organism in two male homosexuals. *Ann Intern Med* 1984;101:339-341.
265. Pavia AT, Bryan JA, Maher KL et al. *Vibrio carthage* infection after a shark bite. *Ann Intern Med* 1989;111:85-86.
266. Penner JL. The genus *Campylobacter*: A decade of progress. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:157-172.
267. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991;324:1043-1048.
268. Pezzlo M, Vaiteer PJ, Burns MJ. Wound infection associated with *Vibrio alginolyticus*. *Am J Clin Pathol* 1979;71:476-478.
269. Pitarangsi E, Echeverria P, Whilmire R et al. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: Prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. *Infect Immun* 1982;35:666-673.
270. Pitak DL, Gindorf JD. Bacteremic cellulitis caused by non-serogroup O1 *Vibrio cholerae* acquired in a freshwater inland lake. *J Clin Microbiol* 1989;27:2874-2876.
271. Popovic-Uroic T, Patton CM, Nicholson MA et al. Evaluation of the indoxyl acetate hydrolysis test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* species. *J Clin Microbiol* 1990;28:2335-2339.
272. Popovic-Uroic T, Patton CM, Wachsmuth IK, Roeder P. Evaluation of an oligonucleotide probe for identification of *Campylobacter* species. *Lab Med* 1991;22:533-539.
273. Quinn TC, Goodell SE, Fennell C et al. Infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*-like organisms in homosexual men. *Ann Intern Med* 1984;101:187-192.
274. Rank EL, Smith IB, Langer M. Bacteremia caused by *Vibrio hollisae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:375-376.
275. Reina J, Fernandez-Baca V, Lopez A. Acute gastroenteritis caused by *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 1995;21:1044-1045.
276. Reinhardt JF, George WL. *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhea. *JAMA* 1985;253:3294-3295.
277. Rolston KVI, Hoptner RL. Diarrhea due to *Plesiomonas shigelloides* in cancer patients. *J Clin Microbiol* 1984;20:597-598.
278. Romero S, Archer JR, Hamacher ME et al. Case report of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:142-143.
279. Roop RM II, Smibert RM, Johnson JL et al. DNA homology studies of the catalase-negative *Campylobacter* and "*Campylobacter fecalis*", an emended description of *Campylobacter sputorum*, and proposal of the neotype strain of *Campylobacter sputorum*. *Can J Microbiol* 1985;31:823-831.
280. Ropper AH. *Campylobacter* diarrhea and Guillain-Barre syndrome. *Arch Neurol* 1988;45:655-656.
281. Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Crhisten R. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *J Syst Bacteriol* 1994;44:416-426.
282. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet* 2004;363:223-233.
283. Sacks SL, Labriola AM, Gill VI, Gordin FM. Use of ciprofloxacin for successful eradication of bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a human immunodeficiency virus-infected person. *Rev Infect Dis* 1991;13:1066-1068.
284. Safran S, Morris JG, Adams M et al. Non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia: Case report and review. *Rev Infect Dis* 1988;10:1012-1017.
285. Sandstedt K, Ursing J. Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. previously known as the CNW group. *Syst Appl Microbiol* 1991;14:39-45.
286. Sandstedt K, Ursing J, Walder M. Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Curr Microbiol* 1983;8:209-213.
287. Sanval SC, Sarawathi B, Sharma P. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *J Med Microbiol* 1980;13:401-409.
288. Sanor C, Limoun-Perotti F, Legre R, Casanova D, Bongrand M, Sambuc R, and Dralcoun M. Nosocomial infections with *Aeromonas hydrophila* from leeches. *Clin Infect Dis* 2002;35:e1-e5.
289. Schmidt U, Chmel H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *J Clin Microbiol* 1979;10:666-668.
290. Schubert RHW, Hegazi M. *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae*, a leter and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1988;268:34-39.
291. Shandera WX, Johnston JM, Davis BR et al. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Clinical characteristics and epidemiology. *Ann Intern Med* 1983;99:169-171.
292. Skirrow MB, Benjamin J. "1001" *Campylobacter*s. Cultural characteristics of intestinal *Campylobacter* from man and animals. *J Hyg (Cambridge)* 1980;85:427-442.
293. Smibert RM. Genus *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907^{AL}. In: Krieg NR, Holt HG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1, pp. 111-118. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
294. Smith SK, Sutton DC, Fuerst JA, Reichelt JL. Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela*. *Int J Syst Bacteriol* 1994;41:529-534.
295. Smoak BL, Kelley PW, Taylor DN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in a cohort of US Army recruits. *Am J Epidemiol* 1994;139:513-519.
296. Solnick JV. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis* 2003;36:349-354.
297. Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE, Tompkins LS. An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *J Infect Dis* 1993;168:379-385.
298. Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:59-97.
299. Sorlin P, Vandamme P, Nortier J, Hoste B, Rossi C, Pavlof S, Struelens MJ. Recurrent "Flexispira rappini" bacteremia in an adult patient undergoing hemodialysis: case report. *J Clin Microbiol* 1999;37:1319-1323.
300. Sevilla J-Y, Regli F, Francioli PB. Guillain-Barre syndrome following *Campylobacter jejuni* enteritis: report of three case and review of the literature. *Arch Intern Med* 1988;148:739-741.
301. Spiegel CA, Telford G. Isolation of *Wolinella recta* and *Actinomyces viscosus* from an actinomycotic chest wall mass. *J Clin Microbiol* 1984;20:1187-1189.
302. Stanley J, Burnes AP, Linton D, On SLW, Costas M, Owen RJ. *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization and cloning of a species-specific DNA probe. *J Gen Microbiol* 1992;138:2293-2303.
303. Stanley J, Linton D, Burnes AP, Dewhirst FE, On SLW, Poner A, Owen RJ, Costas M. *Helicobacter pullorum* sp. nov.—genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiol* 1994;140:3441-3449.
304. Stanley J, Linton D, Burnes AP, Dewhirst FE, Owen RJ, Potyer A, On SLW, Costas M. *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol* 1993;139:2495-2504.
305. Steele TW, McDermott SN. Technical note: The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology* 1984;16:263-265.
306. Steele TW, Owen RJ. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative *Campylobacter* isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:316-318.
307. Steele TW, Sangster N, Lanser JA. DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in central and south Australia. *J Clin Microbiol* 1985;22:71-74.
308. Steinkraus GE, Wright BD. Septic abortion with intact fetal membranes caused by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1608-1609.
309. Stills Jr HF, Hook RR, Kinden DA. Isolation of *Campylobacter*-like organism from healthy Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Clin Microbiol* 1989;27:2497-2501.
310. Swardlow DL, Rie AA. *Vibrio cholerae* non-O1—the eighth pandemic? *Lancet* 1993;342:382-383.
311. Tacket CO, Brenner F, Blake PA. Clinical feature and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J Infect Dis* 1984;149:558-561.
312. Tacket CO, Hickman F, Pierce GV et al. Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* in the United States. *J Clin Microbiol* 1982;16:991-992.
313. Tam CC, O'Brien SJ, Adak GK, Meakins SM, Frol JA. *Campylobacter coli*—an important foodborne pathogen. *J Infect* 2003;47:28-32.
314. Tanner ACR, Badger S, Lai C-H et al. *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int J Syst Bacteriol* 1981;31:432-445.
315. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL. *Wolinella curva* sp. nov., "*Vibrio succinogenes*" of human origin. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:275-282.
316. Tauxe RV, Patton CM, Edmonds P, et al. Illness associated with *Campylobacter lariidis*, a newly recognized *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol* 1985;21:222-225.
317. Taylor DN, Kiehlbauch JA, Tee W, Pitarangsi C, Echeverria P. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J Infect Dis* 1991;163:1062-1067.
318. Tee W, Baird R, Dyall-Smith M et al. *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *J Clin Microbiol* 1988;26:2469-2473.
319. Tee W, Leder K, Karrolm E, Dyall-Smith M. "*Flexispira rappini*" bacteremia in a child with pneumonia. *J Clin Microbiol* 1998;36:1679-1682.
320. Tenover FC, Carlson L, Barbagallo S, Nachamkin I. DNA probe culture confirmation assay for identification of thermophilic *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol* 1990;28:1284-1287.
321. Thompson LM III, Smibert RM, Johnson JL et al. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:190-200.
322. Tolcin R, LaSalvia MM, Kirkley BA, Vetter EA, Cockerill F, Procop GW. Evaluation of the Alexon-rem ProSpec *Campylobacter* Microplate Assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3853-3855.
323. Totten PA, Fennell CL, Tenover FC et al. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): Two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J Infect Dis* 1985;151:131-139.
324. Travis LB, Washington JA II. The clinical significance of stool isolates of *Aeromonas*. *Am J Clin Pathol* 1986;85:330-336.
325. Tuyet DT, Thiem VD, von Seidlein L, Chowdhury A, Park E, Canh DG, Chien BT, Tung TV, Naficy A, Rao MR, Ali M, Lee H, Sy TH, Nichibuchi M, Clemens J, Trach DD. Clinical, epidemiological, and socioeconomic analysis of an out-break of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa Province, Vietnam. *J Infect Dis* 2002;186:1615-1620.
326. Vandamme P, Daneshvar MI, Dewhirst FE, Paster BJ, Kersters K, Groosens H, Moss CW. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:145-152.
327. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:451-455.
328. Vandamme P, Falsen E, Pol B et al. Identification of EF group 22 *Campylobacter* from gastroenteritis cases as *Campylobacter concisus*. *J Clin Microbiol* 1989;27:1775-1781.

319. Vandamme P, Falsen E, Pot B, et al. Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. *J Clin Microbiol* 1990;28:1016-1020.
320. Vandamme P, Falsen E, Rossau R et al. Revision of *Campylobacter*, *Lelicobacter*, and *Wolinella* taxonomy. Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:88-103.
321. Vandamme P, Pugina P, Benzi G, Van Etterijck R, Vlaes L, Kersters K, Butzler J-P, Lior H, Lauwers S. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Aerobacter butzleri* in an Italian school. *J Clin Microbiol* 1992;30:2335-2337.
322. Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Butzler J-P, Goossens H. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., and aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:344-356.
323. Vanloon FPI, Rahim Z, Chowdhury KA et al. Case report of *Plesiomonas shigelloides*-associated persistent dysentery and pseudomembranous colitis. *J Clin Microbiol* 1989;27:1913-1915.
324. Vogt RL, Little AA, Patton CM, et al. Serotyping and serology studies of campylobacteriosis associated with consumption of raw milk. *J Clin Microbiol* 1984;20:998-1000.
325. Von Graevenitz A, Bucher C. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human feces. *J Clin Microbiol* 1983;17:16-21.
326. Walmsley SL, Karmali MA. Direct isolation of atypical thermophilic *Campylobacter* species from human feces on selective agar medium. *J Clin Microbiol* 1989;27:668-670.
327. Wang W-LL, Luechtefeld NW. Effect of incubation atmosphere and temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* from human stools. *Can J Microbiol* 1983;29:468-470.
328. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-1275.
329. Watson IM, Robinson JO, Burke V, et al. Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. *J Clin Microbiol* 1985;22:48-51.
330. Weissman JB, DeWitt WE, Thompson J, et al. A case of cholera in Texas, 1973. *Am J Epidemiol* 1974;100:487-498.
331. Wexler HM, Reeves D, Summanen PH, Molitoris E, McTeague M, Duncan J, Wilson KH, Finegold SM. *Sutterella wadsworthensis* gen. nov., sp. nov., bile-resistant microaerophilic *Campylobacter gracilis*-like clinical isolates. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:252-258.
332. Yan JJ, Ko WC, Huang AH, Chen HM, Jin YT, Wu JJ. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc* 2000;99:166-169.
333. Yao JDC, Ng HMC, Campbell I. Prosthetic hip joint infection due to *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:3323-3324.

Otros bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales

Especies de *Haemophilus*

Taxonomía de *Haemophilus* y microorganismos relacionados

Haemophilus influenzae

Vacunas contra *H. influenzae* tipo b

Infecciones causadas por especies de *Haemophilus*

Meningitis

Epiglotitis

Otitis media

Sinusitis

Bronquitis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Neumonía

Bacteriemia y sus complicaciones infecciosas

Endocarditis

Infecciones urogenitales, maternas y perinatales

Infecciones oculares

Fiebre purpúrica brasileña

Otras infecciones por *Haemophilus influenzae*

Haemophilus parainfluenzae

Haemophilus aphrophilus y

Haemophilus paraphrophilus

Otras especies de *Haemophilus*

Haemophilus ducreyi

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *Haemophilus*

Examen directo de muestras clínicas

Cultivo de especies de *Haemophilus*

Identificación de especies de *Haemophilus*

Diagnóstico de laboratorio de la infección por *Haemophilus ducreyi*

Sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Haemophilus*

Especies de *Actinobacillus*

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Actinobacillus ureae

Actinobacillus hominis

Especies animales en el género *Actinobacillus*

Especies de *Pasteurella* y *Mannheimia*

Taxonomía y características del género *Pasteurella*

Pasteurella multocida

Importancia clínica y virulencia

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Otras especies de *Pasteurella* aisladas de infecciones humanas

Pasteurella pneumotropica ("Actinobacillus pneumotropica")

Pasteurella aerogenes ("Actinobacillus aerogenes")

Pasteurella dagmatis

Pasteurella canis y *Pasteurella stomatis*

Pasteurella bettyae

Pasteurella caballi

Pasteurella gallinarum

Especies de *Mannheimia* (antes complejo “*Pasteurella haemolytica*/*Pasteurella granulomatis*”)

Cardiobacterium hominis

Taxonomía

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Eikenella corrodens

Taxonomía y virulencia

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies de *Kingella* y *Suttonella*

Taxonomía

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies humanas de *Capnocytophaga*

Taxonomía

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies caninas de *Capnocytophaga*

Taxonomía

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies de *Dysgonomonas*

Grupos EF-4A y EF-4B de los CDC

Especies de *Simonsiella*

Streptobacillus moniliformis

Taxonomía

Importancia clínica

Características de los cultivos e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies de *Brucella*

Epidemiología de la brucelosis

Taxonomía de las especies de *Brucella*

Virulencia de las especies de *Brucella*

Espectro clínico de la brucelosis

Diagnóstico serológico de la brucelosis

Aislamiento y características de los cultivos

Identificación de especies de *Brucella*

Tratamiento de la brucelosis

Francisella tularensis

Epidemiología de la tularemia

Reseña histórica y taxonomía

Virulencia de *F. tularensis*

Espectro clínico de la tularemia

Aislamiento y características de los cultivos

Diagnóstico serológico de la tularemia

Tratamiento de la tularemia

Especies de *Bartonella*

Taxonomía y epidemiología de las especies de *Bartonella*

Importancia clínica de las especies de *Bartonella*

Fiebre de Oroya y verruga peruana

Fiebre de las trincheras “clásica” y “urbana”

Angiomatosis bacilar

Peliosis

Fiebre y bacteriemia

Endocarditis

Enfermedad por arañazo de gato

Otras infecciones

Detección, aislamiento e identificación de especies de *Bartonella*

Tipos de muestras

Cultivo

Tinción de Gram y morfología de las colonias

Métodos de identificación

Diagnóstico serológico de las infecciones por *Bartonella*

Sensibilidad a los antibióticos in vitro

Especies de *Afipia*

Taxonomía e importancia clínica

Aislamiento e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies de *Bordetella*

Antecedentes y taxonomía de las especies de *Bordetella*

Epidemiología de la tos ferina

Importancia clínica de *Bordetella pertussis*

Vacunas contra la tos ferina

Importancia clínica de otras especies de *Bordetella*

Bordetella parapertussis

*Bordetella bronchiseptica**Bordetella hinzii**Bordetella holmesii**Bordetella trematum***Aislamiento e identificación de las especies de *Bordetella***

Muestras y medios de cultivo

Pruebas de inmunofluorescencia directa

Características de los cultivos e identificación

Nuevas técnicas para la detección y la identificación de *Bordetella pertussis*

Pruebas serológicas para el diagnóstico de la tos ferina

Tratamiento de la tos ferina

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Bordetella***Especies de *Haemophilus***

Los miembros del género *Haemophilus* son bacilos gramnegativos pequeños e inmóviles que requieren factores presentes en la sangre para su crecimiento; el nombre del género significa en griego "que ama la sangre". Algunas especies de *Haemophilus* necesitan factor X, que no es una sustancia única, sino un grupo de compuestos tetrapirrólicos termoestables provistos por varios pigmentos que contienen hierro (p. ej., hemina, hematina, protoporfirina IX). Estos compuestos se utilizan en la síntesis de catalasas, peroxidasas y citocromos del sistema de transporte de electrones. La mayoría de las especies de *Haemophilus* necesitan también factor V, que es nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, coenzima I) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP, coenzima II). Tanto el factor V como el X se hallan dentro de los eritrocitos, incluidos los eritrocitos de carnero que se encuentran en las fórmulas de agar sangre de uso habitual en los laboratorios clínicos. La sangre de carnero también contiene enzimas que hidrolizan lentamente el factor V.⁵⁹ En consecuencia, los hemófilos dependientes del factor V no crecen en agar sangre de carnero en el cual los eritrocitos están intactos. El calentamiento suave durante el agregado de sangre a la base de agar molteno en la preparación de agar chocolate conduce a la lisis de los eritrocitos, la liberación de los factores X y V, y la inactivación de las enzimas que hidrolizan el factor V. Aun cuando la mayoría de las especies de *Haemophilus* son incapaces de crecer en agar sangre de carnero, se pueden observar colonias pequeñas que crecen alrededor de colonias de otros microorganismos hemolíticos en cultivos mixtos (p. ej., *Staphylococcus aureus*); la lisis de los eritrocitos libera factor X, mientras que el factor V es sintetizado y provisto a los hemófilos por los estafilococos propiamente dichos. Aunque la mayoría de los laboratorios utilizan agar chocolate para el cultivo de especies de *Haemophilus* a partir de muestras clínicas, estos microorganismos también crecen en agar con 5% de sangre de caballo o de conejo. La hemólisis observada en estos medios es útil para la identificación de especies.

Taxonomía de *Haemophilus* y microorganismos relacionados

El género *Haemophilus* se clasifica en la familia *Pasteurellaceae*, que también incluye los géneros *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Phocoenobacter* y *Lonepinella*.^{38,425,455,686,975} Los estudios de secuenciación de RNA ribosómico (rRNA) 16S de estos microorganismos han demostrado la diversidad filogenética de las especies incluidas en *Pasteurellaceae*. En la actualidad, estos géneros son clasificados en el orden propuesto "Pasteurellales" en la división y de las *Proteobacteria*.⁴⁵⁵

Con excepción de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus ureae* y *Actinobacillus hominis*, los miembros del género *Actinobacillus* son fundamentalmente cepas animales. Las especies de *Pasteurella* y *Mannheimia* también son cepas animales que en ocasiones se aíslan de seres humanos. *Mannheimia* es un género nuevo creado en 1999 para acomodar al complejo "*Pasteurella haemolytica*" trehalosa negativa y *Pasteurella granulomatis*.³⁸ *Phocoenobacter* y *Lonepinella* son géneros nuevos que incluyen aislados de marsopas y el medioambiente, respectivamente.^{425,975} En el cuadro 9-1 se presentan las características para la diferenciación de los distintos géneros dentro de la familia *Pasteurellaceae*. Los miembros de los géneros *Actinobacillus*, *Pasteurella* y *Mannheimia* se explican más adelante en este capítulo.

El género *Haemophilus* incluye nueve especies que se encuentran en seres humanos y cinco en animales (recuadro 9-1). Las especies de los seres humanos se asocian con las vías respiratorias altas, salvo por *Haemophilus ducreyi*, que es la causa del chancroide, enfermedad de transmisión sexual. *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* se encuentran fundamentalmente en los surcos gingivales y en la placa dental. *H. aphrophilus* es la única especie que no requiere los factores X o V; el *H. paraphrophilus* similar desde el punto de vista bioquímico necesita factor V para su crecimiento. Si bien los datos quimiotaenómicos y el análisis por electroforesis enzimática multilocus sugieren que estos dos microorganismos son especies separadas, los estudios de homología del DNA, hibridación, transformación genética y ribotipificación indican que representan cepas fenotípicamente similares de la misma especie.^{969,1154,1280} La secuenciación del gen *infB* (factor de elongación 2) de las especies de *Haemophilus* indicó hace poco que todas las especies que necesitan factores X y V están íntimamente relacionadas, que *H. parainfluenzae* constituía un grupo heterogéneo dentro del género y que *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* estaban relacionados en forma remota con la especie tipo, *H. influenzae*.⁵⁵⁰ *H. ducreyi* difiere en varios aspectos de otros miembros del género y en un principio se lo asignó al género *Haemophilus* por su requerimiento del factor X. Algunos estudios de hibridación de DNA han mostrado que *H. ducreyi* está lejanamente relacionado con *H. influenzae* y los otros hemófilos; sin embargo la secuenciación del rRNA 16S ha confirmado su membresía en la familia *Pasteurellaceae*.^{313,1099}

Haemophilus influenzae

Las especies de *Haemophilus* forman parte de la flora bacteriana normal de la orofaringe y la nasofaringe en más del 85% de los adultos.⁹⁰¹ La mayoría de los aislamientos orofaríngeos

Cuadro 9-1 Características para la diferenciación de miembros de la familia *Pasteurellaceae*

CARACTERÍSTICA	<i>HAEMOPHILUS</i>	<i>ACTINOBACILLUS</i>	<i>PASTEURELLA</i>	<i>MANNHEIMIA</i>	<i>LONIPINELIA</i>	<i>PHOCOENOBACTER</i>
Hemólisis	V	V	—	V	—	—
Catalasa	V	V	+	+	—	—
Oxidasa	V	V	V	+	—	+
Requerimiento de factor X	V	—	—	—	—	—
Requerimiento de factor V	+ ^a	V	V	—	—	—
Indol	V	—	+ ^b	—	—	—
Ureasa	V	+	V	—	—	—
Producción de acetofina	—	—	—	—	+	+
ODC	V	—	V	V	—	—
Producción de ácido a partir de:						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
L-arabinosa	—	V	—	V	V	ND
Mesoinositol	—	—	—	V	—	—
D-manitol	—	V	V	+	—	—
D-manosa	V	V	+	—	ND	—
D-melibiosa	—	V	—	—	V	—
D-sorbitol	—	—	V	V	ND	—
Trehalosa	—	V	V	—	ND	—

^a *H. aphrophilus* y *H. ducreyi* son negativos.
^b *P. avium* es indol negativo.
 +: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; ND: datos no disponibles.

son *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* no encapsulados, aunque *H. influenzae* encapsulados (serotipos capsulares a, b, c, d, e y f) pueden encontrarse como parte de la flora normal de las vías respiratorias altas de niños y adultos. Antes de la disponibilidad de las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b, el 2-6% de los niños eran portadores de cepas capsulares serotipo b y hasta en el 60% de los niños de las guarderías infantiles estaba coloniza la orofaringe.⁹⁰¹ La recuperación de *H. influenzae* de muestras de esputo puede reflejar la presencia de estos microorganismos como flora normal. Sin embargo, en las enfermedades respiratorias crónicas (p. ej., bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), tanto *H. influenzae* encapsulado (tipificable) como no encapsulado (no tipificable) pueden causar infecciones graves.^{325,725,910,1134} Las infecciones causadas por hemófilos, sus manifestaciones clínicas y las muestras apropiadas para el cultivo se resumen en el recuadro 9-2.

Entre los hemófilos, *H. influenzae* tipo b se considera el más patógeno de los seis tipos capsulares (es decir, tipos a, b, c, d, e y f). El polisacárido tipo b es el único tipo capsular que contiene dos monosacáridos de pentosa en lugar de azúcares de hexosa como hidratos de carbono de las subunidades. La cápsula tipo b nativa está compuesta por un ácido teicoico lineal que contiene ribosa, ribitol (un alcohol de azúcar de cinco carbonos) y fosfato conectados por enlaces fosfodiéster, y se

denomina PRP (polirribosil-ribitol-fosfato) (fig. 9-1). Aunque la virulencia de *H. influenzae* tipo b es multifactorial, la cápsula de PRP tiene una importancia singular. Algunos estudios en animales con cepas isogénicas transformadas con codificación de DNA para la producción de cápsula confirmaron que las

Recuadro 9-1 Miembros del género *Haemophilus*

Especies humanas	Especies animales
<i>H. influenzae</i> *	<i>H. parasuis</i> (cerdos)
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. paragallinarum</i> (aves)
<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. paracuniculus</i> (conejos)
<i>H. parahaemolyticus</i>	<i>H. haemoglobinophilus</i> (perros)
<i>H. aphrophilus</i>	<i>H. felis</i> (gatos)
<i>H. paraphrophilus</i>	
<i>H. paraphrophaeolyticus</i>	
<i>H. segnis</i>	
<i>H. ducreyi</i>	

*Incluye las anteriores especies de *H. aegyptius* como *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*.

Cuadro 9-2 Enfermedades infecciosas asociadas con especies de *Haemophilus*

Enfermedad	Especies	Muestras para cultivo	Manifestaciones clínicas
Meningitis	<i>H. influenzae</i> tipo b (pocas veces otros tipos capsulares)	LCR; sangre	Signos meníngeos (cefalea, rigidez de nuca), generalmente de inicio insidioso; fiebre, convulsiones. Habitualmente se observa en niños de 1 mes a 2 años de edad
Epiglotitis	<i>H. influenzae</i> tipo b (pocas veces otros tipos capsulares)	Sangre; secreciones laríngeas	Inicio rápido y progresión de odinofagia; disfagia y obstrucción de las vías aéreas superiores; epiglotis roja y tumefacta; puede requerir traqueostomía para establecer una vía aérea
Otitis media	<i>H. influenzae</i> (habitualmente cepas no tipificables)	Hisopado de secreción en conducto auditivo; aspiración con aguja o miringotomía; la sospecha de enfermedad sistémica puede requerir la recolección de LCR o de hemocultivos	Dolor y opresión en los oídos; habitualmente bilateral; membranas timpánicas protruidas y opacas; se puede observar fiebre, irritabilidad y vómitos; se debe sospechar una enfermedad sistémica simultánea
Sinusitis aguda	<i>H. influenzae</i> (habitualmente cepas no tipificables); a veces, <i>H. parainfluenzae</i>	Aspirados sinusales; muestras quirúrgicas	Cefaleas frontales; dolor facial; tumefacción y rubor de tejidos suborbitarios y periorbitarios; empiema sinusal
Faringitis o laringotraqueobronquitis aguda	<i>H. influenzae</i> tipo b	Hisopado faríngeo posterior; secreciones laríngeas	Mucosas inflamadas con tumefacción y exudados amarillos; odinofagia con estridor y tos; similar al crup si se afecta la mucosa laríngea
Bronquitis	<i>H. influenzae</i> (a menudo cepas no tipificables)	Espuito; aspirados transtraqueales; lavados bronquiales	Tos persistente y no productiva; sibilancias y disnea; la enfermedad suele ser crónica con exacerbaciones purulentas periódicas
Neumonía	<i>H. influenzae</i> tipo b; cepas no tipificables recuperadas de pacientes ancianos	Espuito; aspirados traqueales; lavados bronquiales	Tos, producción de espuito y dolor pleurítico; la distribución tiende a ser lobular o segmentaria y simula una neumonía neumocócica; la neumonía bacteriémica causada por cepas no tipificables se observa en los pacientes ancianos
Endocarditis	<i>H. aphrophilus</i> ; <i>H. paraphrophilus</i> ; <i>H. parainfluenzae</i> ; pocas veces, <i>H. influenzae</i>	Sangre	Escalofríos, fiebres en picos, leucocitosis y complicaciones secundarias, como anemia, pérdida de peso, malestar general y anorexia; más comúnmente están afectadas las válvulas mitral y aórtica; alta incidencia de embolización arterial
Infección del tracto genital y bacteremia postparto; sepsis neonatal con meningitis	<i>H. influenzae</i> (no tipificable); <i>H. parainfluenzae</i> ; <i>H. influenzae</i> geno-especies crípticas	Muestras uretrales y endocervicales; sangre; tejidos fetales; LCR	Uretritis causada por secreción mucóide fluida; pueden recuperarse microorganismos de cultivos cervicales y de sangre de mujeres con fiebre postparto; también pueden cultivarse de múltiples sitios genitales (p. ej., glándulas de Bartolino, endometrio); placenta, líquido amniótico y líquidos corporales neonatales
Conjuntivitis	<i>H. influenzae</i> biogrupo <i>aegyptius</i>	Hisopado conjuntival	Caracterizada por secreción conjuntival mucopurulenta; conjuntivas hiperémicas y escleróticas difusamente inyectadas; se propaga a otras personas por secreciones infecciosas de toallas y manos
Fiebre purpúrica fulminante	<i>H. influenzae</i> biogrupo <i>aegyptius</i> (clon de FPB)	Sangre; hisopados conjuntivales; lesiones cutáneas; orofaringe	Fiebre, dolor abdominal con vómitos; petequias y lesiones cutáneas hemorrágicas; los síntomas imitan la meningitis meningocócica, pero no se presenta una meningitis; habitualmente se encuentra una infección conjuntival previa o simultánea con el clon de la FPB o <i>H. influenzae</i> biogrupo <i>aegyptius</i>
Chancroide	<i>H. ducreyi</i>	Hisopados obtenidos de úlceras genitales; aspirados de bubones; muestras de hisopado endocervical	Enfermedad de transmisión sexual caracterizada por lesiones genitales dolorosas y ulcerativas y ganglios linfáticos inguinales supurados y agrandados; puede progresar hasta la formación de abscesos y fistulas si se deja sin tratamiento

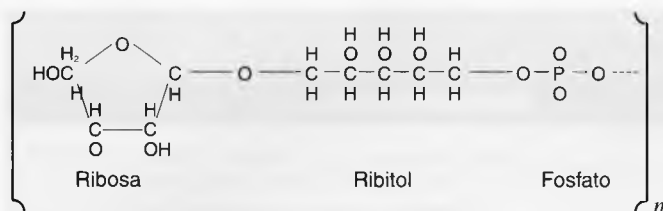


Figura 9-1 Estructura de la unidad de repetición de polirribosa-ribitol-fosfato (PRP) de polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b. Esta molécula consiste en el monosacárido de cinco carbonos ribosa, unido por un enlace éster a ribitol, un alcohol azúcar de cinco carbonos el cual, a su vez, está unido a un grupo fosfato.

cepas de tipo b eran más virulentas que los otros tipos capsulares.¹⁴³⁶ La cápsula de PRP permite que el microorganismo resista la fagocitosis y la destrucción intracelular por los neutrófilos. Los anticuerpos antitipo b promueven la fagocitosis y la destrucción dependientes del complemento (opsonización) de estos microorganismos in vitro e in vivo.¹²⁹⁴ Además de la cápsula tipo b, *H. influenzae* tiene varios factores de virulencia, la mayoría de los cuales se relacionan con adherencia, colonización e invasión. Algunos de estos factores se encuentran tanto en las cepas tipificables como no tipificables, mientras que otros se hallan sólo en *H. influenzae* no tipificables. Los factores de virulencia que se encuentran en *H. influenzae* tipo b y no tipificable se presentan en el recuadro 9-3.

Vacunas contra *H. influenzae* tipo b

Antes de la introducción de vacunas eficaces contra *H. influenzae* tipo b, este microorganismo causaba cerca de 16 000 casos de enfermedad invasora por año en niños de 5 años y menores.^{666,901} La mayoría de las infecciones sistémicas tipo b ocurrían en niños de 2 años y menores. Las concentraciones insuficientes de anticuerpos protectores bactericidas anti-PRP a esta edad desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Durante el período neonatal inmediato, se adquiere inmunidad contra *H. influenzae* tipo b mediante los anticuerpos transplacentarios que se pierden dentro de los primeros meses de vida. Estos anticuerpos vuelven a aparecer luego de la exposición a microorganismos de tipo b o a otros antígenos microbianos que generan anticuerpos reactivos cruzados. La mayoría de los individuos con una enfermedad sistémica por *H. influenzae* tipo b tienen concentraciones bajas o indetectables de anticuerpos anti-PRP capsular. Las capacidades antigénicas del PRP purificado nativo fueron explotadas en los primeros preparados de vacunas contra *H. influenzae* tipo b. El PRP purificado produjo anticuerpos en los niños mayores, pero no obtuvo una respuesta en los menores de 2 años, el grupo con mayor riesgo de sufrir enfermedad grave.⁵⁴⁷ Más aún, el PRP no produjo una respuesta previsible de "refuerzo" con una carga antigénica ulterior. Este fracaso se debió a la naturaleza independiente de las células T de la respuesta inmunitaria primaria contra los antígenos polisacáridos.⁷⁸² Con posterioridad se llevaron a cabo ensayos clínicos con cuatro vacunas conjugadas PRP/proteína.^{305,306,547,999} Los conjugados consistieron en PRP nativo conjugado en forma covalente con toxoide tetánico (PRP-T), toxoide diftérico (PRP-D), un complejo proteico de la membrana externa (OMP) de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMP) y con CRM197, una toxina diftérica "atóxica" aislada de una cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae*

(PRP-HbOC). El uso de este enfoque presumiblemente aumentará la toxicidad del material PRP, ya que la conjugación de las porciones de hidratos de carbono con proteínas como haptenos produce una respuesta inmunitaria dependiente de las células T con la generación de células de memoria.⁷⁸² Después del desarrollo de estos conjugados singulares, se instituyeron ensayos de eficacia clínica en gran escala. Los ensayos clínicos llevados a cabo con las distintas vacunas conjugadas en los Estados Unidos, Reino Unido, Finlandia y otros países en la última década han comunicado eficacias del 95-100%, según la dosificación y los esquemas de inmunización del estudio.^{138,547,999}

En la actualidad, están autorizadas cuatro vacunas conjugadas básicas: PRP-HbOC, PRP-OMP y PRP-T. HbOC, PRP-OMP y PRP-T están autorizadas para uso en niños menores de 12 meses y las cuatro están autorizadas para niños mayores de esa edad (recuadro 9-4). También existen tres vacunas combinadas: DTP-HbOC, DTP-PRP-T y DTaP-PRP-T. Las dos primeras contienen los toxoides diftérico y tetánico y una vacuna contra la tos ferina de células enteras, mientras que la última contiene los toxoides diftérico y tetánico y una vacuna acelular contra la tos ferina. Estas vacunas combinadas se pueden utilizar para la serie de vacuna combinada primaria contra difteria, tétanos, tos ferina y *H. influenzae* tipo b, salvo por DTaP-PRP-T, cuyo uso sólo está autorizado como cuarta dosis de la serie primaria debido a una menor inmunogenicidad en los niños más pequeños.^{207,210,212} El Comité de Enfermedades Infecciosas de la American Academy of Pediatrics y el Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) han redactado recomendaciones relacionadas con la administración de la vacuna contra *H. influenzae* tipo b.^{209,212} Se está evaluando la inclusión de vacunas contra *H. influenzae* tipo b mezcladas con otras vacunas (p. ej., vacuna acelular contra tos ferina, vacuna antipoliomielitis, vacuna contra hepatitis B), el uso de esquemas de administración alternativos y la persistencia de anticuerpos luego de la administración de diferentes vacunas.^{195,202,306,699} En el recuadro 9-5 se presentan las pautas generales para la administración de vacunas.

Durante los ensayos de eficacia de las vacunas, los datos de vigilancia recogidos durante 1992, cuando alrededor del 67% de los niños incluidos de 12 a 24 meses de edad habían recibido al menos una dosis de vacuna conjugada, ya sugerían reducciones espectaculares en la incidencia de enfermedad grave por *H. influenzae* tipo b. En efecto, se observaron grandes disminuciones en la incidencia entre los niños menores de 18 meses mucho antes de que las vacunas conjugadas tuvieran un uso amplio en los lactantes pequeños.⁹¹³ Estos hallazgos sugirieron que las vacunas conjugadas no sólo prevenían la enfermedad al inducir inmunidad activa sino que también disminuían la portación orofaríngea de *H. influenzae* tipo b. Esto fue demostrado en estudios en Europa y los Estados Unidos.^{913,914,1246} Las vacunas pueden proporcionar otra protección a los lactantes no vacunados al reducir su riesgo de exposición a *H. influenzae* tipo b por los contactos mayores vacunados. Será necesaria una vigilancia continua en las poblaciones de niños y adultos para evaluar si la inmunidad generada por las vacunas conjugadas es prolongada o si existe un aumento en la proporción de niños mayores y adultos que son susceptibles a las infecciones por *H. influenzae* tipo b a medida que pasa el tiempo.

Aunque carecemos de experiencia a largo plazo con estas vacunas en niños prematuros o con enfermedades subyacentes, algunos estudios indican que es posible que no sean en ellos tan eficaces. En un estudio de 22 lactantes prematuros con una edad gestacional mediana de 28 semanas, la administración de

Resumen 9-3 Factores de virulencia de *Haemophilus influenzae*

Cápsula

La base genética de la producción de la cápsula de PRP es compleja y comprende tanto determinantes genéticos capsulares como no capsulares. Los genes *capB* existen en el cromosoma como una duplicación de dos segmentos idénticos de 17–18 kb unidos por una región corta de 1–1,3 kb.^{583,732} Esta región contiene *hexA*, que codifica una proteína necesaria para la exportación del material capsular hacia la superficie celular.⁷³⁴ Esta disposición de genes duplicados se encuentra en más del 98% de las cepas de *H. influenzae* tipo b. Por el contrario, los genes *cap* en *H. influenzae* tipos a, c, d, e y f existen como genes de copia única, aunque la evidencia reciente sugiere que las cepas de *H. influenzae* no tipo b invasivas también pueden mostrar una amplificación del gen *cap*.⁹⁵⁹ Las cepas de tipo b deficientes de cápsula carecen de la duplicación del locus de *capB* y tienen sólo una única copia de este gen.⁷³² La ventaja evolutiva teórica impartida por el genotipo *capB* duplicado es la disponibilidad de un molde listo para la amplificación rápida de secuencias del gen capsular de tipo b en condiciones ambientales en las cuales puede ser ventajoso producir más material capsular. Un examen de 36 cepas clínicas invasoras de *H. influenzae* tipo b de Finlandia y 14 cepas de Washington, D.C., mostró que, en efecto, la amplificación de los genes *capB* ocurre principalmente in vivo.⁷³⁵ Quince de las 36 cepas finlandesas y 5 de las 14 cepas estadounidenses contenían tres a cinco copias del gen *capB*. Las cepas con múltiples copias de genes produjeron más polisacárido capsular tipo b: la cepa única que tenía cinco copias elaboró cuatro a cinco veces la cantidad de material capsular tipo b que la cepa de tipo silvestre. Cabe destacar que la encapsulación de los microorganismos de tipo b se asocia con menor adherencia a las células humanas y menor invasión de éstas.¹²²⁸ Los mutantes deficientes en cápsulas de tipo b como resultado de la pérdida de una copia de la duplicación en el locus *capB* mostraron un aumento de 50 veces en la adherencia a las células epiteliales humanas y un aumento de casi 300 veces en las capacidades invasoras. El restablecimiento de la encapsulación por la transformación condujo a una gran disminución tanto en la adherencia como en la invasión.

Adhesina de las fimbrias

Las fimbrias se encuentran en las cepas de tipo b encapsuladas y en alrededor de 30–40% de las cepas no tipificables.^{465,466} Algunas fimbrias median tanto la hemaglutinación como la adherencia a las células mucosas humanas, pero en realidad inhiben la invasión de las células mucosas.³⁹⁷ Las fimbrias de *H. influenzae* están compuestas por una proteína mayor de 24 kDa (HifA) y dos proteínas menores de peso molecular 20,6 (HifD) y 45,5 kDa (HifE).^{466,845,1232} La proteína HifE se ubica en los extremos de las fimbrias; las mutaciones en el gen *hifE* conducen a la producción de fimbrias que tienen una capacidad reducida de hemaglutinar y adherirse a las células epiteliales.^{466,845,1224} En conjunto, las fimbrias intactas median la adherencia al unirse a glucoproteínas y glicolípidos sobre la superficie de las células eucariontes y a las proteínas de la mucina respiratoria.^{393,735} Los genes para estas proteínas (*hifA*, *hifD* e *hifE*) existen como un conjunto de copia única de dos genes (*hifC* e *hifB*) que codifican proteínas involucradas en la reunión de las fimbrias (HifC) y la protección de las proteínas de las fimbrias nacientes de la degradación durante la exportación desde la célula (HifB).¹²³² Las fimbrias compuestas por otra proteína de las fimbrias, denominada fimbrina P5, también han sido identificadas en cepas de *H. influenzae* no tipificables y en cepas de las geno-especies crípticas halladas en el tracto genital.⁴⁹¹ Esta proteína de 36,4 kDa muestra una homología de secuencia con la proteína de la membrana externa P5 (véase más adelante) y también se adhiere a las células orofaríngeas humanas, la mucina y el moco de las trompas de Eustaquio en el modelo de otitis media de la chinchilla.⁴⁹¹ Aunque esta proteína muestra una heterogeneidad interespecie considerable entre las cepas no tipificables, se han identificado epítomos conservados de la fimbrina P5 como posibles antígenos para vacunas experimentales.⁹⁴⁷ Recientemente, se describió todo el conjunto de genes de las fimbrias de la geno-especie del tracto genital críptico de *H. influenzae* y se observó que consistía en cinco genes (*ghfA* a *ghfE*) que son homólogos al conjunto de genes *hif* de otras cepas de *H. influenzae*.¹⁸³

Adhesinas HMW1 y HMW2

HMW1 (160 kDa) y HMW2 (155 kDa) son adhesinas proteicas de alto peso molecular que se encuentran en el 70–80% de *H. influenzae* no tipificable y median la adherencia a las células epiteliales.¹²³⁰ Estas proteínas están relacionadas estructural y funcionalmente con la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis*.⁸⁷ Los genes para estas proteínas están también dispuestos en grupos sobre el cromosoma junto con los genes que codifican las proteínas que exportan, localizan y activan estas grandes proteínas de la membrana externa (OMP).⁸⁸ En un estudio con microorganismos aislados del oído medio y nasofaríngeos compatibles no tipificables de niños con otitis media, predominaron las cepas que tenían HMW1 y HMW2; las cepas que no expresan estas adhesinas expresaron la adhesina hia (véase más adelante) o las fimbrias hemaglutinantes.⁷²⁷ Aunque estas proteínas son bastante heterogéneas de una cepa a otra, algunos estudios de inmunización en animales con HMW1/HMW2 purificado mostraron cierta protección de la otitis media ante la exposición a la cepa homóloga.⁸⁶ Los aislamientos de diferentes sitios anatómicos o asociados con diferentes trastornos clínicos (p. ej., cepas asociadas con otitis media frente a cepas asociadas con EPOC) pueden diferir en el nivel de expresión de los genes de adhesina de HMW.¹³¹³ Estas proteínas tienen epítomos expuestos a la superficie que pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas basadas en péptidos sintéticos recombinantes para *H. influenzae* no tipificable.⁸⁹

Adhesina HAP

HAP es una adhesina no perteneciente a las fimbrias de 155 kDa que se encuentra en todas las cepas de *H. influenzae* y media la adherencia y la invasión de las células epiteliales.¹²²⁷ La proteína hap tiene tanto actividad adhesiva como de proteasa y está relacionada con la proteasa IgA de *H. influenzae* pero es distinta de ella. Esta molécula es sintetizada, secretada y sufre escisión autoproteolítica con la liberación del dominio adhesivo de la superficie celular.⁴¹⁸ La interacción del dominio adhesivo hap con fibronectina, laminina o colágeno inhibe la escisión proteolítica de hap y promueve la adherencia bacteriana a estas proteínas. Debido a su actividad proteolítica, esta molécula también puede actuar después de la invasión celular. La inmunización intranasal de ratones con adhesina hap inhibe la colonización nasofaríngea.²⁹⁶

Adhesinas Hia y Hsf

Algunas cepas no tipificables que carecen de las adhesinas HMW1/HMW2 tienen otra proteína no perteneciente a las fimbrias denominada Hia.⁹⁰ Hia es una adhesina proteica de 115 kDa estructuralmente similar a la proteína Hsf, una adhesina menor hallada en las cepas tipo b.^{1225,1226} La proteína hia es sintetizada y secretada intacta y se mantiene completamente asociada a la célula con la membrana externa bacteriana.¹²²⁵ Las proteínas Hsf existen sobre las células como apéndices de la superficie fibrilar cortos y delgados que son distintos de las fimbrias. El locus del gen *hsf* de las cepas tipo b muestra homología de secuencia con el locus hia de las cepas no tipificables.

Recuadro 9-3 Factores de virulencia de *Haemophilus influenzae* (cont.)**Proteína A asociada con la opacidad (OapA)**

OapA es una proteína adhesina de 47 kDa hallada en todas las cepas de *H. influenzae*. Se ha demostrado que esta proteína media la adherencia a las células epiteliales en cultivo y es necesaria para la colonización faríngea en modelos animales.^{1026,1355} En medio de crecimiento transparente, OapA es responsable de una morfología opaca de las colonias.

Hemocina

Más del 90% de las cepas de *H. influenzae* tipo b también producen una bacteriocina denominada "hemocina".^{788,789} Las bacteriocinas son proteínas producidas por distintas especies bacterianas que pueden inhibir el crecimiento de las cepas de la misma especie o de cepas relacionadas. La hemocina no es producida por cepas de *H. influenzae* encapsulados no tipo b o no tipificables, aunque la mayoría de estos microorganismos son sensibles a sus efectos letales.⁷⁸⁸ La producción de hemocina puede contribuir a la capacidad de las cepas de *H. influenzae* tipo b para competir eficazmente con cepas no tipificables en la colonización nasofaríngea.

Proteasa IgA

H. influenzae produce una proteasa IgA1 que inactiva la inmunoglobulina humana A1, lo que explica más del 90 % de la IgA presente en la orofaringe.⁶⁸⁷ Esta molécula es distinta de la adhesina Hap, la cual tiene cierta homología de secuencia con la proteasa IgA. Aunque el 97% o más de las cepas de *H. influenzae* no tipificables tienen el gen de proteasa IgA (*iga*), la actividad de proteasa es mayor en las cepas aisladas clínicas de esputo, sangre y LCR que en las cepas aisladas de hisopados de fauces de portadores asintomáticos.¹³³³

Lipooligosacáridos

Las cepas de *H. influenzae* tienen un lipopolisacárido (LPS) asociado con la membrana externa que consiste en lípido A unido a través del ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KCO) con un polímero polisacárido central que consiste en monosacáridos neutros. Sin embargo, difiere del LPS de los microorganismos entéricos y de otro tipo en que carece de las cadenas laterales terminales repetidas (los antígenos "O" o somáticos).⁸⁵ Por lo tanto, el LPS de *H. influenzae* se denomina con más precisión lipooligosacárido (LOS). El LOS lípido A tiene todas las actividades endotóxicas del LPS lípido A, incluida mitogenicidad, pirogenicidad en conejos, agregación plaquetaria y letalidad en el modelo de endotoxemia del ratón. En el LOS, los oligosacáridos centrales neutros –glucosa, galactosa, glucosamina y heptosa– varían en su cantidad y en sus relaciones estructurales tanto entre las cepas como dentro de una cepa dada. La variación de fase de LOS a nivel genético ocurre por cambios en la cantidad de secuencias de cuatro nucleótidos genómicos (5'-CAAT-3') que conducen a desviaciones en el marco de lectura del codón/anticodón.⁵⁶⁹ Además, el LOS de muchas cepas de *H. influenzae* está sialilado y, por lo tanto, es estructural y antigénicamente similar a los oligosacáridos sialilados de los esfingolípidos glucolados humanos. Esta modificación de LOS ayuda a los microorganismos a evadir la opsonización y la fagocitosis al imitar las estructuras moleculares halladas normalmente en el huésped. El LOS de *H. influenzae* también es investigado como posible antígeno para el desarrollo de una vacuna contra *H. influenzae* no tipificable. El LOS destoxificado conjugado con proteínas de la membrana externa de *H. influenzae* o con toxoide tetánico es inmunogénico y la inmunización activa con estos conjugados redujo la incidencia de otitis media debida a *H. influenzae* no tipificable en el modelo de la chinchilla.^{506,1398} El análisis de loci genéticos responsables de la biosíntesis y la estructura del LOS ha puesto en evidencia que la expresión de ciertos loci (p. ej., el gen *lic2B*) puede asociarse con un aumento de la virulencia.¹⁰⁰⁸

Proteínas de la membrana externa

Las cepas de *H. influenzae* tienen seis a ocho OMP en la membrana externa de la pared celular. La investigación sobre OMP de *H. influenzae* se ha centrado en aquellos que podrían ser útiles como componentes de una vacuna contra *H. influenzae* no tipificable. Los OMP designados P2 y P6 han generado un mayor interés como antígenos potenciales de la vacuna. P2, el principal OMP de *H. influenzae*, comprende más del 50% del contenido de OMP. Esta proteína tiene un peso molecular de entre 38 y 40 kDa, existe en la membrana externa como un trímero y funciona como una porina; por lo tanto, está parcialmente expuesta sobre la superficie de las cepas no tipificables.^{911,1176} En modelos animales, los anticuerpos dirigidos contra la proteína P2 son bactericidas y protectores contra la infección ante la exposición. Los epítomos de P2 también son inmunogénicos en los seres humanos y son dianas para los anticuerpos bactericidas que aparecen durante las infecciones por *H. influenzae* no tipificable.⁹¹¹ El análisis de secuencia de aminoácidos de la proteína P2 purificada indica que las porciones de la molécula que están enterradas dentro de la membrana externa están conservadas en sus secuencias de aminoácidos, mientras que los epítomos expuestos a la superficie son sumamente variables en su secuencia de una cepa a otra.^{106,1176} Además, los epítomos expuestos de P2 en cepas respiratorias individuales cambian en el tiempo como resultado de cambios únicos y secuenciales de bases en los genes estructurales de P2.³⁵⁸ Utilizando niveles animales y la técnica de anticuerpos monoclonales, se ha demostrado que la principal respuesta anti-P2 está dirigida contra una única "asa" expuesta de la superficie de la molécula de P2.¹⁴¹⁷ Los cambios en la secuencia de aminoácidos dentro de esta región conducen a la eliminación inmunológica de los microorganismos que tienen el fenotipo P2 "reconocido". Este fenotipo es suplantado en el tiempo por microorganismos que expresan el fenotipo P2 ligeramente alterado. Este mecanismo puede explicar en parte la naturaleza crónica de algunas infecciones asociadas con *H. influenzae* no tipificable (p. ej., sinusitis, EPOC). Al considerar las proteínas P2 como antígenos "candidatos" a la vacuna, el análisis de OMP de P2 de distintas cepas de *H. influenzae* será necesario para identificar epítomos que estén conservados desde el punto de vista estructural e inmunológico.⁹¹¹

P6 es una proteína que comprende 1 al 5% del contenido de OMP y está presente sobre la superficie tanto de las cepas tipificables como no tipificables.⁹³⁰ Tiene un peso molecular de 16,6 kDa y es en realidad una lipoproteína asociada con peptidoglucano.⁹¹² En el modelo de rata lactante y en el modelo de otitis media en la chinchilla los anticuerpos dirigidos contra P6 son bactericidas y protectores contra la exposición.^{317,912} En el modelo de ratón de otitis media, la inmunización intranasal con P6 purificado condujo a la inducción tanto de IgA mucoso específico de P6 como de respuestas inmunes mediadas por células.⁷⁰² El análisis de secuencia de aminoácidos de la proteína P6 y la secuenciación de nucleótidos del gen P6 de las cepas tipo b y no tipificables mostró una homología mayor del 97%, lo que indicó que el gen P6 está altamente conservado a nivel genético.⁹³⁰ Los anticuerpos bactericidas dirigidos contra P6 están presentes en el suero humano normal. Debido a su naturaleza conservada y a su inmunogenicidad demostrada en animales y seres humanos, el OMP de P6 justifica otras investigaciones como candidato potencial para la inclusión en una vacuna contra *H. influenzae* no tipificable. Otros estudios han demostrado que los loci genéticos que codifican P2 no sufren tasas altas de variación genética en las secuencias de codificación, pero pueden mostrar variación en las áreas donde se localizan las secuencias repetitivas.⁵⁷⁴

Recuadro 9-4 Vacunas actualmente autorizadas de conjugados de *H. influenzae* tipo b

Vacuna	Fabricante	Hidratos de carbono	Proteínas transportadoras
PRP-D	Pasteur Merieux	PRP de tamaño intermedio	Toxoide diftérico
PRP-HbOC	Wyeth Lederle	Oligosacárido PRP pequeño	Toxina diftérica mutante no tóxica (CRM ₀₋₁)
PRP-T	Pasteur Merieux	PRP de tamaño grande	Toxoide tetánico
PRP-OMP	Merck & Co.	PRP de tamaño intermedio	Complejo de OMP de <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B

PRP-OMP a los 2 y 4 meses de edad cronológica condujo sólo a un 27% y un 55% de lactantes que demostraron concentraciones anti-PRP mayores de 1 µg/mL después de la primera y la segunda dosis de vacuna, respectivamente.¹³⁵¹ Esta respuesta de anticuerpos fue significativamente menor que la observada en lactantes de término. En un estudio de seguimiento de lactantes extremadamente prematuros llevado a cabo 7 años después de recibir la vacuna se observó que los niños prematuros tenían títulos más bajos de anticuerpos a varios antígenos de vacuna que los niños de término que habían recibido vacunas.¹³⁵² En un estudio de 19 niños infectados por HIV-1 que fueron inmunizados con una única dosis de PRP-T o HbOC a una edad media de 28 meses, sólo 7 presentaron concentraciones de anticuerpos anti-PRP que indicaban inmunidad.¹⁰⁰⁶ En otro estudio realizado en niños africanos infectados por HIV tam-

bién se observó una disminución significativa de la respuesta a la vacuna.⁸⁰⁶ Se propone que la escasa respuesta a la vacuna en los individuos infectados por HIV se debe al estado de depleción de células T de los pacientes y a la naturaleza dependiente de las células T de la respuesta inmunitaria a las vacunas conjugadas. Las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b son inmunógenas en los adultos HIV-seropositivos, pero la capacidad para desarrollar concentraciones protectoras de anticuerpos se relaciona con los recuentos basales de linfocitos T CD4 y las concentraciones de IgG.^{338,1220}

Infecciones causadas por especies de *Haemophilus* MENINGITIS

Con anterioridad a la utilización de las vacunas, *H. influenzae* era la causa más frecuente de meningitis bacteriana en los

Recuadro 9-5 Pautas para la administración de vacunas de conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b^{207,209,210,212}

1. Todos los niños deben recibir una de las vacunas conjugadas autorizadas para uso en lactantes (HbOC-PRP-OMP o PRP-T), comenzando a los 2 meses de edad. Si se utiliza PRP-OMP para la primera vacunación, se administra otra dosis a los 4 meses, con una tercera dosis a los 12–15 meses de edad. Para las vacunas HbOC y PRP-T, se administran tres dosis en intervalos de 2 meses (2, 4 y 6 meses) con una cuarta dosis a los 12–15 meses de edad. Para las dosis de los 12–15 meses, se puede utilizar cualquiera de las vacunas conjugadas. Estas vacunas pueden administrarse durante las visitas cuando se están administrando otras vacunas (p. ej., sarampión, parotiditis, rubéola) y los lactantes programados para recibir tanto HbOC como DTP pueden recibir la vacuna de combinación, HbOC-DTP. En general, las vacunas conjugadas deben administrarse en una jeringa separada y en un sitio separado de DTP u otras vacunaciones.
2. Para los niños para los cuales no se inicia la inmunización hasta los 7 a 11 meses de edad, se debe administrar HbOC, PRP-OMP o PRP-T en ese momento, con una dosis de la misma vacuna administrada 2 meses más tarde. Se administra una tercera dosis de refuerzo de cualquiera de las vacunas conjugadas a los 12–18 meses de edad.
3. Para los niños en los cuales se inicia la vacunación a los 12–14 meses de edad, se puede administrar PRP-De, HbOC, PRP-OMP o PRP-T. Se deben administrar dos dosis y la segunda dosis se debe administrar al menos dos meses después de la primera.
4. Para los niños no vacunados de 15 meses a 5 años, se recomienda una dosis única de cualquiera de las vacunas conjugadas autorizadas.
5. La serie de inmunización para lactantes prematuros se basa sobre la edad cronológica y se debe comenzar a los 2 meses de edad.
6. Para los lactantes en los que la primera serie de inmunizaciones para difteria, tétanos o tos ferina se ha diferido hasta el año de edad (p. ej., niños con ciertos trastornos neurológicos), la vacuna PRP-OMP puede presentar una ventaja dado que es inmunogénica en ausencia de toxoides diftérico o tetánico. La vacuna combo DTP-HbOC no debe utilizarse para la inmunización de lactantes en los cuales está contraindicada la vacunación contra la tos ferina. Esto incluiría a los lactantes con antecedentes de reacciones inmediatas a DTP o el desarrollo de encefalopatía (alteraciones de conciencia, convulsiones). Dentro de los 7 días de recibir la vacuna DTP.
7. Para los niños de 12 meses a 7 años de edad con deterioro inmunitario subyacente (p. ej., los que tienen trasplante de médula ósea, drepanocitosis, esplenectomía, enfermedades neoplásicas que requieren quimioterapia) que han recibido una serie primaria de inyecciones y una dosis de refuerzo a los 12 meses de edad o más, no se necesitan otras dosis de la vacuna, aunque algunos han recomendado la administración de una dosis adicional antes de someterse a un ciclo de quimioterapia o a una esplenectomía. Para los niños de 12–59 meses de edad con estos trastornos subyacentes que no han sido vacunados, se recomienda 2 dosis de cualquier vacuna conjugada administradas con dos meses de separación.
8. Los niños no vacunados que tienen drepanocitosis o asplenia y tienen más de 5 años de edad pueden recibir una dosis de cualquier vacuna conjugada. Se requieren dos dosis de cualquier vacuna administrada con 1–2 meses de separación para los niños con infección por HIV, procesos malignos, trasplante de médula ósea y deficiencia de IgG2. Los datos de eficacia de la vacuna en niños de menos de 12 meses de edad con deficiencia de subclases de inmunoglobulinas o infección por HIV actualmente son limitados.
9. Para los niños que han tenido una enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b antes de los 2 años de edad, la inmunización previa se debe descartar y se debe volver a administrar vacuna conjugada durante la convalecencia según los esquemas apropiados para la edad señalados antes. Los niños en los cuales se desarrolla una enfermedad por *H. influenzae* después de los 2 años de edad no necesitan reinmunización, dado que la propia infección induce una respuesta inmune protectora en niños inmunológicamente normales de esta edad.

niños de entre 1 mes y 2 años de edad, y la incidencia pico era entre los 6 y los 12 meses de edad.⁶⁶⁶ Entre los 2 y los 6 años, *H. influenzae* y *Neisseria meningitidis* ocurrían con igual frecuencia; la meningitis por *H. influenzae* era infrecuente en los niños mayores de 6 años. Más del 90% de las cepas aisladas en estos casos pertenecían al serotipo capsular b.⁹⁰¹ Desde el punto de vista clínico, la meningitis por *H. influenzae* tipo b se asemeja estrechamente a la meningitis meningocócica. La colonización nasofaríngea previa en un huésped sensible conduce a la invasión del torrente circulatorio y la siembra ulterior de las meninges. Los síntomas de infección de las vías respiratorias altas de etiología viral y de otitis media a menudo preceden la aparición de la meningitis.¹²⁴⁷ El inicio de los signos y los síntomas puede ser brusco o insidioso, y el último es el patrón más frecuente. Los niños presentan fiebre, malestar general y, en ocasiones, vómitos; la rigidez de la nuca suele estar ausente. Algunos niños pueden sufrir parálisis de nervios periféricos, craneales o ambos, y crisis comiciales. Es necesario un alto índice de sospecha, abordajes diagnósticos agresivos (punción lumbar para recoger líquido cefalorraquídeo [LCR], recolección de hemocultivos y administración temprana de tratamiento antibiótico apropiado) y una comunicación estrecha con el laboratorio para establecer el diagnóstico correcto. Aunque relativamente infrecuentes, las complicaciones de la meningitis por *H. influenzae* tipo b son absceso encefálico, derrame subdural, pericarditis, artritis séptica e infecciones localizadas en otros sitios corporales debido a la diseminación hematogénea.^{218,401} La mayoría de los casos actuales de meningitis por *H. influenzae* tipo b ocurren en pacientes que no han sido inmunizados.⁹³³

La meningitis por *H. influenzae* en adultos es infrecuente y suele complicar trastornos subyacentes, como la pérdida de LCR luego de un traumatismo de cráneo o procedimientos neuroquirúrgicos. También puede ser el resultado de una extensión directa desde un foco contiguo de infección en los senos paranasales o el oído medio.^{1134,1210} Las enfermedades subyacentes debilitantes, como diabetes, alcoholismo crónico, neumonía, infección por HIV y otros estados de inmunodeficiencia también predisponen a los adultos a la meningitis por *H. influenzae*.^{325,725} Alrededor del 50% de los casos se deben a cepas no tipificables de *H. influenzae* y el otro 50% son causados por cepas tipo b y otras cepas encapsuladas.^{910,1210}

H. influenzae se propaga a través de las secreciones respiratorias y existe un riesgo elevado de enfermedad invasora secundaria para los contactos domésticos no vacunados o con vacunación incompleta de 4 años de edad o menores. En este último grupo, este riesgo puede ser mayor de 500 veces.⁹⁹⁸ La rifampicina, el fármaco de elección para la quimioprofilaxis, erradica la portación orofaríngea y, por lo tanto, la transmisión del microorganismo. Según la *American Academy of Pediatrics* (AAP), se debe administrar profilaxis a todos los miembros de la casa (incluidos los adultos) cuando hay un contacto o contactos menores de 48 meses cuyo estado de inmunización es incompleto.¹⁰⁰⁵ La AAP define el contacto como un niño que es miembro de la casa o que ha pasado 4 o más horas por día con el caso índice por lo menos durante 5 de los 7 días que precedieron al comienzo de la enfermedad. La dosificación de rifampicina para los niños es de 20 mg/kg una vez por día durante 4 días y para los adultos, 600 mg dos veces por día durante 2 días.⁹⁹⁸ Para que sea eficaz se la debe administrar a los contactos cercanos dentro de los 7 días desde el inicio de la enfermedad en el caso índice. Todos los miembros de una casa donde hay un niño inmunizado de menos de 12 meses de edad (los niños que aún no han recibido el "refuerzo" de los 12-15

meses) deben recibir rifampicina. La quimioprofilaxis no es necesaria cuando todos los contactos domésticos menores de 48 meses de edad han completado su serie de inmunización. Los niños que asisten a guarderías y son contactos de casos índices deben recibir profilaxis con rifampicina cuando no están vacunados o cuando tienen una vacunación incompleta y están expuestos al caso índice durante 25 o más horas en la semana previa al inicio de la enfermedad en el caso índice.

En los últimos años también se ha comunicado meningitis por *H. influenzae* como complicación de infecciones de derivaciones del LCR.^{779,1390} Estas infecciones han ocurrido principalmente en lactantes y niños y han involucrado derivaciones de tipo ventriculoperitoneal, ventriculoauricular y lumboperitoneal. Aunque las infecciones de las derivaciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus aureus* suelen desarrollarse por la contaminación intraoperatoria o perioperatoria de la derivación y el LCR ventricular, al parecer las infecciones de las derivaciones por *H. influenzae* son el resultado de la siembra de la derivación y el LCR durante la bacteriemia. Los pacientes con signos y síntomas de meningitis a menudo tienen otras infecciones asociadas por *H. influenzae*, como otitis media. Los microorganismos aislados en el líquido de la derivación han sido cepas capsulares tipo b o han sido no tipificables. Aunque las infecciones de las derivaciones causadas por bacterias grampositivas requieren la extracción/reemplazo del cuerpo extraño para lograr la curación, la antibioticoterapia sistémica sin extraer la derivación a menudo tiene éxito para eliminar las cepas tipo b, aunque el tratamiento farmacológico sólo ha tenido menos éxito en las infecciones de derivaciones causadas por cepas no tipificables.^{779,1390}

EPIGLOTITIS

H. influenzae tipo b ha sido asociado históricamente con epiglotitis, una celulitis de los tejidos supraglóticos que conduce a edema laríngeo obstructivo.⁹⁰¹ La epiglotitis pocas veces ocurre en lactantes y se observa típicamente en niños de 2 a 7 años y en varones de 20-30 años. En general, la presentación es aguda, con odinofagia intensa, disfagia, fiebre y tumefacción de la epiglotis por encima de la laringe en la base de la lengua.¹²⁵⁹ En los niños, este inicio brusco ayuda a diferenciar clínicamente la epiglotitis del crup causado por distintos agentes virales (p. ej., virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza) y de la tos ferina causada por *Bordetella pertussis*. A medida que la enfermedad progresa, la deglución se torna cada vez más difícil y se asocia con sialorrea, estridor inspiratorio y dificultad respiratoria incipiente. La intubación endotraqueal y la administración enérgica de terapia antibiótica y de sostén puede salvar la vida en los casos de obstrucción de la vía aérea. Aunque los cultivos faríngeos posteriores no son útiles debido a la presencia de otra flora nasofaríngea, casi siempre se aísla *H. influenzae* tipo b de los hemocultivos. La epiglotitis también puede aparecer en adultos, en quienes la fiebre, la odinofagia, la disfagia y la dificultad respiratoria son los signos y los síntomas de presentación.¹³⁸⁹ La introducción de estrategias de vacunación eficaces también ha afectado la incidencia de epiglotitis.^{904,1248} En un estudio sueco, una comparación de la incidencia anual media de epiglotitis en el período prevacunación (1987-1991) con la incidencia en 1996 mostró disminuciones del 95% en los niños de 0 a 4 años, del 83% en los niños de 5 a 9 años y del 30% en los niños de 15 años y mayores.⁴⁵⁴ Sin embargo, a pesar de las vacunas eficaces, se ha comunicado epiglotitis debida a *H. influenzae* tipo b en niños que han recibido las series completas de vacunaciones.¹³⁴¹

OTITIS MEDIA

La otitis media se refiere a la inflamación del oído medio y se divide quirúrgicamente en dos síndromes: otitis media aguda (líquido en el oído medio acompañado por signos y síntomas de infección aguda) y otitis media con derrame (líquido en el oído medio sin signos ni síntomas).¹⁰⁹⁷ La otitis media aguda puede ser clasificada a su vez como no complicada, persistente, recurrente o crónica.¹⁰¹¹ La otitis media ocurre principalmente en niños de 6 meses a 5 años, con la incidencia máxima entre los niños menores de 3 años. La alta incidencia de esta infección en los niños pequeños refleja los mecanismos protectores subdesarrollados de la trompa de Eustaquio. La otitis media aguda suele ocurrir como complicación de infección viral (p. ej., virus sincitial respiratorio [VSR], virus parainfluenza). Los síntomas son dolor ótico, hipoacusia y, a veces, secreción desde el conducto auditivo externo. Los signos son fiebre, irritabilidad, cefalea y, en ocasiones, náuseas y vómitos. En los pacientes con otitis media aguda, la otoscopia neumática pone en evidencia una membrana timpánica abombada roja y opacificada relativamente inmóvil. En la otitis media con derrame, se observa abombamiento o disminución de la movilidad de la membrana, pero ésta parece sólo ligeramente inflamada. El diagnóstico etiológico definitivo requiere la aspiración con aguja del líquido del oído medio (timpanocentesis), que no se realiza de rutina. Sin embargo, cuando hay secreción, debe recogerse para cultivo. Puede ser necesario el cultivo simultáneo de LCR y sangre si aparecen signos y síntomas sistémicos.

Las causas bacterianas más frecuentes de otitis media aguda son *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, y el 25% al 66% son causadas por *H. influenzae*.^{143,689} Más del 90% de las cepas de *H. influenzae* aisladas de muestras apropiadamente recogidas son no tipificables y el 10% restante son de tipo b.³⁹⁵ Hasta el 25% de los niños con otitis media causada por microorganismos tipo b también tienen una bacteriemia simultánea, meningitis o ambas.¹⁴⁵ Las complicaciones incluyen otitis media aguda recurrente, persistencia de los derrames del oído medio que requiere la inserción de tubos de drenaje, deterioro auditivo, mastoiditis, meningitis, otitis media crónica, absceso encefálico y sepsis.⁷⁷⁵ Cabe destacar que sólo el 20-30% de las muestras de líquido de oído medio recogidas de niños con otitis media con derrame tienen cultivos bacterianos positivos, aunque sólo ahora se está apreciando el papel de los microorganismos de crecimiento lento y con requerimientos nutricionales especiales (p. ej., *Alloiococcus otitidis*) como causas de esta infección.⁵⁶¹ Se ha recomendado amoxicilina/clavulanato combinados con amoxicilina (vía bucal), axetilo de cefuroxima (vía bucal) o ceftriaxona (intramuscular) como antibióticos de elección para el tratamiento de la otitis media recurrente y persistente.^{576,1011}

SINUSITIS

La sinusitis aguda se caracteriza por síntomas de resfriado persistente, secreción nasal y nasal posterior purulenta, tos, fiebre, cefalea y, a menudo, dolor facial.¹²⁰⁰ Esta presentación aguda se mezcla con un trastorno denominado sinusitis crónica, caracterizado por la persistencia de los signos y los síntomas anteriores más allá de una duración de 3 meses, con la tos y la secreción nasal purulenta como los síntomas principales.¹¹⁴⁵ Una sensación de plenitud facial o la presencia de edema o cambio de color alrededor de los ojos puede indicar la extensión del proceso infeccioso desde los senos paranasales a los tejidos blandos de la órbita. El diagnóstico de sinusitis se

hace principalmente por la evaluación de los signos y los síntomas; en ocasiones se utilizan técnicas por imágenes (radiografía, tomografía computarizada, resonancia magnética) para visualizar los senos etmoidales y esfenoidales y determinar la afectación orbitaria. En los estudios en los cuales se obtuvieron muestras quirúrgicas o mediante aspiración con aguja de los espacios de los senos maxilares, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* fueron los microorganismos aislados más a menudo. Los estudios bacteriológicos cuidadosos de pacientes con sinusitis aguda han demostrado con claridad que *H. influenzae* es el agente etiológico principal en el 20-25% de los adultos y en el 36-40% de los niños, respectivamente.^{179,1200} Estos agentes suelen ser invasores secundarios luego de una infección sinusal viral (p. ej., rinovirus). La mayoría de las cepas de *H. influenzae* aisladas en pacientes con infecciones sinusales agudas son no tipificables.^{395,910} *H. influenzae* desempeña un papel menor en la patogenia de la sinusitis crónica. Un estudio reciente de aspirados de senos frontales recogidos de 30 pacientes consecutivos observó que *H. influenzae* estaba presente sólo en el 9% de 35 cultivos.¹¹⁴⁵

BRONQUITIS Y ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La bronquitis crónica es una entidad clínica mal definida que comprende la inflamación de los bronquios sin afectación pulmonar importante y que se caracteriza por una tos por lo general no productiva y persistente, sibilancias y disnea.^{1256,1381} Este trastorno es extraordinariamente frecuente, sobre todo entre los varones de 40 años que fuman. Los factores ambientales (p. ej., contaminación del aire) y las infecciones virales concurrentes irritan e inflaman la mucosa respiratoria, la exponen más a la colonización bacteriana y conducen a la producción de esputo purulento.¹³⁸¹ En los pacientes con bronquitis crónica estable, las vías aéreas inferiores suelen estar colonizadas por numerosas cepas de *H. influenzae* no tipificable; durante las exacerbaciones agudas la cantidad de estos microorganismos aumenta.^{80,887} La persistencia de tos crónica y producción de esputo por lo menos durante 3 meses consecutivos durante más de dos años en sucesión se denomina enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC.^{1159,1256} Los pacientes con exacerbaciones graves de bronquitis crónica y EPOC tienen disnea, hipoxia y habitualmente hipertermia leve. Durante las exacerbaciones, la producción de esputo está aumentada y la consistencia cambia de mucoide a mucopurulenta o purulenta.^{1159,1381} La tinción de Gram de muestras de esputo correctamente recogidas suelen mostrar muchos polimorfonucleares asociados con un morfotipo bacteriano particular (p. ej., los cocobacilos de *H. influenzae* de tinción pálida). Los agentes más frecuentes aislados del esputo purulento son cepas no tipificables de *H. influenzae*, seguidas de *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis*.^{876,887,988} En los pacientes con enfermedad asociada con *H. influenzae*, se pueden aislar cepas no tipificables de las vías aéreas inferiores aun entre las exacerbaciones de los síntomas.^{80,767} Durante las exacerbaciones, se suele prescribir un tratamiento empírico con antibióticos orales que protegen contra *H. influenzae* y los otros microorganismos, junto con broncodilatadores y otras medidas de sostén. En los pacientes con obstrucción grave de las vías aéreas y abundante esputo purulento, el tratamiento antibiótico acorta significativamente la duración de los síntomas.³²⁶ Los fármacos cuya eficacia se ha demostrado en esta circunstancia son cefalosporinas de amplio espectro, tetraciclinas, quinolonas (p. ej., ciprofloxacina, prulifloxacina) y los macrólidos más nuevos.³²⁶ La bronquitis crónica, las exacerbaciones agudas de la bronquitis purulenta, la EPOC y la neumo-

nía pueden representar estadios en una serie continua de procesos patológicos pulmonares en los cuales las cepas de *H. influenzae* no tipificables desempeñan un papel primario. Sin duda, distintos factores del huésped (estado inmunitario, otras afecciones pulmonares, infecciones virales previas o simultáneas) también contribuyen a la patogenia de este mal definido trastorno.¹¹⁵⁹

NEUMONÍA

La neumonía por *H. influenzae* puede ser otra manifestación de la infección sistémica por *H. influenzae* o una complicación de la EPOC. En los pacientes con enfermedad sistémica (meningitis, epiglottitis, bacteriemia, otitis media) esta neumonía es lobular, segmentaria y purulenta, características similares a la neumonía neumocócica. En estos casos, los microorganismos de tipo b encapsulados constituyen los agentes etiológicos habituales. *H. influenzae* no tipificables son causas importantes de neumonía con bacteriemia o sin ella, sobre todo en pacientes ancianos con trastornos respiratorios subyacentes, como bronquitis crónica, EPOC y bronquiectasias o con enfermedades sistémicas, que incluyen inmunodeficiencia, diabetes, alcoholismo y enfermedad neoplásica.^{325,725,1134} Además, la neumonía bacteriémica debida a los tipos capsulares de *H. influenzae* distintos del tipo b también se ha comunicado en pacientes con trastornos subyacentes que deterioran los mecanismos de defensa locales o sistémicos del huésped.⁵⁹⁰ El diagnóstico definitivo de neumonía por *H. influenzae* se dificulta por la presencia del microorganismo en las vías respiratorias altas de los individuos sanos. Las muestras de esputo expectoradas y tosidas pueden proporcionar resultados insuficientes o engañosos; pueden ser necesarias muestras de lavado bronquial, broncoscopia o lavado broncoalveolar para obtener un diagnóstico definitivo del cultivo.

BACTERIEMIA Y SUS COMPLICACIONES INFECCIOSAS

La bacteriemia es una manifestación frecuente y temprana de la meningitis por *H. influenzae* tipo b, pero algunos lactantes pueden tener bacteriemia sin evidencia de meningitis. La presentación aguda se observa sobre todo en niños con enfermedad subyacente (p. ej., drepanocitosis) e incluye fiebre, somnolencia y un aumento del recuento periférico de neutrófilos. La bacteriemia puede sembrar tejidos blandos, articulaciones y hueso, y conducir a celulitis, artritis séptica y osteomielitis, respectivamente.⁹⁰¹ La celulitis a menudo aparece en los niños como tumefacciones violáceas o azul rojizas sobre las mejillas y las áreas periorbitarias del rostro. La celulitis facial y periorbitaria asociada con *H. influenzae* casi ha desaparecido desde la introducción de las vacunas conjugadas de tipo b.^{25,414} También se describió la celulitis en los adultos en asociación con bacteriemias por *H. influenzae* tipo b y no tipificables.⁷⁷² La artritis séptica se caracteriza por dolor, tumefacción y disminución de la motilidad de la articulación infectada.⁷⁷⁰ La osteomielitis hematógena se presenta con síntomas constitucionales, tumefacción y dolor óseo. Si bien *H. influenzae* tipo b aún es reivindicado como la causa principal de artritis séptica en los niños más allá del período neonatal pero de menos de 2 años de edad, un estudio retrospectivo de 38 niños con artritis séptica documentada con cultivo entre 1991 y 1997 sólo puso en evidencia un caso debido a *H. influenzae* tipo b.⁸⁰³ Esta cepa β -lactamasa-negativa fue aislada en 1992 de un niño de 14 meses que no estaba inmunizado. Howard y cols. revisaron 851 casos de artritis séptica y osteomielitis desde 1977 hasta 1997

en Notario, y observaron que la artritis séptica y la osteomielitis hematógenas por *H. influenzae* tipo b representaban el 30% y el 3% de estas infecciones respectivas antes de 1992, pero hubo sólo un caso de artritis séptica tipo b y no se observó ningún caso de osteomielitis desde 1992 hasta 1997.⁶⁰⁷ Estos resultados indican que la vacunación amplia ha conducido a la casi desaparición de los microorganismos tipo b como agentes etiológicos de estas complicaciones de la bacteriemia.

La bacteriemia por *H. influenzae* también puede ocurrir en recién nacidos y en ancianos. Se ha comunicado la sepsis neonatal aguda debida a *H. influenzae* como entidad clínica distinta.⁴⁴⁰ En estos casos, se puede presentar meningitis o no. La mayoría de los casos de infección neonatal son el resultado de la transmisión maternofetal o maternoperinatal (véase más adelante). Sólo el 20% de las cepas aisladas en las bacteriemias que ocurren durante el período neonatal son de tipo b; el resto son no tipificables.⁴⁴⁰ Aunque se ha comunicado la sepsis por *H. influenzae* tipo b en adultos ancianos, la mayoría de las cepas de estos pacientes son no tipificables y el aparato respiratorio es la fuente habitual.^{549,725,1134} La bacteriemia por *H. influenzae* no tipificable ocurre principalmente en pacientes ancianos con enfermedades subyacentes (p. ej., alcoholismo, lupus eritematoso sistémico [LES], artritis reumatoide, diabetes, procesos malignos) y se asocia con distintas complicaciones, como celulitis, artritis séptica, osteomielitis, empiema, infecciones intra-abdominales, pielonefritis y endocarditis.^{126,154,319,325,725,1134,1136}

ENDOCARDITIS

H. parainfluenzae, *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* son las especies de *Haemophilus* aisladas con mayor frecuencia de pacientes con endocarditis e infecciones intravasculares; *H. influenzae* tipificable y no tipificable son relativamente infrecuentes.^{20,130,272,301,335,459,500,532} La incidencia de endocarditis es máxima en los adultos jóvenes y de edad mediana. Aunque la mortalidad asociada con la endocarditis correctamente tratada suele ser de alrededor del 10-15%, las tasas más altas (25-50%) publicadas en la bibliografía anterior probablemente reflejaban las dificultades para aislar estos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales de los hemocultivos, lo que llevaba a un tratamiento antibiótico inapropiado o insuficiente. En general, los pacientes tienen una evolución clínica subaguda con fiebre leve, malestar general, escalofríos y síntomas respiratorios. Se observa enfermedad valvular preexistente o subyacente sólo en un 50% de los casos, y la presencia de un soplo cardíaco es el único hallazgo sugestivo en estos pacientes. Los estigmas periféricos de endocarditis, como manchas de Roth, estigmas de Janeway y hemorragias lineales subungulares suelen estar ausentes. Se ha comunicado coagulación intravascular diseminada y hemorragia pulmonar, y se puede observar hematuria y anemia con esta infección.¹¹⁷⁷ Los estudios ecocardiográficos han demostrado que la endocarditis por *H. aphrophilus* se asocia con una alta incidencia de vegetaciones valvulares y complicaciones sépticas resultantes de la embolización a grandes arterias. Los factores de riesgo para endocarditis con las especies de *Haemophilus* son la presencia de lesiones dentales o bucales (periodontitis, traumatismo, heridas bucales penetrantes), manipulaciones dentales o cirugía bucal precedente, válvulas cardíacas enfermas o dañadas (p. ej., cardiopatía reumática, defectos congénitos, cirugía cardíaca previa) y la presencia de válvulas protésicas.^{130,272} *H. parainfluenzae* también ha sido implicado en casos de endocarditis polimicrobiana en adictos a drogas intravenosas.¹⁰⁵¹ En los casos típicos, estos pacientes se presentan con endocarditis derecha, vegeta-

iones de válvula tricúspide en la ecocardiografía, y evidencia clínica y radiológica de embolización pulmonar séptica. *H. parainfluenzae* también ha sido asociado con una bacteriemia secundaria resultante de la infección de implantes vasculares, como los cables de los marcapasos.¹⁰⁹⁶

INFECCIONES UROGENITALES, MATERNAS Y PERINATALES

Las especies de *Haemophilus*, sobre todo *H. influenzae* no tipificables y *H. parainfluenzae*, han sido reconocidas como causas infrecuentes de uretritis, infecciones del aparato genital femenino, vulvovaginitis prepuberal, infecciones obstétricas y ginecológicas, bacteriemia posparto y sepsis neonatal con meningitis o no.^{287,288,726,979,1038,1234} Sturm informó que *H. influenzae* o *H. parainfluenzae* fueron los únicos microorganismos (incluidas las clamidias y los ureaplasmas) aislados del 80% de 242 episodios de uretritis no gonocócica en 234 varones; no se aislaron especies de *Haemophilus* en varones asintomáticos.¹²³⁴ En un estudio llevado a cabo en Houston entre 1976 y 1981, se aisló *H. influenzae* de hemocultivos de 16 mujeres con bacteriemia posparto y de 36 recién nacidos con bacteriemia o meningitis.¹³⁴⁶ Otros 50 aislamientos de *H. influenzae* no asociados con bacteriemia ni meningitis provinieron de los genitales (vagina, endometrio, cuello uterino, glándulas de Bartolino, trompas de Falopio, uretra masculina y líquido prostático) y de tejidos fetales (líquido amniótico, tejidos placentarios). De estos aislamientos, el 94% fueron no tipificables desde el punto de vista serológico. Quentin y cols. recuperaron especies de *Haemophilus* de cultivos genitales de 15 mujeres en un período de 90 meses.¹⁰³⁸ De ellas, 42 tuvieron infecciones bacterianas genitales importantes, como endometritis, salpingitis y abscesos de las glándulas de Bartolino. La infección del aparato genital se relacionó con la presencia de dispositivos intrauterinos en el 62% de las pacientes con endometritis y en 4 de 6 pacientes con salpingitis, lo que sugirió que los hemófilos genitales pueden comportarse como agentes oportunistas en sitios genitales. La adquisición prenatal y perinatal de especies de *Haemophilus* desde el aparato genital materno también se asoció con prematuridad, rotura prematura de membranas, amnionitis y sepsis neonatal en éste y en otros estudios.^{287,979}

La biotipificación de cepas aisladas en los genitales (véase más adelante) mostró que *H. influenzae* biotipos IV no tipificable y cepas de *H. parainfluenzae* biotipos I y II son habitantes frecuentes del aparato genital y producen infecciones genitales localizadas e infecciones sistémicas maternas y neonatales posparto.¹⁰³⁸ Otros estudios de cepas de *H. influenzae* no tipificables desde el punto de vista serológico recuperadas de estas infecciones han sugerido la existencia de una geno-especie críptica nueva de *H. influenzae*.¹⁰³⁶⁻¹⁰³⁸ Esta geno-especie se tipifica bioquímicamente como biotipo IV (indol negativa, ureasa positiva y ornitina descarboxilasa positiva) pero es característica por otros criterios fenotípicos y genéticos. Estas cepas tienen fimbrias peritricas, un perfil OMP característico en electroforesis en gel de poliacrilamida, expresan un OMP variante P6 (véase recuadro 9-3) y exhiben un patrón enzimático singular en electroforesis enzimática multilocus.^{913,1037} Los estudios de hibridación de DNA-DNA y de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del DNA ribosómico indican que estas cepas son clonales y genéticamente homogéneas, comparten menos del 70% de la similitud genómica global con *H. influenzae* estricto *sensu* y están relacionadas más estrechamente con cepas de *H. haemolyticus*.¹⁰³⁷ En la actualidad, esta

geno-especie críptica no puede ser diferenciada fenotípicamente de otras cepas de *H. influenzae* biotipo IV. Este patógeno es caracterizado además para determinar las propiedades que contribuyen a su virulencia en las infecciones del aparato genital y neonatales.¹⁰⁹⁴

INFECCIONES OCULARES

H. influenzae causa infecciones oculares que varían ampliamente en gravedad, entre ellas, conjuntivitis, escleritis y endoftalmitis. Produce una conjuntivitis aguda contagiosa denominada coloquialmente "ojo rosado". Aparecen brotes localizados de conjuntivitis aguda entre personas que comparten toallas, pañuelos u otros objetos que entran en contacto directo con la piel del rostro o los ojos. El color rosado difuso de la esclerótica y la presencia de una secreción serosa o purulenta son prácticamente diagnósticos de conjuntivitis por *Haemophilus*. La conjuntivitis hemorrágica también puede ocurrir como parte de la presentación clínica de la enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b.⁹⁹⁴ La endoftalmitis por *H. influenzae* es infrecuente pero puede ocurrir como una complicación iatrogénica de la cirugía ocular (p. ej., luego de procedimientos de fistulización para el glaucoma).^{21,1146} Sykes y cols. informaron tres casos de escleritis por *H. influenzae*.¹²⁴⁰ Estos pacientes ancianos presentaron disminución grave de la agudeza visual, dolor y abscesos esclerales nodulares de los que se recuperó *H. influenzae* en cultivo. También se lo puede aislar de las úlceras corneales herpéticas sobreinfectadas y de muestras corneales de pacientes con queratoconjuntivitis atópica.¹¹⁸¹

Desde el punto de vista histórico, las cepas aisladas en las infecciones conjuntivales fueron designadas como una especie separada denominada "*H. aegyptius*". Desde el punto de vista fenotípico, estas cepas son similares a *H. influenzae* biotipo III. La presentación clínica característica, los rasgos bioquímicos y los estudios serológicos se han utilizado para sostener la condición de "*H. aegyptius*" como una especie separada dentro del género. Sin embargo, los estudios de nucleótidos genómicos han demostrado una homología importante de secuencias entre "*H. aegyptius*" y *H. influenzae*, de modo que este microorganismo se denomina ahora *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*. Apareció un clon singular y altamente virulento de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* a comienzos de la década de 1980 como agente causal de un síndrome clínico denominado fiebre purpúrica brasileña.

FIEBRE PURPÚRICA BRASILEÑA

Durante la década de 1980, se reconoció un subgrupo de cepas que eran fenotípicamente indistinguibles de *H. influenzae* biotipo III ("*H. aegyptius*") en asociación con brotes de una enfermedad grave denominada fiebre purpúrica brasileña.^{157,158,541} Fue comunicada por primera vez en 1984 en la ciudad rural de Promissao, estado de San Pablo, Brasil, cuando 10 niños (de 3 meses a 8 años de edad) murieron por una enfermedad aguda caracterizada por fiebre alta, dolor abdominal con vómitos, erupción petequeal/purpúrica, shock hipotensivo y colapso vascular. Un brote posterior entre 10 niños en la ciudad cercana de Serrana condujo a otras cuatro muertes.¹⁵⁹ Los hemocultivos de estos niños dieron *H. aegyptius*. Si bien la fiebre purpúrica brasileña se asemejaba a la enfermedad meningocócica, la meningitis no formaba parte de la presentación clínica. Durante las investigaciones epidemiológicas, se observaron casos que tuvieron una conjuntivitis purulenta reciente o simultánea.¹⁵⁷ Desde los brotes iniciales, se han comunicado

casos esporádicos en otras áreas de Brasil, y en el centro y oeste de Australia.^{159,847,1375}

Las cepas de *H. aegyptius* asociadas con brotes recuperados de hemocultivos, cultivos conjuntivales o ambos han sido estudiadas extensamente y tienen varias características no halladas en *H. aegyptius* aislado de casos de conjuntivitis purulenta sin fiebre purpúrica brasileña.^{167,201,384,1022,1367} Estas características son la falta de tipificación serológica, la presencia de un plásmido singular de 24 kDa, un OMP de 25 kDa característico, una proteasa A1 de inmunoglobulina singular y resistencia a los efectos bactericidas del suero humano normal. El OMP de 25 kDa es una proteína de las fimbrias con homología de secuencia del 71% con la principal proteína de las fimbrias de *H. influenzae* tipo b; la clonación y la secuenciación de los genes de las fimbrias de estas cepas han demostrado un 82% de homología de secuencia con genes de las fimbrias de las cepas de *H. influenzae* tipo b de referencia.^{1229,1367,1374} Los estudios de aglutinación e inhibición de la aglutinación de eritrocitos también han mostrado que esta proteína de las fimbrias se une al mismo receptor de la superficie de los eritrocitos que la proteína de las fimbrias de *H. influenzae* tipo b.¹²³¹ Las cepas de la fiebre purpúrica brasileña tienen un epítipo de la superficie celular altamente conservado y estable del OMP P1 de 48 kDa que no está presente en cepas no asociadas con esa enfermedad.⁷⁷¹ Estos estudios arribaron a la conclusión de que los brotes de fiebre purpúrica brasileña eran causados por un clon singular de *H. aegyptius* designado "*H. influenzae* biogrupo *aegyptius*". Las cepas aisladas en brotes o casos esporádicos de fiebre purpúrica en Brasil aparentemente carecen del plásmido de 24 kDa y las cepas de la fiebre purpúrica brasileña australiana tampoco tienen algunos de los marcadores inusuales.⁷³³ Al parecer, las cepas australianas representan un segundo clon de fiebre purpúrica brasileña.⁸³⁹ No se han comunicado casos ni brotes en otros sitios, aunque este diagnóstico se sospechó en un varón de 17 meses de Connecticut que presentó conjuntivitis purulenta, fiebre, somnolencia y un hemocultivo positivo con *H. influenzae* no tipificable biotipo III.¹³³¹ Los exámenes post mortem de hígado, bazo y ganglios linfáticos establecieron que la infección aplastante por virus de Epstein-Barr fue la causa de la enfermedad en ese niño.

Algunos estudios con las bacterias que producen fiebre purpúrica brasileña también han sugerido que los microorganismos tienen cápsula, aun cuando son no tipificables. Carlone y cols. comunicaron que el DNA de las cepas aisladas en pacientes con fiebre purpúrica brasileña hibridizaba con una sonda que contenía secuencias de DNA relacionadas con la síntesis del polisacárido capsular de *H. influenzae* (secuencias del gen *cap*).²⁰¹ Sin embargo, Dobson y cols. observaron que la sonda utilizada en los primeros estudios contenía secuencias que eran homólogas no sólo de los genes *cap* de las cepas de *H. influenzae* tipificables, sino que también contenía secuencias de un elemento de inserción (IS1016) presente en las cepas de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* relacionadas con la fiebre purpúrica brasileña pero no en las cepas de *H. influenzae* que no producen fiebre purpúrica brasileña.³³⁷ La transposición de las secuencias IS1016 de un plásmido en el genoma del clon vinculado con la fiebre purpúrica brasileña puede haber contribuido a la virulencia al alterar la transcripción y la expresión de los genes adyacentes al sitio de inserción.³³⁷ Algunos estudios in vivo que utilizaron un modelo de rata lactante y estudios in vitro con una línea de células endoteliales microvasculares humanas también han mostrado que las cepas de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* asociadas con fiebre purpúrica brasileña son más virulentas que las cepas no asociadas.^{1105,1370} Sobre la

base de los métodos de electroforesis enzimática multilocus, las cepas del biogrupo *aegyptius* forman tres linajes distintos dentro de la especie *H. influenzae*. Las cepas asociadas con la fiebre purpúrica brasileña no están estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético con la cepa del biogrupo *aegyptius* que no produce fiebre purpúrica brasileña pero muestran una relación genética estrecha con *H. influenzae* encapsulado de serotipo capsular c.^{620,916}

OTRAS INFECCIONES POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

H. influenzae tipo b puede causar otras infecciones infrecuentes; en algunos casos, el aislamiento de especies de *Haemophilus* fue inesperado. Se ha comunicado celulitis periorbitaria y facial, hallazgo frecuente en niños con bacteriemia tipo b y en adultos con bacteriemia e infecciones respiratorias.³⁵⁶ Se ha aislado *H. influenzae* de infecciones abdominales (p. ej., peritonitis, abscesos pancreáticos, apendicitis) y de infecciones del tracto hepatobiliar (colecistitis, absceso hepático piógeno).^{67,953,1034} En un paciente con enfermedad por HIV-1 también se diagnosticó epididimitis y orquitis debidas a *H. influenzae*.²⁹⁰

Aunque ocurrían infecciones esporádicas debidas a *H. influenzae* tipo no b encapsulado antes de la disponibilidad de la vacuna, en la era de la vacunación se están reconociendo cada vez más infecciones graves causadas tanto por los serotipos capsulares tipo no b como por cepas no tipificables de *H. influenzae*.^{2,548} En 2001, se observaron cinco casos de enfermedad invasora causada por *H. influenzae* serotipo a en un período de 10 meses en Utah.² Estos niños (edad mediana, 12 años) presentaron meningitis, bacteriemia y, en un caso, púrpura fulminante. El examen mediante técnicas moleculares mostró que tres de las cuatro cepas aisladas disponibles contenían una delección en el gen IS1016-*bex* A, característica también hallada en las cepas virulentas de serotipo b. El examen de 48 *H. influenzae* tipo no b invasores mediante tipificación con endonucleasas de restricción mostró que las cepas tipo a se dividían en dos grupos clonales mayores, mientras que las cepas tipo e y tipo f, respectivamente, representaban clones únicos. Los investigadores propusieron que la mayor incidencia de *H. influenzae* encapsulado tipo no b reflejaba la aparición de clones hipervirulentos o la diversidad genética limitada entre las cepas tipo no b.⁹⁷⁰ En un estudio llevado a cabo en Brasil antes de la introducción de la inmunización activa y durante su transcurso, la incidencia de meningitis por *H. influenzae* tipo a aumentó ocho veces durante la época en la cual la incidencia de meningitis tipo b había disminuido un 69%.¹⁰⁷⁰ Como ya se mencionó, las infecciones bacteriémicas por *H. influenzae* que ocurren en la era de la vacuna se deben en gran parte a cepas no tipificables.^{325,395,910} En general, estas infecciones ocurren en individuos con una enfermedad subyacente importante (p. ej., enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda) y en aquellos con defectos subyacentes en la producción de inmunoglobulinas.

Haemophilus parainfluenzae

H. parainfluenzae es un agente infrecuente de infecciones humanas. Además de endocarditis (véase sección sobre "Endocarditis", antes), *H. parainfluenzae* ha sido aislado de casos de epiglottitis bacteriémica, bronquitis, sinusitis, otitis media, EPOC, neumonía, empiema, peritonitis, celulitis, abscesos, sepsis neonatal; infecciones de articulaciones naturales y protésicas, infecciones genitales y de las vías biliares, y abscesos ence-

24.68,123,232,435,573,633,962,987,1013,1031,1349 Olk y cols. comunicaron un caso de osteomielitis vertebral por *H. parainfluenzae* que se evidenció clínicamente 3 meses después de que el paciente se sometió a una septoplastia nasal; se presume que el procedimiento quirúrgico produjo una bacteriemia que sembró las vértebras lumbosacras.⁹⁶⁷ Este microorganismo también ha sido aislado en raras ocasiones como causa de infección urinaria en adultos.⁸⁹⁵ McClain y cols. informaron un caso de uretritis purulenta por *H. parainfluenzae* en un varón de 24 años que se acompañó por bacteriemia con el mismo microorganismo y también se ha comunicado prostatitis por *H. parainfluenzae* en un hombre de 29 años con infección por HIV-1.^{258,843} Se han comunicado raras infecciones hepatobiliares por *H. parainfluenzae*, que incluyen abscesos hepáticos, tanto en niños como en adultos.^{24,438,616} En estas últimas infecciones se propuso que *H. parainfluenzae* ganaba acceso al árbol hepatobiliar desde el aparato digestivo más que a través de una vía hematógena. Esto se apoyó por la falta de una bacteriemia documentada por *H. parainfluenzae* en los pacientes, y por el hecho de que se lo ha aislado del tubo digestivo con mucha mayor frecuencia que otros hemófilos.⁸⁵⁰

Haemophilus aphrophilus y *Haemophilus paraphrophilus*

H. aphrophilus y *H. paraphrophilus* son parte de la microflora endógena de la cavidad bucal, donde son componentes menores de la flora periodontal sana.¹²⁶⁸ Entre los hemófilos, *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*, junto con *H. parainfluenzae*, son las especies asociadas con mayor frecuencia con endocarditis (véase sección sobre "Endocarditis", antes). Además, estas bacterias también producen infecciones de cabeza y cuello (sinusitis, otitis media, epiglotitis, absceso encefálico), infecciones resultantes de la diseminación hematógena (neumonía, empíema, artritis séptica, osteomielitis vertebral, celulitis, endoftalmiitis, meningitis, fascitis necrosante), infecciones abdominales (infecciones del tracto hepatobiliar, colecistitis, abscesos abdominales) e infecciones de heridas.^{275,332,377,650,663,880,1371} Neutropenia, procesos malignos y quimioterapia oncológica son factores preexistentes para las infecciones por estos microorganismos.³⁷⁷ *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* se asemejan a otras bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales desde el punto de vista del cultivo y forman parte del grupo "HACEK", que incluye *Haemophilus* (H), especies de *Actinobacillus* (A), *Cardiobacterium* (C), *Eikenella* (E) y *Kingella* (K). Estos microorganismos se describirán más adelante.

Otras especies de *Haemophilus*

H. haemolyticus, *H. paraahaemolyticus* y *H. paraphrophaeolyticus* forman parte de la flora normal del aparato respiratorio y pocas veces se asocian con infecciones. *H. segnis* ha sido aislado de la placa dental y las vías respiratorias altas. En 1981, Bullock y Devitt informaron sobre el aislamiento de *H. segnis* de sangre y pus de un absceso pancreático en un hombre alcohólico de 29 años.¹⁸⁸ Con posterioridad, Welch y cols. describieron el aislamiento de *H. segnis*, tanto en cultivos puros como mixtos, de cinco pacientes con apendicitis aguda.¹³⁶² Este microorganismo también fue recuperado, junto con microorganismos anaerobios, de un absceso umbilical cutáneo de una mujer de 70 años.²⁵² Se necesita otra investigación de estos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales para una apreciación más completa de su potencial patógeno.

Haemophilus ducreyi

H. ducreyi es el agente causal del chancroide, una infección de transmisión sexual altamente contagiosa caracterizada por úlceras genitales y perianales dolorosas y linfadenopatía inguinal sensible a la palpación.¹⁰⁸⁸ El chancroide es la causa principal de enfermedad ulcerosa genital en América Latina, África, este y sudeste asiático e India. Se han comunicado brotes de chancroide en algunas ciudades costeras en los Estados Unidos y Canadá. En estos brotes, las prostitutas han sido el reservorio habitual, y un factor de riesgo conductual importante es el intercambio de sexo por dinero o drogas (p. ej., cocaína en crack). En estos brotes, se han observado relaciones de casos hombre:mujer de 3:1 a 25:1.

Aunque se han identificado varios posibles factores de virulencia en *H. ducreyi*, su función en la patogenia se conoce poco. Todas las cepas parecen tener fimbrias superficiales finas y enmarañadas, OMP de 40 kDa y 18 kDa, lipooligosacáridos y una citotoxina/hemolisina.^{12,13,169,1211,1284,1394} En la actualidad, no está claro el papel de estas moléculas en la patogenia de la enfermedad. *H. ducreyi* también tiene un requerimiento de crecimiento específico para hierro, y aunque carece de sideróforos, el microorganismo tiene un receptor sobre su superficie que se une a la hemoglobina y es esencial para la captación de hierro.³⁷⁰ In vitro, es capaz de fijarse, invadir y producir efectos citopáticos en células de prepucio humano cultivadas, y se han desarrollado varios modelos animales para el chancroide con el fin de estudiar la virulencia y la patogenicidad, incluidos modelos de conejo, cerditos, primates y voluntarios humanos.^{14,23,1235}

Las lesiones genitales causadas por este microorganismo también se denominan "chancros blandos" porque, al contrario de la lesión primaria (chancro) de la sífilis, los bordes de la lesión son irregulares y plegados y no están bien demarcados e indurados (véase lámina en color 9-2B).¹⁰⁸⁸ Después de un período de incubación de 4 a 7 días, las lesiones comienzan como pápulas eritematosas sensibles a la palpación que se vuelven pustulosas, erosionadas y ulceradas en las siguientes 48 a 72 horas. En los varones, las lesiones del chancroide suelen ser sensibles a la palpación, dolorosas y están cubiertas por un exudado gris amarillento que cubre una base sangrante y dura. Suelen aparecer una a tres lesiones sobre los genitales externos; en los no circuncisos, estas lesiones a menudo se encuentran por debajo del prepucio. En las mujeres, se pueden presentar múltiples lesiones sobre los labios genitales, dentro de la vagina y en la región perianal. Las lesiones pueden coalescer para formar grandes áreas ulcerativas que pueden sobreinfectarse. El chancroide extragenital es infrecuente, pero se describieron lesiones sobre la piel sin pelo, en la boca y sobre las conjuntivas. En alrededor del 50% de los pacientes infectados, se desarrolla una linfadenopatía inguinal unilateral. Estas adenomegalias en realidad pueden supurar a través de la piel suprayacente para formar grandes abscesos inguinales y fístulas.

En los países subdesarrollados, la infección por *H. ducreyi* se asocia con la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y tipo 2 (HIV-2). Algunos estudios en África han proporcionado evidencia de que el chancroide es un factor de riesgo para la transmisión heterosexual del HIV-1, el agente etiológico del SIDA.^{729,1178} Al parecer, las úlceras genitales debidas a chancroide y otros agentes (p. ej., sífilis) vuelven a las mujeres más sensibles a la infección por HIV-1 luego del contacto heterosexual con hombres infectados y la presencia de úlceras genitales en mujeres infectadas por HIV-1 también aumenta la probabilidad de que sus parejas de sexo masculino se infecten. Las úlceras genitales debidas a chancroide y

otras enfermedades, como linfogranuloma venéreo, al parecer facilitan la evacuación del virus en las secreciones vaginales. En Kenya, por ejemplo, un tercio de las infecciones por HIV en las prostitutas y al menos el 50% de las infecciones por HIV-1 en sus clientes varones parecen relacionarse significativamente con la infección simultánea por *H. ducreyi*.⁷²⁹

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *Haemophilus* EXAMEN DIRECTO DE MUESTRAS CLÍNICAS

Tinción de Gram. Se puede hacer un diagnóstico presuntivo rápido de meningitis por *H. influenzae* mediante el examen directo de LCR utilizando la tinción de Gram. Si se recibe LCR suficiente (más de 1-2 mL), se centrifuga la muestra para obtener un gránulo de material para examen y cultivo. La citocentrifugación de muestras de LCR aumenta la detección de pequeñas cantidades de microorganismos e incrementa considerablemente la sensibilidad de la tinción de Gram en comparación con las muestras centrifugadas de forma convencional o no centrifugadas.²²⁷ En los frotis con tinción de Gram, los microorganismos *Haemophilus* aparecen como pequeños cocobacilos gramnegativos de tinción pálida (véase lámina en color 9-1A). En ocasiones, se observan células filamentosas delgadas. Aunque *H. influenzae* puede ser el patógeno probable sobre la base del aspecto en la tinción de Gram y la presentación clínica del paciente, los microorganismos no pueden ser identificados sólo a partir del frotis teñido con Gram. Más aún, una tinción de Gram negativa no descarta la posibilidad de infección por *Haemophilus* porque se pueden presentar muy pocos microorganismos en la muestra. Los frotis teñidos con Gram de otros tipos de muestras también pueden ser útiles para el diagnóstico presuntivo. En un estudio del año 2000, la sensibilidad y la especificidad de la tinción de Gram del esputo para el diagnóstico de la neumonía por *H. influenzae* adquirida en la comunidad fueron del 82% y del 99%, respectivamente, si se juzgaba que la muestra era suficiente según los criterios para el cribado del esputo.¹⁰⁹⁸

Detección de antígeno capsular tipo b. Para el diagnóstico rápido de las infecciones por *H. influenzae* tipo b, existen técnicas inmunológicas para la detección del antígeno capsular PRP tipo b en LCR, suero y orina (cap. 3). Los métodos comerciales incluyen las técnicas de aglutinación de partículas de látex y coagulación de proteína A del estafilococo. Los equipos comerciales de aglutinación de partículas de látex son el Directigen Meningitis Combo Test Kit (BD Biosciences, Sparks, MD) y el Wellcogen Bacterial Antigen Kit (Murex Diagnostics, Dartford, Inglaterra). La prueba de coagulación de proteína A comercial es la prueba Phadebact para LCR (Boule Diagnostics, Huddinge, Suecia). Todos estos equipos contienen reactivos para detectar antígeno PRP de *H. influenzae* grupo b junto con reactivos para *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y detección de antígeno de estreptococos del grupo B en líquidos corporales. Varios estudios han comparado las sensibilidades y especificidades relativas de aglutinación de partículas de látex y coagulación de proteína A para detectar antígeno PRP de *H. influenzae* tipo b en distintos líquidos corporales de pacientes con infecciones meningéas y no meningéas.^{271,820,1359} La mayoría de los estudios indican que la aglutinación de partículas de látex y la coagulación de proteína A suelen ser más sensibles y detectan cantidades menores de antígeno que contra la inmunoelectroforesis (CIE), el método más antiguo para detectar antígenos bacterianos en los líquidos corporales.

A pesar de la realización de estas pruebas en ensayos clínicos que condujeron a la aprobación para su uso, muchos laboratorios han dejado de ofrecer estas pruebas de rutina. Además

del alto costo de los reactivos de látex/coagulación de proteína A propiamente dichos, su utilidad diagnóstica y pronóstica no ha sido confirmada después de años de experiencia. Perkins y cols. revisaron todas las pruebas del látex realizadas en un período de 10 meses en dos hospitales y observaron 57 resultados positivos.¹⁰⁰¹ La revisión de estos casos puso en evidencia que 31 resultados eran falsos positivos, 22 eran verdaderos positivos y 4 eran indeterminados. Las pruebas falsas positivas se observaron principalmente con las muestras de orina. Los pacientes que tuvieron resultados falsos positivos en las pruebas recibieron un tratamiento innecesario que condujo a una hospitalización prolongada y otras complicaciones. Además, entre los 22 casos con resultados verdaderos positivos en la aglutinación de partículas de látex, no hubo ninguno en el cual el tratamiento antibiótico o clínico del paciente se alterara sobre la base del resultado de la prueba. Estas pruebas pueden ser muy útiles en casos de sospecha de meningitis para la cual la tinción de Gram inicial es negativa, los cultivos de LCR o ambos son negativos después de 48 horas.⁴¹⁰ El método recomendado para la detección directa óptima de *H. influenzae* en LCR depende de la inspección cuidadosa de un frotis teñido con Gram preparado a partir de una muestra citocentrifugada. Los métodos del látex también son mucho menos sensibles para la detección directa que los enfoques moleculares. Singhi y cols. examinaron el LCR de 107 niños con sospecha de meningitis; el 79% de ellos habían recibido también antibióticos.¹¹⁷⁹ Se aisló *H. influenzae* tipo b en 14 casos, la prueba de aglutinación del látex fue positiva en 23 casos y la PCR para *H. influenzae* tipo b fue positiva en 37 casos, incluidos todos aquellos que fueron positivos en el cultivo o en la aglutinación del látex.

CULTIVO DE ESPECIES DE *HAEMOPHILUS*

La recuperación óptima de especies de *Haemophilus* de las muestras clínicas depende de la recolección y el transporte correctos de las muestras, y del uso de medios de cultivo y ambientes de incubación apropiados. Como estos microorganismos tienen requerimientos nutricionales especiales, las muestras que los contienen no deben ser expuestas a la desecación ni a temperaturas extremas. Las muestras fundamentales, como el LCR, deben ser transportadas a mano hasta el laboratorio clínico lo antes posible después de la recolección. El agar sangre de carnero convencional no es apropiado para el cultivo de especies de *Haemophilus* que requieren factor V para el crecimiento debido a que la sangre ovina contiene naturalmente enzimas que inactivan el factor V.⁵⁹ La sangre de conejo o de caballo no contiene estas enzimas y los medios de agar que contienen algunos de estos productos hemáticos apoya el crecimiento de la mayoría de las especies de *Haemophilus*. Cualquiera que sea el medio utilizado, el aislamiento de *Haemophilus* requiere la incubación a 35 a 37 °C en un medio ambiente húmedo con mayor CO₂ (3-5%). Esta atmósfera es provista por las incubadoras modernas de CO₂ o por jarras de anaerobiosis por extinción con vela. El aislamiento primario de especies de *Haemophilus* de muestras clínicas se logra utilizando agar chocolate, agar para aislamiento de *Haemophilus* o la técnica de siembra en estría para estafilococos.

Agar chocolate. El agar chocolate se prepara agregando sangre de carnero a una base de agar enriquecido cuando la temperatura del medio es lo suficientemente alta como para lisar los eritrocitos sin inactivar el NAD en el lisado de sangre (alrededor de 80 °C). La mayoría de los laboratorios clínicos compran agar chocolate y otros medios bacteriológicos a vendedores comer-

ciales. En general, el "agar chocolate" preparado en el comercio contiene una mezcla sintética de hemina y un "cóctel" de factores de crecimiento definidos químicamente que se agregan al medio de base de agar para gonococos. La base de agar para gonococos contiene proteosa peptona, almidón de maíz, buffers de fosfato monobásico y dibásico, cloruro de sodio y agar. El suplemento definido químicamente contiene NAD, vitaminas (B₆, clorhidrato de tiamina), minerales (hierro, magnesio), aminoácidos que se necesitan para el tratamiento de las bacterias con requerimientos nutricionales especiales (cistina, glutamina) y glucosa. Estos suplementos se comercializan con los nombres IsoVitalex® (BD Biosciences) y GCHI Enrichment® (Remel Laboratories, Lenexa, KS).

La desventaja de utilizar agar chocolate para el aislamiento primario de especies de *Haemophilus* es que el medio no permite la determinación de las propiedades hemolíticas, lo que ayuda a diferenciar *H. haemolyticus* y *H. parahaemolyticus* de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*, respectivamente. Sin embargo, es un medio excelente para la recuperación de otros microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, como *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, de muestras que no suelen estar contaminadas con otros microorganismos, como LCR o líquido articular. Como las especies de *Haemophilus* son habitantes frecuentes de las vías respiratorias altas (que incluyen especies tanto hemolíticas como no hemolíticas), muchos laboratorios han adoptado el agar para aislamiento de *Haemophilus* para la recuperación de estos microorganismos de muestras respiratorias. Se describieron medios selectivos con base de agar chocolate que contienen distintos antibióticos (p. ej., vancomicina, bacitracina y clindamicina), pero no se les utiliza ampliamente.⁹⁵⁰

Agar para aislamiento de *Haemophilus*. Se comercializan medios que contienen antibióticos para el aislamiento selectivo de especies de *Haemophilus* de las muestras del aparato respiratorio. Estos medios contienen infusión de corazón de vaca, peptonas, extracto de levadura y sangre de caballo desfibrinada (5%) que contiene tanto el factor X como el V. Se agrega bacitracina (300 µg/mL) para inhibir la otra flora normal del aparato respiratorio, que incluye estafilococos, micrococos, neisserias y estreptococos. Además de la recuperación selectiva de especies de *Haemophilus* a partir de cultivos mixtos, se pueden determinar las propiedades hemolíticas de los hemófilos directamente en el aislamiento primario.

Técnica de siembra en estría para estafilococos. Muchas bacterias y levaduras sintetizan y secretan NAD durante el crecimiento en medios bacteriológicos. En cultivos mixtos, las especies de *Haemophilus* que requieren factor V pueden crecer como colonias puntiformes alrededor de las colonias de otros microorganismos. Este fenómeno se denomina satelitismo. El satelitismo proporciona una técnica para detectar estos microorganismos en cultivos mixtos y una prueba presuntiva para la identificación del género. Una colonia de una especie de *Haemophilus* posible es subcultivada en una placa de agar sangre de carnero y se siembra en estría como un césped. Utilizando un alambre inoculador, se hace una única siembra en estría de un microorganismo productor de NAD, como *S. aureus*, a través del inóculo del posible *Haemophilus*. Después del crecimiento durante toda la noche en un medioambiente enriquecido con CO₂ a 35 °C a 37 °C, pueden observarse colonias grises húmedas pequeñas de los hemófilos dentro del área hemolítica adyacente al crecimiento de los estafilococos. Los hemófilos dependientes del factor X también crecen como colonias satélites porque se liberan hemina y hematina de los eritrocitos lisados por la acción de las hemolisinas estafilocóci-

cas (véase lámina en color 9-1C). Este método se puede utilizar para la identificación presuntiva de especies de *Haemophilus* cuando no se requiere ni es esencial la identificación de especie (p. ej., muestras del aparato respiratorio).

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *HAEMOPHILUS*

Morfología de las colonias y características del cultivo. En agar chocolate, las colonias de *H. influenzae* son lisas y de color gris azulado; las cepas muy encapsuladas pueden parecer mucoides (véase lámina en color 9-1B). La mayoría de las cepas producen colonias enteras, lisas y convexas de 1-2 mm después de un crecimiento de toda la noche. Algunas tienen olor a "E. coli" debido a la producción de indol. En general, las colonias de *H. parainfluenzae* son más pequeñas, de color gris claro y presentan un aspecto enmarañado en los medios de crecimiento. Las reacciones de oxidasa y de catalasa para estos microorganismos suelen ser positivas, aunque la reacción de oxidasa puede ser tardía. Las colonias de *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* son pequeñas después de 24 horas de incubación; se necesitan a menudo 48 a 72 horas antes de poder determinar la morfología de las colonias y para que exista el crecimiento suficiente para las pruebas de identificación preliminares. En agar chocolate, las colonias miden 0,5 a 1 mm de diámetro, son convexas, granulares y tienen un pigmento amarillento (véase lámina en color 9-1D, E y F). Se puede detectar un olor característico a "pasta de escuela primaria". *H. aphrophilus* no necesita factor V y crece en agar sangre de carnero y en BHI o agar tripticasa de soja sin suplementos. *H. paraphrophilus* es bioquímicamente similar a *H. aphrophilus*, salvo en que se necesita factor V para el crecimiento. Estos microorganismos son oxidasa negativos, aunque pueden observarse reacciones positivas débiles o tardías con algunas cepas. Tanto *H. aphrophilus* como *H. paraphrophilus* también son catalasa negativos, una característica que ayuda a diferenciarlos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que se asemeja a estos otros microorganismos con requerimientos nutricionales especiales (véase lámina en color 9-1C y D).

Procedimientos de identificación. Las especies de *Haemophilus* comúnmente halladas son identificadas por sus reacciones hemolíticas en agar sangre de caballo y sus requerimientos de crecimiento para los factores X y V (cuadro 9-2). Se utilizan de rutina discos de papel de filtro o tiras impregnadas con factor X, factor V o ambos, para determinar estos requerimientos de factores. El microorganismo por identificar se siembra en estría en un medio deficiente en factores de crecimiento, como agar tripticasa de soja. Cuando se seleccionan colonias para las placas de cultivo primario para esta prueba es importante no transferir ninguno de los medios de agar chocolate u otros medios que contienen sangre a la placa para la determinación de los factores. La suspensión del microorganismo en un caldo deficiente en factores antes de la inoculación en la placa es una forma de reducir la transferencia de factores de crecimiento y los consiguientes resultados positivos falsos. Se colocan los discos o las tiras de factor X y de factor V sobre la superficie del agar separados por 1 o 2 cm. Si se utiliza también un disco/tirita que contiene ambos factores, los discos pueden estar más separados sobre la superficie del agar. Se incuban las placas en CO₂ al 5-7% a 35 °C durante 18 a 24 horas y se observan los patrones de crecimiento alrededor de los discos/tiritas. Luego se hace la diferenciación de las especies de *Haemophilus* sobre la base de los factores de crecimiento que se muestran en el protocolo 8-1 y en la lámina en color 9-1D y E.

Cuadro 9-2 Características para la identificación de especies de *Haemophilus humanus*

ESPECIE BIOTIPO	HEMÓLISIS	REQUERIMIENTO DE:		PRUEBA DE ALA	PRUEBA DE INDOL	PRUEBA DE UREASA	ORNITINA DESCAR- BOXILASA	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE:						
		X	V					Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Fructosa	Ribosa	Xilosa	Manosa
<i>H. influenzae</i>														
Biotipo I	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo II	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo III*	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo IV	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo V	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo VI	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo VII	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Biotipo VIII	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Biogrupo <i>aegyptius</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i> [†]														
Biotipo I	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Biotipo II	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Biotipo III	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Biotipo IV	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	ND	-	+
Biotipo VI	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	ND	ND	V
Biotipo VII	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	ND	-	-	ND
Biotipo VIII	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	ND	-	-	ND
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	V	+	-	+	-	-	+	+	V	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	-	+	+	-	+	V	+	+	-	+	-	-	-
<i>H. segnis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>H. paraphrophilus</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>H. paraphrophaemolyticus</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; +^d: positivo débil; ND: no disponible.
^{*}Las reacciones de biotipo son idénticas a las de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*, pero las cepas del biogrupo *aegyptius* son xilosa negativas.
[†]Las cepas de *H. parainfluenzae* biotipo V son idénticas a *H. segnis*.

Doren y Chapin evaluaron el rendimiento del agar tripticasa de soja, agar con infusión de encéfalo y corazón, agar con nutrientes y agar de Mueller-Hinton en la identificación de discos de factores de 187 aislamientos de *H. influenzae*.³⁴¹ Observaron que 95,7%, 92,5%, 56,1% y 71,1% de los aislamientos eran identificados correctamente en los cuatro medios, respectivamente. Las lecturas falsas positivas de crecimiento alrededor de los discos de factor V (que conducen a una identificación errónea de *H. influenzae* como *H. parainfluenzae*) en agar infusión de cerebro y corazón y la falta de crecimiento de las cepas en los agares de Mueller-Hinton y con nutrientes fueron los principales hallazgos del estudio. Se recomendó el agar tripticasa soja como medio de elección para realizar el procedimiento de determinación de factores de crecimiento.

Si bien la interpretación de las pruebas de requerimiento de factores suele estar clara, se han comunicado identificaciones erróneas causadas por confundir *H. influenzae* con *H. parainfluenzae* y viceversa debido a resultados discordantes en las determinaciones del factor X. Se citaron las siguientes razones para estas imprecisiones: 1) la presencia de cantidades mínimas variables de hemina en el medio basal utilizado para la prueba de determinación de factores; 2) la transferencia de factor X en los inóculos tomados de las colonias que crecen en el medio que contiene sangre y 3) la naturaleza de requerimientos nutricionales especiales de algunas cepas de *H. parainfluenzae* y la consiguiente dificultad para leer las pruebas de factores para estas cepas. La prueba de ácido δ -aminolevulínico (ALA)-porfirina evita muchos de los problemas descritos antes para la determinación de requerimientos de factor X.^{684,909} Esta prueba es una evaluación directa de la capacidad de las cepas de *Haemophilus* para sintetizar intermediarios protoporfirínicos en la vía biosintética hasta hemina a partir del compuesto precursor ácido δ -aminolevulínico. Las cepas que necesitan factor X exógeno para su crecimiento (*H. influenzae* y *H. haemolyticus*) son incapaces de sintetizar protoporfirinas a partir de ALA y, en consecuencia, son negativas con esta prueba. Las cepas que no necesitan factor X exógeno para el crecimiento (*H. parainfluenzae* y *H. parahaemolyticus*) tienen las enzimas que sintetizan compuestos protoporfirínicos a partir del sustrato ALA y, por lo tanto, son positivas en la prueba de ALA-porfirina. Además, tanto *H. aphrophilus* como *H. paraphrophilus* son positivos en la prueba de ALA-porfirina. Los discos de papel de filtro impregnados con ALA (BD Biosciences; Remel Laboratories) o los medios de crecimiento que contienen el reactivo ALA (Remel Laboratories) también se pueden utilizar para la prueba de ALA-porfirina (véase lámina en color 9-1F y G). Con el método del disco, se humedece el disco con agua y se inocula con microorganismos desde los medios de crecimiento. Después de 4 horas de incubación, se observa el disco con luz ultravioleta (luz de Wood). La fluorescencia rojo ladrillo en el área de depósito del microorganismo indica un resultado positivo de la prueba: la fluorescencia morada, un resultado negativo. Con el medio de agar ALA, se inocula el microorganismo en el medio y se lo incuba durante toda la noche. Al día siguiente se examina el crecimiento bajo una luz de Wood para detectar fluorescencia rojo ladrillo.

Las pruebas para hemólisis en agar sangre de caballo, los requerimientos de factores y la prueba de ALA porfirina han sido incorporados en sistemas de placas sectorizadas comerciales para la identificación de especies de *Haemophilus*. Estos incluyen el *Haemophilus* ID II Triplate y la placa *Haemophilus* ID Quad (Remel). La triplaca es una placa dividida en tres que contiene agar sangre de caballo, agar con contenido de factor V y agar con contenido de ALA. Luego de la inoculación y la

incubación durante toda la noche, se lee la placa inspeccionando el sector de agar sangre para detectar hemólisis, buscando crecimiento en el sector del factor V y crecimiento fluorescente rojo ladrillo en el sector de ALA bajo iluminación con luz de Wood. La placa en cuadrantes contiene cuatro sectores que contienen medio de Mueller-Hinton con suplemento de factores con sangre de caballo, medio enriquecido en factor X, medio enriquecido en factor V y medio que contiene tanto factor X como V, respectivamente. Sobre la base de la reacción hemolítica y del patrón de crecimiento en los cuadrantes restantes, se puede identificar la cepa aislada.

Serotipificación de *Haemophilus influenzae*. La técnica más simple para la serotipificación es la aglutinación en portaobjetos. Se prepara una suspensión densa del microorganismo en solución salina. Se colocan gotas únicas de la suspensión en cada una de una serie de círculos sobre un portaobjetos de vidrio que corresponde a la cantidad de sueros por evaluar, más un control de solución salina. Se agregan antisueros específicos de tipo a cada uno de los círculos de prueba y se rota el portaobjetos. La aglutinación rápida (menos de 1 minuto) de los microorganismos mediante un antisero específico y la ausencia de aglutinación en el control salino identifican la cepa aislada como un serotipo específico. Existen antisueros comerciales polivalentes y específicos de tipo para los seis serotipos de *H. influenzae* en BD Biosciences. La serotipificación de las cepas clínicas mediante aglutinación en portaobjetos debe realizarse en forma cuidadosa con agentes confiables cuya calidad esté controlada con microorganismos de serotipo conocido. En un estudio reciente, los CDC observaron discrepancias importantes entre los resultados de la tipificación serológica realizada en los departamentos de salud estatales y la detección de genes capsulares mediante PCR (véase más adelante). En un examen de 141 aislamientos de *H. influenzae* de los departamentos de salud estatales, 56 (40%) de los identificados como un serotipo particular fueron no tipificables por PCR y se observó que dos, comunicados como tipos b y f eran tipos f y e, respectivamente, por PCR.⁷⁴³ Más aun, de 40 cepas identificadas como *H. influenzae* tipo b mediante aglutinación en portaobjetos, 27 (68%) no contenían genes tipo b capsulares. La institución de pautas estrictas de control de calidad en tres laboratorios de "prueba" del departamento de salud condujo a una mejoría importante, con una concordancia global del 94% entre los resultados de la aglutinación en portaobjetos y PCR para gen capsular.

Existe una prueba de confirmación por cultivo de coagulación (Phadebact *Haemophilus*, Boule Diagnostics) para la identificación y la serotipificación simultáneas de *H. influenzae* tipo b a partir de los medios de cultivo primarios. Este equipo contiene un frasco ampolla de células estafilocócicas sensibilizadas con anticuerpos tipo b (reactivo de prueba) y un segundo frasco ampolla de estafilococos sensibilizados con antisueros contra tipos a, c, d, e y f (reactivo control). Se mezclan colonias de medios de crecimiento con cada uno de los dos reactivos en un portaobjetos de cartón. Después de la mezcla, se hace oscilar el portaobjetos durante 30 a 60 segundos. La aglutinación visible de la mezcla con reactivo de prueba tipo b, pero no el reactivo control, identifica la cepa como *H. influenzae* tipo b. Una reacción positiva en el reactivo control indica que el microorganismo pertenece al tipo capsular a, c, d, e o f. Se ha demostrado que esta prueba es altamente sensible y específica para la identificación de *H. influenzae* tipo b.⁴⁹⁵

La serotipificación también se puede realizar mediante la incorporación de antisueros específicos de tipo en medio de

agar ópticamente claro que se complementa con factores X y V.⁸⁴ En este formato, se detecta el tipo capsular mediante la formación de una reacción de precipitación antígeno-anticuerpo (es decir, un "halo") que rodea la colonia. Se puede utilizar este enfoque para la serotipificación simultánea de gran cantidad de cepas mediante la inoculación en el sitio de las cepas sobre la superficie de agar utilizando un replicador de Steers. También se puede utilizar el método de agar antisuero detectando la portación orofaríngea de *H. influenzae* tipo b. Cuando se utiliza con este objetivo, se agrega bacitracina para inhibir otros microorganismos orofaríngeos.⁸⁴

Se pueden utilizar métodos moleculares para la tipificación capsular de *H. influenzae*. Falla y cols. crearon un método basado sobre PCR utilizando cebadores y sondas derivadas de secuencias de DNA específicas del tipo capsular clonadas a partir de grupos de genes capsulares (los loci *cap*) de los seis serotipos de *H. influenzae*.^{394,487} Cuando se utilizan estas herramientas junto con aquellas para el gen de exportación de la cápsula *bexA*, se podrían diferenciar entre ellos los mutantes tipo b capsulados, no capsulados y deficientes en cápsula. También se han identificado cebadores y sondas desarrollados a partir del DNA amplificado aleatoriamente para caracterizar a *H. influenzae* no tipificable mediante técnicas de PCR.⁶⁵¹ Esta técnica se ha aplicado a investigaciones de brotes de enfermedades respiratorias asociadas con *H. influenzae* no tipificable y fue validada como un método epidemiológico aceptable cuando se comparó tanto con el perfil de OMP como con los análisis de restricción de genes rRNA.⁶⁵¹

Biotipificación de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. En su estudio taxonómico del género, Kilian introdujo pruebas bioquímicas para la identificación y la caracterización de los hemófilos.⁶⁸⁵ Los biotipos se determinan con tres pruebas: producción de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa. Las cepas de *H. influenzae* podían ser divididas en siete biotipos que eran independientes del serotipo (tipo b, tipo no b o no tipificable).^{496,952,1204} También se describieron siete biotipos de *H. parainfluenzae* utilizando estos métodos. Las reacciones de biotipificación para las especies de *Haemophilus* se incluyen

en el cuadro 9-2. En el recuadro 9-6 se describen los medios y los procedimientos utilizados para la biotipificación convencional (véase lámina en color 9-1H).

La biotipificación de las especies de *Haemophilus* ha mostrado que los biotipos específicos se asocian con diferentes infecciones, fuentes, propiedades antigénicas y patrones de resistencia a los antibióticos. Oberhofer y Back examinaron 464 *H. influenzae* y 83 *H. parainfluenzae* y observaron que *H. influenzae* biotipo I se recuperaba principalmente de LCR, sangre y secreciones respiratorias y que la mayoría era de lactantes de menos de 1 año de vida.⁹⁵² *H. influenzae* biotipos II y III también se recuperaron de cultivos conjuntivales y de esputo de niños de 1 a 5 años de edad y de adultos mayores de 20 años. Aunque la mayoría de las cepas serotipo b pertenecían al biotipo I, las cepas no tipificables eran principalmente biotipos II y III. En su estudio de 1979, Oberhofer y Back observaron una asociación entre *H. influenzae* biotipos II y III y las infecciones oculares; esta observación fue corroborada en un estudio del año 2002 en San Francisco.^{21,952} Como ya se explicó, *H. influenzae* biotipo IV son patógenos emergentes en infecciones obstétricas, ginecológicas, perinatales y neonatales. Las genoespecies crípticas asociadas con infecciones materno-fetales también se biotipifican como *H. influenzae* biotipo IV, lo que destaca los inconvenientes de los métodos fenotípicos para la tipificación de cepas. Las genoespecies crípticas pueden distinguirse de las cepas biotipo IV sólo mediante métodos de genética molecular que no se encuentran fácilmente en los laboratorios de microbiología clínica. Estas cepas también pueden ser biotipificadas en forma menos confiable mediante sistemas de identificación comerciales. Quentin y cols. evaluaron cuatro sistemas por su capacidad para identificar/biotipificar 188 aislamientos de genitales y neonatales.¹⁰³⁵ De éstos, 167 (88%) fueron identificados y biotipificados correctamente, 8 fueron mal identificados y 13 fueron biotipificados incorrectamente al menos por un sistema. Los análisis de hibridación de DNA-DNA de los 21 aislamientos discrepantes pusieron en evidencia que 15 de ellos eran las genoespecies crípticas del tracto genital.

Recuadro 9-6 Medios y procedimientos para la biotipificación de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*

Prueba del indol

Se prepara una suspensión importante del microorganismo en buffer de fosfato 0,05 M (pH 8,0) que contiene triptófano al 0,1%. Después de 4 horas de incubación a 35 °C, se agregan algunas gotas de reactivo de Kovac y se agita la suspensión. Un color rojo en la capa de alcohol superior es un resultado positivo de la prueba; un color amarillo es un resultado negativo. También se puede utilizar el caldo de indol-triptófano con una inoculación importante para los bacilos entéricos con el agregado del reactivo de Kovac después de una incubación de toda la noche.

Prueba de la ureasa

Se prepara una solución balanceada de sales (KH₂PO₄ al 0,1%, K₂HPO₄ al 0,1%, NaCl al 0,5%, y 0,5 mL de una solución de rojo de fenol al 2%) (100 mL), ajustada a un pH de 7,0 y se la coloca en el autoclave. Se agrega urea acuosa y esterilizada con filtro (10 mL) y se coloca la solución en tubos estériles en pequeñas cantidades. Para realizar la prueba, se prepara una suspensión importante del microorganismo en el medio. La aparición de un color rojo en el medio después de 4 horas de incubación es un resultado positivo de la prueba. También se pueden utilizar para esta prueba las porciones inclinadas del agar urea de Christensen con una inoculación importante.

Prueba de la ornitina descarboxilasa

Se utiliza el caldo de ornitina descarboxilasa de Moeller estándar junto con un tubo de base de caldo de descarboxilasa de Moeller como control negativo. Se utiliza un inóculo importante y cada tubo se cubre con vaselina estéril. Es mejor leer los resultados después de una incubación de toda la noche, aunque la mayoría de las pruebas positivas se aprecian después de 4 a 6 horas y en general están disponibles después de 4 horas de incubación; las pruebas negativas deben ser reincubadas durante toda la noche.

Métodos bioquímicos y comerciales para la identificación de *Haemophilus*. También se pueden utilizar pruebas de fermentación de hidratos de carbono para la identificación de especies de *Haemophilus* (véase cuadro 9-2). Estos métodos evitan los problemas técnicos asociados con las determinaciones de requerimientos de factores que se explicaron antes. Se puede utilizar la producción de ácido a partir de varios hidratos de carbono (sacarosa, fructosa, ribosa, xilosa y manosa) para separar *H. influenzae* de *H. parainfluenzae*. Además de los requerimientos de factores de crecimiento, es necesaria una serie limitada de pruebas para diferenciar e identificar *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *H. segnis*. La fermentación de lactosa o la hidrólisis de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) son útiles para la identificación de *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*; ambos son positivos con estas pruebas, mientras que otras especies de *Haemophilus* (y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) son negativas (véase lámina en color 9-2G y H). *H. segnis* produjo una acidificación débil o tardía de sacarosa y fructosa, y es negativa en las tres reacciones de biotipificación.

Se determina la utilización de hidratos de carbono en agar cisteína-digerido trípico semisólido con inoculación importante que contiene hidratos de carbono esterilizados con filtro al 1%. En general, la producción de ácido se aprecia en 4 a 18 horas. Se pueden utilizar discos de ureasa y ornitina descarboxilasa impregnados con reactivos (Remel Laboratories) y la prueba de indol en el sitio para una biotipificación individual rápida (1 hora), si fuera necesario.

También se pueden utilizar sistemas comerciales de identificación que utilizan pruebas convencionales modificadas y sustratos enzimáticos cromogénicos para identificar y biotipificar simultáneamente especies de *Haemophilus*. El panel RapID NH (Remel Laboratories), la tarjeta de identificación para *Neisseria-Haemophilus* Vitek (NHI) (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, MO), el panel de identificación para *Haemophilus-Neisseria* (HNID) (Dade/MicroScan, West Sacramento, CA) y la tira API NH (bioMérieux, La Balme-les Grottes, Francia) identifican estos microorganismos dentro de las 4 horas de la inoculación (véase lámina en color 9-2A y C).^{341,628,629,909} Se incluyen ONPG, lactosa o ambos para la diferenciación de *H. aphrophilus/paraphrophilus*; las pruebas para un requerimiento de factor V separan estas dos especies.

Diagnóstico de laboratorio de la infección por *Haemophilus ducreyi*

Se pueden utilizar hisopos de algodón, rayón, dacrón o alginato de calcio para recoger muestras de úlceras chancroides. En condiciones ideales, las muestras se deben recoger de la base y los bordes socavados de la úlcera; el microorganismo no suele aislarse del pus de los bubones. No se ha evaluado la capacidad de los medios de transporte para mantener cepas clínicas de *H. ducreyi* y las muestras pueden albergar sólo pequeñas cantidades de microorganismos. Por lo tanto, los medios deben ser inoculados directamente. Los frotis teñidos con Gram del exudado supurado de las lesiones genitales de chancroide pueden no ser útiles debido a la baja sensibilidad y especificidad de la tinción de Gram. Cuando se observa en extendidos directos, *H. ducreyi* aparece como cocobacilos gramnegativos de tinción pálida, a menudo agrupados ("en cardúmenes") o dispuestos en cadenas paralelas laxamente enrolladas (en "vías de ferrocarril") (fig. 9-2). Se pueden encontrar en el interior y en el exterior de las células polimorfonucleares. Como las lesiones genitales y los ganglios supurados o los abscesos pueden sobreinfectarse



Figura 9-2 Morfología en la tinción de Gram de *Haemophilus ducreyi*. En los frotis teñidos preparados a partir de lesiones de chancroide o del crecimiento de las colonias, los bacilos gramnegativos pueden aparecer en grupos laxos ("cardumen" [izquierda]) o dispuestos en líneas paralelas onduladas ("vías de ferrocarril" [derecha]).

con otras bacterias (sobre todo fusobacterias, estafilococos y estreptococos), el diagnóstico mediante un frotis teñido con Gram es difícil y se debe intentar el cultivo. El diagnóstico de chancroide a menudo se hace sobre bases clínicas y epidemiológicas; sin embargo, en el diagnóstico diferencial se deben incluir la sífilis, la infección genital por virus del herpes simple y el linfogranuloma venéreo. Se describió un anticuerpo monoclonal dirigido contra *H. ducreyi*, que se utiliza en una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detectar microorganismos directamente en extendidos preparados de úlceras genitales.¹¹⁴¹ También se han producido sondas de DNA para *H. ducreyi* que se utilizan en contextos de investigación para la identificación del microorganismo y para la detección directa en muestras de animales con infección experimental.⁹⁸⁶

Puede ser difícil que *H. ducreyi* se desarrolle en cultivo y se han evaluado varios medios para lograrlo.⁷⁷³ Estos medios incluyen base de agar CG con suplemento de hemoglobina al 2%, suero fetal de ternero al 5% e IsoVitalax al 1% o enriquecimiento GCH1 (Remel) y agar de Mueller-Hinton con suplemento de sangre de caballo con chocolate al 5% más enriquecimiento de IsoVitalax al 1%.^{773,948} Totten y Stamm describieron una nueva placa clara y medios con caldo para *H. ducreyi* que contienen base de agar CG, enriquecimiento con factor XV al 1% (PML Microbiologicals, Tualatin, OR), suero fetal de ternero al 10% y catalasa (Sigma Chemical, St. Louis, MO).¹²⁸⁵ Se agrega catalasa como fuente de hemina. El caldo tiene una composición similar, pero se utiliza caldo CG en lugar de caldo como medio basal. Los medios comerciales de agar chocolate suelen sostener el crecimiento de *H. ducreyi*; se pueden colocar discos de vancomicina en distintos cuadrantes de una placa de chocolate para ayudar a la detección de los microorganismos en cultivos mixtos.^{536,773,1236} La mayoría de las cepas de *H. ducreyi* tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de vancomicina de 32 a 128 $\mu\text{g/mL}$, pero algunas tienen una CIM de tan solo 4 $\mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, puede ser ventajoso inocular medios con vancomicina y sin ella y recoger múltiples muestras apropiadas. Los medios se incuban a 33 °C a 35 °C en CO_2 al 5-7% o en una jarra de anaerobiosis por extensión con vela y elevada humedad. Se puede obtener un mejor crecimiento utilizando un ambiente microaerófilo, donde se colocan cultivos en una jarra Gas-Pak con dos envolturas que generan dióxido de carbono/gas hidrógeno y sin catalizador.¹²³⁶ Se ins-

peccionan los cultivos diariamente durante 10 días. La mayoría de las cepas clínicas producen un crecimiento visible en 2 a 4 días.

Las colonias de *H. ducreyi* son pequeñas, no mucoides y de color gris, amarillo u ocre y pueden "acodarse" sobre la superficie del agar cuando se aplica una ansa bacteriológica, son difíciles de recoger y producen una suspensión heterogénea y "grande" en solución salina. En la tinción de Gram, los microorganismos aparecen como cocos gramnegativos, habitualmente en estrecha asociación entre ellos. *H. ducreyi* es catalasa negativo y oxidasa positivo; la reacción de oxidasa suele ser tardía y se desarrolla sólo después de 15 a 20 segundos con el reactivo de dihidrocloruro de tetrametil-*p*-fenilenediamina. Debido a los requerimientos nutricionales especiales de *H. ducreyi*, no se pueden demostrar requerimientos de factores de crecimiento con las técnicas de discos o tiras impregnadas en factores. La prueba de ALA-porfirina es negativa, lo que indica que se necesita hemina exógena para el crecimiento. El microorganismo es bioquímicamente inerte, salvo por las pruebas de reducción de nitrato y fosfatasa alcalina positivas. Hannah y Greenwood evaluaron 64 cepas de *H. ducreyi* con el sistema RapID NH; todas fueron identificadas correctamente por este sistema, y las pruebas de fosfatasa y de reducción de nitrato fueron las únicas reacciones positivas para todas las cepas evaluadas (véase lámina en color 9-2C).⁵³⁶ En una evaluación con 25 cepas de *H. ducreyi*, Shawar y cols. observaron que todas producían reacciones enzimáticas únicas y compatibles en el sistema RapID ANA (bioMerieux-Vitek), que es un sistema de 4 horas utilizado para la identificación de bacterias anaerobias de importancia clínica (véase cap. 14).¹¹⁶⁹ Estos investigadores también comunicaron que las cepas de *H. ducreyi* son sensibles al polianetolsulfonato de sodio según lo determina un método de sensibilidad en disco. Estos autores sugirieron que las características de crecimiento simples, la sensibilidad al polianetolsulfonato de sodio y los perfiles de aminopeptidasa obtenidos con el sistema enzimático RapID ANA se podían utilizar para la identificación de *H. ducreyi*. Otros investigadores han mostrado que las cepas de *H. ducreyi* tienen perfiles uniformes aminopeptidasa que pueden ser útiles para la identificación de laboratorio.¹³¹⁰

También se han creado métodos no moleculares y técnicas no dependientes del crecimiento para la identificación o detección directa de *H. ducreyi*.⁷⁷³ Roggen y cols. desarrollaron un inmunoanálisis enzimático (EIA) que utiliza anticuerpos policlonales contra un antígeno de membrana específico de especie de 29 kDa y un antígeno de membrana específico de inmunotipo de 30 a 34 kDa como anticuerpos de captura.¹⁰⁸⁴ Este EIA reaccionó con todas las cepas de *H. ducreyi* evaluadas y también pudo detectar los microorganismos directamente en muestras clínicas. También se utilizó PCR para detectar *H. ducreyi*. Chui y cols. informaron del desarrollo de un conjunto de cebadores y dos sondas de DNA específicas para *H. ducreyi* sobre la base de las secuencias de nucleótidos publicadas del rRNA de 16S del microorganismo.²⁵⁵ El conjunto de cebadores y las sondas tuvieron una sensibilidad del 100% para detectar 51 cepas de *H. ducreyi* que se aislaron en seis continentes en un período de 15 años. El procedimiento de detección directo basado sobre la PCR fue evaluado en 100 muestras clínicas y mostró una sensibilidad del 83% al 98% y una especificidad del 51% al 67%, según la cantidad de ciclos de amplificación.²⁵⁵ Otro grupo de investigadores también creó un ensayo basado sobre PCR para la detección directa de *H. ducreyi*, pero la sensibilidad y la especificidad de la prueba fueron desalentadoras.⁶⁴⁸ Observaron que la falla de la PCR para detectar *H.*

ducreyi probablemente condujo a una inhibición inespecífica de la DNA polimerasa *Taq* por el material en la muestra. Gu y cols. produjeron, mediante ingeniería genética, una prueba de PCR para *H. ducreyi* que utilizó regiones separadoras intergénicas de rRNA de 16S y 23S como secuencias diana para la detección.⁵⁰⁵ Por último, Orle y cols. idearon un análisis de PCR múltiple para la detección directa de *H. ducreyi*, *Treponema pallidum* y virus del herpes simple tipos 1 y 2 directamente de úlceras genitales.⁹⁷³

Sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Haemophilus*

Hasta alrededor de 1973, las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *H. influenzae* eran innecesarias porque casi todas las cepas importantes eran sensibles a la ampicilina, el fármaco de elección para la meningitis y la bacteriemia causadas por este microorganismo. Para 1974, algunas cepas de *H. influenzae* se habían vuelto resistentes a la ampicilina debido a la producción de enzimas β -lactamasas mediadas por plásmidos que inactivan la ampicilina. Las β -lactamasas mediadas por plásmidos se han hallado en *H. influenzae* tipo b, no tipo b encapsulado y no tipificable, y en cepas de *H. parainfluenzae*. Estos microorganismos albergan un transposón de 3 MDA que transporta el gen para una enzima β -lactamasa tipo TEM-1. Algunas raras cepas de *H. influenzae* producen un segundo tipo de β -lactamasa, denominado ROB-1.³⁰³ En los últimos 25 años, la prevalencia de cepas β -lactamasa positivas ha aumentado lentamente en todo el mundo.⁴⁰³ Un estudio de muestras respiratorias de *H. influenzae* recogidas durante 1997 en los Estados Unidos y Canadá comunicó que el 34,2% de 837 aislamientos en 27 centros médicos de los Estados Unidos y el 31,3% de 240 aislamientos en 7 centros canadienses eran β -lactamasa positivos.³⁴² En un segundo estudio cooperativo reciente sobre sensibilidad de los microorganismos aislados en los Estados Unidos, llevada a cabo como parte del SENTRY Surveillance Program, se observó que el 35% de 1 032 aislamientos de *H. influenzae* eran β -lactamasa positivas.¹²⁷³ En el proyecto de vigilancia LIBRA 2002, *H. influenzae* β -lactamasa positivo representó el 32,2% de 2 791 cepas.⁶⁴⁹ En todos estos estudios, más del 99% de las cepas fueron sensibles a amoxicilina-clavulanato, independientemente de la producción de β -lactamasa. El clavulanato inactiva la β -lactamasa y vuelve a los microorganismos sensibles a la amoxicilina incluida en esta combinación de antibióticos.

Se han aislado raras cepas de *H. influenzae* que son resistentes a la ampicilina, pero no producen β -lactamasas.^{822,859} En estas cepas, la resistencia se debe a alteraciones en las proteínas de la pared celular fijadoras de penicilina o en la permeabilidad de la membrana celular al agente.⁸⁵⁹ Estas cepas muestran menor sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación y a combinaciones de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa.^{857,859} Aunque los estudios iniciales sugirieron que es posible que los métodos de difusión con discos no detecten con precisión resistencia a la ampicilina en estas cepas, cambios en el medio de prueba (*Haemophilus* Test Medium [HTM]) y modificaciones de los criterios de interpretación han encarado estos problemas.^{652,653,858} Por fortuna, estas cepas β -lactamasa negativas y resistentes a la ampicilina son muy infrecuentes. Un estudio de vigilancia de *H. influenzae* 2000-2001 sólo detectó 9 (0,6%) cepas β -lactamasas negativas y resistentes a la ampicilina entre 1 434 cepas.⁶⁶⁸ La CIM de la ampicilina para estas nueve cepas fue de 4 μ g/mL; todas eran sensibles a amoxicilina-clavulanato, cefuroxima, cefprozilo, macrólidos y fluoroquinolonas.

El cloranfenicol, utilizado antes como alternativa de la ampicilina en el tratamiento de la meningitis, sigue siendo altamente activo contra *H. influenzae* y el 99% de las cepas evaluadas en un estudio cooperativo entre los Estados Unidos y Canadá fueron sensibles.³⁴² Las preocupaciones acerca de su toxicidad potencial y cuestiones relativas a interacciones farmacológicas han limitado su uso tanto en los Estados Unidos como en los países en vías de desarrollo.¹¹¹⁹ También ha aparecido resistencia al cloranfenicol en estos microorganismos.^{190,831} La mayoría de *H. influenzae* resistentes al cloranfenicol producen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), que cataliza la transferencia de dos grupos acilos desde la acetilcoenzima A a los sitios activos en la molécula de cloranfenicol, impidiendo así que el antibiótico realice su función normal de inhibir la síntesis de proteínas bacterianas.⁸³¹ Aunque las cepas productoras de CAT de *H. influenzae* parecen producir la enzima en forma constitutiva (en todas las condiciones de crecimiento), la producción de CAT por otras especies de *H. influenzae* es inducible y requiere la exposición del fármaco para la producción de la enzima.⁸³¹ Otras cepas resistentes al cloranfenicol demuestran una impermeabilidad relativa debido a la pérdida de un OMP importante que permite la entrada del fármaco en la célula.¹⁹⁰

En la actualidad, las cefalosporinas de tercera generación constituyen la terapia recomendada para el tratamiento de las infecciones graves por *Haemophilus* debido a la actividad excelente de estos agentes tanto in vitro como in vivo.¹¹¹⁹ En los estudios de los Estados Unidos y Canadá, las comunicaciones de Surveillance Network Database y Alexander Project y los estudios de vigilancia SENTRY, todas las cepas de *H. influenzae* fueron sensibles a las cefalosporinas cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona y cefixima.^{342,403,669,1273} Además de la amoxicilina, el cefaclor fue el único agente afectado adversamente por la producción de β -lactamasa. Aunque 92,5-97,2% de *H. influenzae* β -lactamasa negativa fueron sensibles a cefaclor, sólo 54-76,9% de las cepas β -lactamasa positivas fueron sensibles.^{342,1273}

Las infecciones asociadas con *H. influenzae* no tipificable, como las exacerbaciones de bronquitis crónica, EPOC y otitis media, a menudo son tratadas con ampicilina y amoxicilina si se ha documentado sensibilidad a estos agentes. De otro modo, se prescriben macrólidos, sulfamidas o fluoroquinolonas por boca contra estas infecciones. Entre los macrólidos, la azitromicina es el más activo contra *H. influenzae* y el 99,8% de las cepas son sensibles a la azitromicina, en comparación con el 61,4-91,7% que son sensibles a la claritromicina.^{342,1273} Trimetoprim-sulfametoxazol también se administra con frecuencia para estas infecciones, pero sólo 77,3-87,5% de las cepas son sensibles a este agente. Sin embargo, las fluoroquinolonas tienen una actividad excelente contra *H. influenzae*. Algunos estudios cooperativos grandes han comunicado que las cepas de *H. influenzae* son sensibles a ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, esparsifloxacina, gatifloxacina, grepafloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina y trovofloxacina.^{107,323,451,694,1273} Aunque la mayoría de las cepas de *H. influenzae* tienen una CIM de ciprofloxacina $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$, recientemente se han comunicado cepas con CIM de ciprofloxacina elevada ($\geq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$).^{128,129}

En general, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* son sensibles a las cefalosporinas de tercera generación, las quinolonas, el cloranfenicol, las tetraciclinas y los aminoglucósidos. Algunos agentes, como ceftriaxona, cefotaxima y ciprofloxacina, han sido eficaces en pacientes con infecciones graves del sistema nervioso central (SNC), abscesos cerebrales y endocarditis.¹³³² Aunque la mayoría de las cepas son sensibles a penicilina y ampicilina, se han comuni-

cado cepas resistentes, incluidas algunas que producen β -lactamasa.⁶⁵⁰

Cuando se examinan cepas de distintas partes del mundo, las de *H. ducreyi* muestran una amplia gama de resistencia mediada por plásmidos a los antibióticos, que incluyen ampicilina, tetraciclina, sulfamidas, cloranfenicol y los aminoglucósidos más antiguos. Las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftixima), las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y los macrólidos (eritromicina, azitromicina) muestran una actividad excelente contra *H. ducreyi* in vitro, mientras que muchas cepas son resistentes a tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol.^{698,824,1309} Muchos de estos agentes han sido utilizados como éxito para el tratamiento del chancroide.^{79,815,824,1295} Sin embargo, debido a los fracasos terapéuticos en pacientes infectados por HIV, existe cierta preocupación acerca de la eficacia clínica de las terapias de dosis única o de serie corta (p. ej., ceftriaxona por vía intramuscular, azitromicina por vía oral) en individuos con chancroide que también están inmunodeprimidos.^{148,1296}

Se puede determinar la sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Haemophilus* mediante los procedimientos de difusión con discos y dilución en caldo o agar. En el capítulo 15 se describen los métodos de evaluación de la sensibilidad.

Especies de *Actinobacillus*

Los *Actinobacillus* son bacilos no esporulados, gramnegativos pequeños e inmóviles que se encuentran predominantemente en los animales. Se hallan tres especies—*A. actinomycetemcomitans*, *A. ureae* y *A. hominis*— en los seres humanos. Además de la asociación con los animales, estos microorganismos son similares a los miembros del género *Pasteurella* en muchas de sus características de cultivo y fenotípicas. En 1986, una ex especie de *Pasteurella*, *P. ureae*, fue transferida formalmente al género *Actinobacillus* como *Actinobacillus ureae*; otras especies (p. ej., *A. capsulatus*, *A. muris* y *A. seminis*) pertenecen claramente a otros géneros sobre la base de la hibridación de DNA-rRNA y la secuenciación de rRNA 16S.^{331,921,1009}

A. actinomycetemcomitans, la principal cepa clínica humana, comparte muchas características de cultivo y bioquímicas con los hemófilos. Algunos estudios de transformación, hibridación de DNA e inmunodifusión han demostrado que está más estrechamente relacionado con *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *H. segnis* que con las otras especies de *Actinobacillus*.¹²⁵⁸ En 1985, se propuso transferir *A. actinomycetemcomitans* al género *Haemophilus* como "*Haemophilus actinomycetemcomitans*".¹⁰²⁴ Sin embargo, esta propuesta fue rechazada por la falta de similitud con la especie tipo del género *Haemophilus* (*H. influenzae*). Otros autores han argumentado que *A. actinomycetemcomitans* y *H. aphrophilus* no deben ser incluidos en el género *Haemophilus* porque no requieren factores X o V. No obstante, las especies de los cerdos descritas recientemente—*A. minor*, *A. porcinus* y *A. indolicus*— son dependientes del factor V, como lo es *A. pleuropneumoniae*. En la actualidad, las especies de *Actinobacillus*, entre ellas, *A. actinomycetemcomitans*, se mantienen en la familia *Pasteurella*, ahora incluida en γ -*Proteobacteria*.⁴⁵⁵

Actinobacillus actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans es parte de la flora normal de la cavidad bucal, sobre todo en los surcos gingivales y supragin-

ginales. Sobre la base de las reacciones de anticuerpos monoclonales específicos con porciones expuestas de hidratos de carbono en la superficie celular del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, esta especie puede ser dividida en seis serotipos, designados a a f.⁴⁷¹ Los serotipos a, b y c son los prevalentes y comprenden más del 80% de las cepas orales con frecuencias iguales.¹¹¹⁷ Aunque se ha sugerido que ciertos serotipos (p. ej., serotipo b) pueden estar asociados con formas específicas de enfermedad periodontal, los estudios de biotipificación y de sondas genéticas rRNA demostraron una heterogeneidad fenotípica y genómica importante entre las cepas pertenecientes al mismo serotipo.^{65,344,1116} También se pueden detectar diferentes cepas dentro del mismo serotipo con PCR preparado arbitrariamente y análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción.³⁴⁴ Otros estudios que utilizaron análisis de secuencia de los genes rRNA de 16S y ensayos de PCR para leucotoxina, toxina distensora del citoesqueleto, antígeno de la subunidad principal de las fimbrias y genes de polisacárido O específicos de serotipos han mostrado que las cepas de *A. actinomycetemcomitans* pueden ser divididas en tres linajes que consisten en todas las cepas de serotipo b, todas las cepas de serotipo c y cepas pertenecientes a los serotipos a, d, e y f.⁶⁶⁵ Todos estos serotipos y linajes han sido aislados de pacientes con enfermedad periodontal, lo que sugiere que todos tienen potencial patogénico.

IMPORTANCIA CLÍNICA

A. actinomycetemcomitans se asocia con infecciones actinomicóticas, endocarditis, bacteriemia, infecciones de heridas e infecciones dentales. El nombre del microorganismo deriva de su aislamiento "concomitante" reconocido con especies de *Actinomyces* de los abscesos y otras infecciones.^{28,738,897,1434} Junto con las otras bacterias HACEK, *A. actinomycetemcomitans* es una causa de endocarditis bacteriana subaguda.^{234,270,664,1221} En general, la endocarditis de válvula nativa ocurre en individuos con daño valvular previo causado por cardiopatías congénitas, que incluyen estenosis aórtica congénita, enfermedad de la válvula aórtica, comunicación interauricular e insuficiencia de la válvula mitral debida a cardiopatía reumática. También se ha comunicado una endocarditis de la válvula mitral y aórtica protésica en individuos con válvulas porcinas y mecánicas y marcapasos; las complicaciones localizadas han incluido pericarditis y absceso paravalvular.^{1315,1379} Los factores predisponentes en el desarrollo de la endocarditis por *A. actinomycetemcomitans* incluyen una mala dentición y manipulaciones dentales recientes,^{40,234} y suele tener un curso indolente. Es frecuente la fiebre, la pérdida de peso, los escalofríos, la tos y los sudores nocturnos, junto con un soplo cardíaco. La hepatoesplenomegalia y las hemorragias conjuntivales o lineales subungulares se presentan en forma variable. Las complicaciones sistémicas son embolias sépticas, arteritis coronaria, vasculitis, insuficiencia cardíaca congestiva, daño valvular que requiere colocación o reemplazo de válvula protésica, complicaciones infecciosas de la diseminación hematogénica (p. ej., endoftalmitis, glomerulonefritis, artritis séptica) y muerte.^{664,757,1163,1171,1221,1327}

A. actinomycetemcomitans es un patógeno reconocido en el desarrollo de periodontitis. Este microorganismo está relacionado causalmente con un tipo de periodontitis de inicio temprano denominada **periodontitis juvenil localizada**.⁵¹⁶ una enfermedad de los niños mayores y los adultos jóvenes (12-26 años) caracterizada por la rápida degeneración y destrucción del hueso alveolar que sostiene los primeros molares permanentes e incisivos. La pérdida de hueso subgingival en estas

áreas provoca el desarrollo de bolsillos gingivales profundos y la acumulación de cálculos e inflamación gingival poco evidente.⁵¹⁶ La progresión de la pérdida ósea hasta afectar los dientes adyacentes conduce a la periodontitis juvenil generalizada o la periodontitis rápidamente progresiva.

Algunos estudios epidemiológicos e inmunológicos sugieren que la periodontitis juvenil localizada y otras enfermedades periodontales graves tienen componentes raciales o genéticos que predisponen a estas infecciones endógenas graves. En una encuesta de más de 11 000 individuos de 14 a 17 años se observó que las personas de raza negra tenían una prevalencia mucho mayor de periodontitis juvenil localizada que las de raza blanca (2,64% frente a 0,17%).⁷⁹² Los hombres de raza negra presentaban una probabilidad casi tres veces mayor de sufrir periodontitis juvenil localizada que las mujeres de raza negra, mientras que la probabilidad era tres veces mayor en las mujeres de raza blanca que en los hombres de raza blanca. Los pacientes con periodontitis juvenil localizada también producen concentraciones anormalmente altas de prostaglandina E₂ y la citocina inflamatoria factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en los líquidos de los surcos que rodean los dientes.⁵¹⁶ Estos factores son producidos por monocitos y macrófagos locales en respuesta a los productos bacterianos. Los monocitos y los macrófagos cultivados a estos pacientes producen tres a seis veces más cantidad de estas citocinas que las células similares de pacientes que no tienen periodontitis juvenil localizada con exposición a lipopolisacárido.¹¹⁶⁷ Estas citocinas inflamatorias inducen resorción ósea por los osteoclastos y conducen a pérdida ósea alveolar y regulación negativa de la quimiotaxis de los neutrófilos. Los clones de *A. actinomycetemcomitans* que producen grandes cantidades de leucotoxina pueden asociarse con formas de inicio temprano de periodontitis y pueden ser distintos entre las diferentes poblaciones raciales y geográficas.^{540,544} Sin duda, la periodontitis juvenil localizada y la periodontitis generalizada son enfermedades multifactoriales resultantes del interjuego de factores genéticos, ambientales y microbianos.

La enfermedad periodontal asociada con *A. actinomycetemcomitans* evoca respuestas inmunes sistémicas y localizadas. Los pacientes con periodontitis juvenil localizada producen títulos altos de IgG en suero contra los antígenos de serotipo de *A. actinomycetemcomitans*, que son oligosacáridos de cadena lateral O en el lipopolisacárido de la pared celular.⁵⁰⁴ El LPS del microorganismo también induce inflamación gingival localizada y permite que el microorganismo se establezca en la placa gingival. Además de una leucotoxina potente y un LPS, *A. actinomycetemcomitans* produce otras distintas propiedades que contribuyen a su virulencia como patógeno periodontal (recuadro 9-7). Algunos de estos factores también estimulan la producción de anticuerpos en el suero y el líquido de los surcos.⁵⁰⁴ La respuesta inmunitaria a los antígenos microbianos puede ayudar a limitar el proceso periodontal y la falta de estimulación de las respuestas humoral y celular contra el microorganismo o sus productos puede ser parcialmente responsable de la progresión hasta la enfermedad periodontal generalizada más grave.¹¹²⁰ Además del periodontitis juvenil localizada y de otras formas generalizadas de enfermedad periodontal, *A. actinomycetemcomitans* está implicado en la patogenia del síndrome de Papillon-Lefevre, una enfermedad hereditaria caracterizada por hiperqueratosis de las palmas y las plantas, y destrucción periodontal extensa que conduce a la pérdida tanto de los dientes primarios como permanentes.¹³²¹

Otras infecciones causadas por *A. actinomycetemcomitans* son el resultado de la propagación contigua del microorganismo desde su hábitat en la cavidad bucal o por la diseminación

Recuadro 9-7 Factores de virulencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans***Fimbrias**

En fresco, *A. actinomycetemcomitans* tiene muchas fimbrias largas producidas en forma máxima bajo condiciones anaerobias y que se pierden en los subcultivos seriados.^{618,1140} Estas fimbrias están compuestas por una subunidad proteica de 52 a 54 kDa. Las células con fimbrias se agregan espontáneamente, muestran un aumento de la adherencia a las cuentas de hidroxiapatita y promueven la adherencia a las superficies mucosas y a los tejidos bucales y su opsonización, respectivamente.⁸⁷³

Leucotoxina

La leucotoxina es una proteína de 116 kDa que se une a las membranas celulares de neutrófilos, monocitos y linfocitos T.¹²⁴⁵ La toxina induce la formación de poros en las membranas celulares, produce desgranulación del contenido lisosómico a la superficie celular de los polimorfonucleares, induce la escisión y la fragmentación del DNA cromosómico, posiblemente por activación de nucleasas endógenas y protege al microorganismo de la fagocitosis.^{644,816,1245} La producción de leucotoxina en el área supragingival puede conducir a una desgranulación localizada de las células polimorfonucleares (PMN) y la liberación de contenido lisosómico que puede aumentar la inflamación y producir la inmunosupresión localizada central para el desarrollo de las lesiones periodontales de la periodontitis juvenil localizada. Esta toxina es descodificada por un operón genético que consiste en cuatro genes (*ltxC*, *ltxA*, *ltxB* y *ltxD*), de los cuales *ltxA* es el gen estructural.⁷¹¹ La proteína *ltxC* es necesaria para la activación de la proteína de leucotoxina, mientras que los productos genéticos *ltxB* y *ltxD* están involucrados en la secreción del polipéptido de la toxina.⁵⁴⁶ Esencialmente todas las cepas de *A. actinomycetemcomitans* contienen el operón leucotoxina, pero el nivel de leucotoxina producido por las diferentes cepas varía.^{610,710} Algunas cepas altamente leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans* producen 10 a 20 veces más leucotoxina que las cepas mínimamente leucotóxicas debido a la presencia de una delección de 530 pares de bases dentro de la región promotora de la toxina o por la presencia de un elemento de secuencia de inserción adyacente a la región promotora de leucotoxina.^{178,546} Estos clones altamente tóxicos se encuentran en los mismos grupos de edad que la periodontitis juvenil localizada y se asocian con una periodontitis grave.¹⁴²⁶

Toxina distensora citotetal

Recientemente se identificó un locus genético del *A. actinomycetemcomitans* que tenía una identidad de secuencia mayor del 90% con el locus del gen distensor de la citotoxina (*cdt*) de algunas cepas de *E. coli* patogénico y *H. ducreyi*.⁸⁴⁰ Las cepas que tienen los genes que producen toxina in vitro, aunque se presentan naturalmente como cepas toxina negativas tenían delecciones grandes dentro del locus del gen *cdt* propiamente dicho. In vitro, la toxina distensora citotetal produce distensión y muerte del ovario del hámster chino y otras líneas celulares y es capaz de causar detención del ciclo celular de los linfocitos.¹⁷⁸ Se está investigando el papel de esta toxina en la producción de enfermedad.

Invasión celular

A. actinomycetemcomitans puede invadir activamente las células humanas y las líneas celulares.⁸⁶³ Esta capacidad protege al microorganismo de los factores inmunes humorales y celulares y de los efectos de algunos antibióticos. La invasión celular por *A. actinomycetemcomitans* comprende tanto vías dependientes de la actina como independientes de ella.¹⁷⁶ La capacidad de invasión no se relaciona con ningún tipo de cepa particular según lo define el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, y se observa producción de leucotoxina más a menudo en cepas no invasoras de *A. actinomycetemcomitans*.⁷⁶⁸

Antígeno inductor de resorción ósea

Se ha demostrado que un antígeno polisacárido de superficie de *A. actinomycetemcomitans* estimula la resorción ósea en un sistema de cultivo de hueso de ratón e induce a células similares a los osteoclastos en cultivos de médula de ratón.¹²⁹⁷ La pérdida de hueso alveolar durante la patogenia de la periodontitis juvenil localizada puede reflejar parcialmente la actividad de este antígeno in vivo.

Fracción inmunosupresora

Orlitzky y cols. aislaron y purificaron una fracción inmunosupresora (ISF) de *A. actinomycetemcomitans*, inmunizaron a los animales con ISF y realizaron experimentos de transferencia adoptiva para proporcionar células T sensibilizadas a ratones no inmunes.⁹⁵⁵ Estas células T inducidas por ISF ejercieron un efecto inmunosupresor sobre la función de las células B y sobre la producción de anticuerpos contra *A. actinomycetemcomitans*. ISF puede actuar como factor de virulencia para suprimir la producción localizada de anticuerpos, impidiendo así la opsonización y la eliminación de los microbios.

Endotoxina de lipopolisacáridos

La endotoxina de *A. actinomycetemcomitans* tiene todas las propiedades de endotoxinas de las otras bacterias. En los surcos gingivales, el lipopolisacárido estimula los osteoclastos a iniciar la resorción ósea, activa el complemento e induce la liberación lisosómica desde PMN.

Enzimas que degradan inmunoglobulinas y componentes fijadores de Fc

A. actinomycetemcomitans también produce enzimas que pueden degradar las inmunoglobulinas G, M y A, impidiendo así la opsonización por anticuerpos.⁸⁷⁴ Además, se producen componentes asociados con células y extracelulares que pueden unirse a la región Fc de las moléculas de inmunoglobulina.¹²⁷⁹ La liberación de estas moléculas desde los microorganismos puede contribuir a la periodontitis al interferir en la opsonización de las bacterias, la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares y la fijación del complemento. Este componente de unión aparentemente es un OMP de 25 a 32 kDa relacionado con el OmpA de *E. coli*.⁸⁷⁴

Colagenasas y proteasas

A. actinomycetemcomitans y otros microbios bucales producen colagenasas y proteasas que pueden actuar sobre el tejido conectivo y los colágenos de la matriz basal.⁴⁵⁷ Estas enzimas pueden funcionar para facilitar la propagación del microorganismo en el tejido blando y para generar péptidos pequeños que pueden tener actividad biológica sobre mediadores de la inflamación.

hematogena durante la bacteriemia. Estas infecciones incluyen absceso encefálico; linfadenitis cervical; celulitis; artritis séptica; osteomielitis; discitis vertebral; abscesos subcutáneos, mediastínicos, de la pared torácica e intraabdominales, y osteomielitis vertebral.^{226,404,533,664,881,924,1434} Morris y Sewell comunicaron un caso de neumonía necrosante debida a *A. actinomycetemcomitans* y *A. actinomycetemcomitans israelii* en un hombre de 46 años tres meses después de la extracción de varios dientes debido a una enfermedad periodontal avanzada.⁸⁹⁷ Kuijper y cols. informaron de un caso de actinomycosis diseminada en el cual se recuperaron tanto *A. actinomycetemcomitans* como *Actinomyces meyeri* de lesiones subcutáneas y de abscesos cerebrales.⁷³⁸ El paciente había tenido lesiones pulmonares lentamente progresivas durante los 6 años precedentes de las que se sospechó pero no se comprobó que eran la fuente de ambos microorganismos. Las infecciones pulmonares por *A. actinomycetemcomitans* en ausencia de especies de *Actinomyces* son raras y sólo se comunicaron cuatro casos antes de 1990 en la bibliografía inglesa. En un caso informado por Yuan y cols., la infección afectó el pulmón, el tejido blando de la pared torácica y las costillas y el esternón suprayacentes.¹⁴²⁵ También puede ocurrir la embolización séptica del microorganismo desde un foco pulmonar primario.¹³³² Las puertas de entrada para estos distintos tipos de infecciones incluyeron lesiones bucales, infecciones pulmonares previas, abrasiones cutáneas, sitios de toracotomía e instrumentación de las vías urinarias.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN

A. actinomycetemcomitans crece lentamente en agar chocolate y agar sangre, y aparecen colonias visibles después de 48 a 72 horas (véase lámina en color 9-3B). Las colonias son pequeñas, lisas, translúcidas, no hemolíticas y tienen bordes ligeramente irregulares. Las cepas clínicas frescas son adherentes al agar y es difícil emulsificarlas. Con una incubación prolongada (de 5 a 7 días), las colonias pueden desarrollar una densidad central que aparece como una estrella de cuatro o seis puntas. Esta característica se pierde en el subcultivo repetido y las colonias se vuelven menos adherentes. Como sucede con *H. aphrophilus*, el crecimiento en caldo es escaso y adherente a los lados del tubo. En la tinción de Gram los microorganismos aparecen como cocobacilos gramnegativos de tinción pálida. Se pueden observar células más grandes con subcultivos repetidos.

Las características para la identificación de *A. actinomycetemcomitans* incluyen falta de crecimiento en agar de MacConkey y otros agares entéricos, y reacciones positivas para la producción de catalasa y la reducción de nitrato. El microorganismo es oxidasa negativo (cepas ocasionales pueden ser débilmente positivas) y ureasa negativo, no produce indol y no requiere factores X ni V. Las reacciones de lisina y ornitina descarboxilasa y de arginina dihidrolasa son negativas. La mayoría de las cepas fermentan fuertemente la glucosa, la fructosa y la manosa (véase lámina en color 9-3C); la producción de ácido a partir de maltosa, manitol y xilosa varía. *A. actinomycetemcomitans* puede ser diferenciado de *H. aphrophilus* en que el primero es catalasa positivo y ONPG negativo y no se produce ácido a partir de lactosa, sacarosa o trehalosa (véase cuadro 9-3).

También se describieron métodos moleculares para la detección e identificación de *A. actinomycetemcomitans*.^{343,1071} Algunos estudios genéticos han mostrado que el gen para rRNA 23S es dividido en dos formas más pequeñas en *A. actinomycetemcomitans*, mientras que el transcrito es continuo en

H. aphrophilus, *H. paraphrophilus*, *H. segnis* y *H. influenzae*.¹⁰²⁸ El reconocimiento de este patrón atípico de RNA en la electroforesis en gel de poliacrilamida puede proporcionar una identificación/diferenciación de cepas precisas. También se han creado métodos basados sobre sondas directas y sondas amplificadas para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y otros patógenos periodontales directamente en muestras de placas subgingivales.^{712,1287} Se ha utilizado la amplificación del gen *lktA*, el gen estructural para la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, para la identificación y la detección directa del microorganismo en el líquido gingival y la placa subgingival.^{415,486} Aunque la tipificación y la caracterización de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* pueden lograrse mediante serología, han utilizado otros métodos tradicionales y de base molecular, como tipificación del antibiograma; biotipificación basada sobre la fermentación de manosa, manitol y xilosa; electroforesis en gel de sulfato de dodecilo-poliacrilamida (SDS-PAGE) de OMP, análisis de endonucleasas de restricción de la totalidad del DNA cromosómico, polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción y ribotipificación.^{65,534,1239,1314} Los ensayos de base molecular pueden tener un valor particular para diferenciar las cepas atípicas de *A. actinomycetemcomitans* (p. ej., cepas catalasa negativas) de hemófilos y para estudios epidemiológicos.¹⁰⁷¹

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* son sensibles a las cefalosporinas de tercera generación (p. ej., ceftriaxona, cefuroxima, cefixima, cefotaxima, ceftazidima, cefepima), fluroquinolonas (p. ej., ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, clinafloxacina), tetraciclina, doxiciclina, azitromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y aminoglucósidos.^{736,807,981,982,983} Aunque la amoxicilina muestra buena actividad contra *A. actinomycetemcomitans*, entre el 30% y el 40% de las cepas son resistentes a la benzilpenicilina.^{70,736,807,980} Las cepas resistentes a la penicilina no producen enzimas β -lactamasas, de modo que la resistencia se debe presumiblemente a una alteración de las proteínas fijadoras de penicilina.⁹⁸⁰ La amoxicilina-clavulanato no demuestra ninguna actividad mayor que la amoxicilina sola, lo que apoya más la falta de actividad de las β -lactamasas.⁸⁰⁷ La sensibilidad in vitro a la amoxicilina no predice necesariamente un resultado clínico favorable y, en consecuencia, las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona) se consideran los agentes de elección para el tratamiento empírico de las infecciones graves como la endocarditis.¹³⁸² Algunos estudios in vitro indican que las combinaciones de antibióticos para el tratamiento de la endocarditis por *A. actinomycetemcomitans* puede ser sinérgica, aditiva o antagónica.⁹⁹³ Por ende, la eficacia de la terapia de combinación no puede ser predicha y debe ser determinada para cepas individuales mediante una técnica de dilución en agar o Etest.⁹⁸²

El tratamiento de la enfermedad periodontal asociada con *A. actinomycetemcomitans* comprende desbridamiento subgingival, descamación, cepillado de raíces y tratamiento antibiótico dirigido contra las bacterias asociadas con periodontitis. El tratamiento exitoso depende en parte de la erradicación y la supresión de *A. actinomycetemcomitans* y otras bacterias de los bolsillos periodontales profundos. El régimen actualmente recomendado incluye tetraciclina, doxiciclina o un tratamiento combinado con amoxicilina y metronidazol.⁵¹⁷ Aunque la mayoría de las cepas se han mantenido sensibles a las tetraciclinas —los agentes de elección durante muchos años— se ha comunicado una resistencia a las tetraciclinas asociada con

Cuadro 9-3 Características bioquímicas para la identificación de *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, y especies de *Actinobacillus* aisladas de seres humanos

CARACTERÍSTICA	<i>H. APHROPHILUS</i>	<i>H. PARAPHROPHILUS</i>	<i>A. ACTINOMYCETEMCOMITANS</i>	<i>A. UREAE</i>	<i>A. HOMINIS</i>
Hemólisis, SBA	—	—	—	—	—
Oxidasa	— ^a	— ^b	— ^b	+	+
Catalasa	—	—	+	+	—
NO ₃ reducido a NO ₂	+	+	+	+	+
Requiere factor X	—	—	—	—	—
Requiere factor V	—	+	—	—	—
Indol	—	—	—	—	—
Ureasa	—	—	—	+	+
ODC	—	—	—	—	—
Hidrólisis de ONPG	+	+	—	—	+
Producción de ácido a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+ ^b	+ ^a	+
Fructosa	+	+	+	ND	ND
Sacarosa	+	+	—	+	+
Lactosa	+	+	—	—	+
Xilosa	—	—	V	—	+
Manitol	—	—	V ^c	+	+
Manosa	+	+	+	V	—
Galactosa	+	—	V	—	+
Melibiosa	—	+	—	—	+
Trehalosa	+	+	—	—	+
Melezitosa	—	+	ND	ND	ND
Rafinosa	+	—	—	—	+

^aAlgunas cepas pueden producir reacciones positivas débiles o tardías.^bRaras cepas son maltosa negativas.^cLa mayoría de las cepas son manitol positivas.

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; ND: datos no disponibles; ODC: orotidina-5'-fosfato descarboxilasa; SBA: agar sangre de carnero.

plásmidos y mediada por *tetB* en *A. actinomycetemcomitans*.¹⁰⁸¹ La combinación amoxicilina-metronidazol se asocia con menos fracasos terapéuticos y erradica y suprime eficazmente la proliferación subgingival del microorganismo.¹³¹⁶ Como la mayoría de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* son resistentes al metronidazol in vitro, el éxito del tratamiento combinado puede deberse en parte a la actividad de la amoxicilina sobre *A. actinomycetemcomitans* y a la amplia actividad del metronidazol contra los microorganismos periodontales anaerobios coinfectantes (especies de *Prevotella* y *Porphyromonas*). Las fluoroquinolonas (p. ej., ciprofloxacina, moxifloxacina) también pueden ser eficaces para el tratamiento de las infecciones periodontales asociadas con *A. actinomycetemcomitans*.^{697,907}

Actinobacillus ureae

Algunos estudios genéticos y fenotípicos han mostrado que varias especies de *Pasteurella* ("*P. ureae*", "*P. pneumotropica*" y "*P. aerogenes*") están estrechamente relacionadas con especies animales del género *Actinobacillus*.^{331,386,920} Las similitudes fenotípicas incluyen reacciones similares de oxidasa y catalasa, reducción de nitrato a nitrito, crecimiento en agar de MacConkey, producción de ureasa y fermentación de varios hidratos de carbono. En la actualidad, *P. ureae* es la única especie que ha sido transferida formalmente al género *Actinobacillus* como *Actinobacillus ureae*.⁹²¹

A. ureae es un comensal infrecuente del aparato respiratorio humano y pocas veces aislado en varios tipos de infecciones humanas, como bacteriemia, endocarditis, meningitis, infección de médula ósea, rinitis atrófica, bronquitis, neumonía, conjuntivitis, otitis media y peritonitis.^{71,131,149,156,691,943} En la mayoría de los casos se presenta un trastorno subyacente o predisponente, como infección posquirúrgica, diabetes, enfermedad periodontal, enfisema y cirrosis alcohólica. Los casos de meningitis se han asociado con traumatismo de cráneo previo (ataque, cirugía craneal) y con una enfermedad subyacente, que incluye la infección por HIV.^{661,691}

A. urea es un bacilo gramnegativo pleomorfo; en la tinción, algunas cepas forman filamentos característicos. Después de 24 horas de crecimiento en agar sangre en una atmósfera enriquecida con CO₂, las colonias son lisas, tienen 1 mm de diámetro y son no hemolíticas. Algunas cepas pueden parecer mucoides. El microorganismo es oxidasa positivo y catalasa positivo, reduce nitrato a nitrito, no crece en agar de MacConkey e hidroliza rápidamente la urea. No se produce indol y las reacciones de descarboxilasa e hihidrolasa son negativas. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y manitol; no se produce ácido a partir de lactosa y xilosa. Las otras especies de *Actinobacillus* bioquímicamente similares pueden ser diferenciadas de *A. ureae* por la producción de ácido a partir de otros hidratos de carbono (p. ej., lactosa y xilosa) y por las capacidades de las primeras especies para crecer en agar de MacConkey (cuadros 9-3 y 9-4). Se han utilizado métodos moleculares para el diagnóstico de la meningitis por *A. ureae*.¹³⁷³ Las cepas de *A. ureae* son sensibles a la mayoría de los antibióticos, como penicilina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y a los aminoglucósidos.

Actinobacillus hominis

A. hominis es un microorganismo que con poca frecuencia se aísla en humanos en muestras de esputo de individuos con

enfermedad pulmonar crónica y en líquido de empiema.⁴⁴¹ Wust y cols. comunicaron sobre dos pacientes con insuficiencia hepática, una debida a infección crónica por hepatitis B y la otra a cirrosis alcohólica, en los cuales ocurrió una septicemia por *A. hominis* como evento terminal de su enfermedad.¹⁴⁰⁰ En un estudio llevado a cabo en Copenhague en 36 pacientes con infección de las vías respiratorias bajas, bacteriemia por *A. hominis* o ambos, el alcoholismo crónico, la enfermedad cardiovascular, la drogadicción, los trastornos psiquiátricos crónicos y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica fueron factores predisponentes frecuentes.⁴⁴² En el cuadro 9-2 se incluyen las características para la identificación.

Especies animales en el género *Actinobacillus*

Los miembros del género *Actinobacillus* y sus asociaciones con animales son *A. lignieresii* (caballos), *A. equuli* (subespecie *equuli* y *haemolyticus*) (principalmente caballos), *A. suis* (cerdos), *A. capsulatus* (conejos), *A. maris* (ratones), *A. seminis* (ovejas, carneros), *A. delphinicola* (mamíferos marinos), *A. scotiae* (marsopas), *A. succinogenes* (rumen bovino) y *A. arthritis* (caballos).^{38,250,251,424,426,508,1194} *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *A. rossii*, *A. minor*, *A. porcineus* y *A. indolicus* se encuentran en el aparato respiratorio de cerdos.^{884,1194} También se incluye en este grupo otros taxones sin nombres aislados rara vez (los taxones 5 y 8 de Bisgaard y *Actinobacillus* genomoespecie 2 [antes ciertas cepas del taxón 9 de Bisgaard]). *A. lignieresii* causa infecciones granulomatosas en la cavidad bucal y el tubo digestivo del ganado vacuno e infecciones neumónicas y cutáneas en ovejas y otros ungulados. *A. equuli* produce bacteriemia, peritonitis, nefritis, osteomielitis y artritis en caballos y cerdos, y tanto infecciones localizadas como sistémicas en monos, terneros, perros y conejos. *A. suis* causa septicemia, neumonía y artritis en cerdos y caballos.⁹⁹⁷ *A. capsulatus* causa artritis en conejos y *A. pleuropneumoniae* es un agente importante que produce neumonía altamente contagiosa en cerdos. *A. muris* se encuentra en el aparato genital de los ratones. *A. rossii* se halla en la vagina de pueras parturientas y en sus crías abortadas, y *A. seminis* es una causa de epididimitis y esterilidad en ovejas.¹¹⁹⁴ Las infecciones humanas por especies animales de *Actinobacillus* suelen ocurrir como resultado de un traumatismo relacionado con animales. *A. lignieresii*, *A. equuli* y *A. suis* han sido recuperados de muestras clínicas humanas, que incluyen heridas por mordeduras de caballos y ovejas, líquido articular, sangre y esputo.^{64,109,385,997} Ashhurst-Smith y cols. comunicaron un caso de bacteriemia y sepsis por *A. equuli* en un carnicero después de que sufriera un corte con un cuchillo en el trabajo.⁶⁴ Aunque este paciente tenía una válvula mitral protésica colocada, la endocarditis no fue una complicación. Las especies restantes de *Actinobacillus* no han sido aisladas de muestras clínicas humanas. En el cuadro 9-4 se presentan las características para la identificación de las especies de *Actinobacillus*.

Especies de *Pasteurella* y *Mannheimia*

Taxonomía y características del género *Pasteurella*

Las especies de *Pasteurella* son miembros de la familia *Pasteurellaceae* (véase cuadro 9-1).^{205,331,425,975} En la actualidad, la estructura taxonómica de esa familia es complicada y poco clara, y los taxonomistas están intentando revelar las relaciones entre los miembros de los géneros descritos y la asignación correcta de distintas especies a estos géneros.^{38,254,313,331} La deli-

Cuadro 9-4 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Actinobacillus* de origen animal

ESPECIE	HEMÓLISIS, SBA	OXIDASA	CATALASA	CRECIMIENTO, AGAR DE MACCONKEY		REDUCCIÓN DE NITRATO	INDOL	UREASA	ODC	FOSFATASA	ONPG	REQUERIMIENTO DE FACTOR V			
<i>A. lignieresii</i>	—	V+	V	V		+	—	+	—	+	V	—			
<i>A. equuli</i> subespecie <i>equuli</i>	—	v/+ ^d	+/+ ^d	V		+	—	+	—	ND	+	ND			
<i>A. equuli</i> subespecie <i>haemolyticus</i>	+	+	+	V		+	—	+	—	ND	+	ND			
<i>A. arthritis</i>	—	+	+	V		+	—	+	—	+	+	—			
<i>A. suis</i>	+	V+	V	V		+	—	+	—	+	V+	—			
<i>A. capsulatus</i>	—	+	+	+		+	—	+	—	+	+	—			
<i>A. maris</i>	—	+	+	—		+	—	+	—	—	—	—			
<i>A. pleuropneumoniae</i>	+	V	V	—		+	—	+	—	+	+	+			
<i>A. rossii</i>	V	+	+	V+		+	—	+	—	+	V+	—			
<i>A. seminis</i>	—	V	+	—		+	—	—	V	—	—	—			
<i>A. delphinicola</i>	—	+	—	—		+	—	—	V	+	—	—			
<i>A. scotiae</i>	—	+	—	—		+	—	+	V	ND	+	—			
<i>A. succinogenes</i>	—	+	+	ND		+	—	—	ND	+	ND	—			
<i>A. minor</i>	—	ND	—	ND		+	—	+	—	ND	+	+			
<i>A. porcinus</i>	—	ND	—	ND		+	—	—	—	ND	+	+			
<i>A. indolicus</i>	—	ND	+	ND		+	+	—	—	ND	+	+			
ESPECIE	GLU	MAL	SAC	LAC	XIL	MNTL	TRE	MAN	ARAB	SORB	GAL	INOS	RAF	MEL	SAL
<i>A. lignieresii</i>	+	+	+	V	+	+	—	+	V-	V	+	—	V	—	—
<i>A. equuli</i> subespecie <i>equuli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	V-	V	V	—	+	+	—
<i>A. equuli</i> subespecie <i>haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	V-	V	V	—	+	+	—
<i>A. arthritis</i>	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND	V	+	ND	+	+	ND	ND
<i>A. suis</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	V+	—	V+	—	+	+	+
<i>A. capsulatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
<i>A. maris</i>	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	V ^{d+}	V ^{d+}	+	+ ^d	+
<i>A. pleuropneumoniae</i>	+	+	+	V	+	+	—	+	—	—	+ ^d	—	V	—	—
<i>A. rossii</i>	+	V-	—	V	+	+	—	V	+	+	+	+	V	—	—
<i>A. seminis</i>	+	V	—	—	—	V	—	—	V	—	V	V	—	—	—
<i>A. delphinicola</i>	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. scotiae</i>	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	V	—	—	—	—
<i>A. succinogenes</i>	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+
<i>A. minor</i>	+	+	+	+	ND	—	ND	+	—	—	ND	—	+	ND	ND
<i>A. porcinus</i>	+	V	V	V	ND	V	ND	V	V	V	ND	V	V	ND	ND
<i>A. indolicus</i>	+	+	+	V	ND	—	ND	+	—	—	+	—	+	ND	ND

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; V+: variable, pero la mayoría de las cepas son positivas; V-: variable, pero la mayoría de las cepas son negativas.
^d: reacción positiva débil; Vd+: variable, pero la mayoría de las cepas son débilmente positivas; Glu: glucosa; Mal: maltosa; Sac: sacarosa; Lac: lactosa; Xil: xilosa; Mntil: manitol; Tre: trehalosa; Man: manosa; Arab: arabinosa; Sorb: sorbitol; Gal: galactosa; Inos: inositol; Raf: rafinosa; Mel: melibiosa; Sal: salicilina; SBA: agar sangre de carnero.

neación de estos géneros se basaba sobre estudios de hibridación de DNA y las especies que mostraban una homología mayor del 50% eran incluidas en el mismo género con poco respeto por su origen filogenético y la caracterización fenotípica.^{918,919,920,1197} Desde 1985, nuevas especies dentro de la familia *Pasteurellaceae* han sido asignadas al género *Actinobacillus* o al género *Pasteurella* en forma más o menos arbitraria. El examen de las secuencias de rRNA 16S ha mostrado que las especies “más viejas” de *Pasteurella* –*P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. ureae* y “grupo *P. haemolytica*”– no están estrechamente relacionadas con la especie tipo de *Pasteurella* (*P. multocida sensu stricto*) o entre sí y probablemente pertenecen al género *Actinobacillus* o a nuevos géneros.^{331,918,1194} La reestructuración formal de la familia comenzó en 1986, cuando *P. ureae* fue reasignado al género *Actinobacillus* como *A. ureae*.⁹²¹ En 1999, los miembros del “grupo *P. haemolytica*” (incluidos *P. haemolytica sensu stricto* y *P. granulomatis*) fueron colocados en el nuevo género *Mannheimia* o reclasificados como la especie previamente descrita *P. trehalosi*.³⁸ Estos estudios también condujeron a la transferencia de *Haemophilus pleuropneumoniae* al género *Actinobacillus* como *A. pleuropneumoniae* y a la transferencia de “*Haemophilus avium*” y otras cepas no clasificadas dependientes del factor V al género *Pasteurella* (*P. avium*, *P. volantium*).^{919,1019} Al igual que *P. aerogenes* y *P. pneumotropica*, “especies” como *P. caballi* y *P. bettyae* también tienen una condición taxonómica indeterminada.

Los miembros del género *Pasteurella* comparten algunas características fenotípicas.^{205,918-920} Las especies de *Pasteurella* son cocobacilos o bacilos anaerobios facultativos, gramnegativos e inmóviles. La mayoría de las especies son oxidasas positivas, catalasa positivas y fosfatasa alcalina positivas y reducen el nitrato a nitrito. También producen ácido a partir de glucosa, fructosa, manosa y sacarosa y ninguna de ellas hidroliza el almidón o la salicina. Todas tienen ácidos grasos similares en la pared celular, que son fundamentalmente C_{16:1w7c}, C_{16:0} y C_{14:0}.⁹⁹ Por lo general, todas las especies son sensibles a penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas. Es difícil distinguir fenotípicamente a los miembros del género *Pasteurella* y a especies de *Actinobacillus* asociados con animales.⁹²⁰ Al igual que las pasteurelas, las especies animales de *Actinobacillus* son característicamente cocobacilos gramnegativos oxidasas positivos y catalasa positivos que reducen nitrato a nitrito. Varios miembros de ambos géneros también producen ureasa. En el recuadro 9-8 se describen los hábitats y la importancia clínica de las especies de *Pasteurella* y *Mannheimia* y en el cuadro 9-5 y el cuadro 9-6, respectivamente, las características bioquímicas útiles para su identificación. Esta explicación se limitará a los microorganismos asociados con enfermedad humana.

Pasteurella multocida

IMPORTANCIA CLÍNICA Y VIRULENCIA

P. multocida es la especie de *Pasteurella* que más se aísla de muestras humanas; también se recupera de una amplia variedad de animales. El microorganismo puede cultivarse de las cavidades bucales de gatos (70-90%) y perros (40-66%) domésticos sanos, y también se encuentra en muchos otros animales, como ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, aves de corral, roedores, conejos, monos, leones, panteras, lince, aves, renos y búfalos.¹²⁵⁰ En algunos animales, causa infecciones graves, que incluyen fiebre de transporte y septicemia hemorrágica en ganado vacuno, cólera en aves de corral, rinitis atrófica en cerdos y pleuritis, neumonía, formación de abscesos, rinitis crónica, otitis media y septicemia en conejos de laboratorio. La mayoría de las infecciones humanas son de heridas y celulitis

asociadas con mordeduras y arañazos de gato. En ocasiones, se halla *P. multocida* en la nasofaringe de individuos sanos que tienen una exposición frecuente a los animales. Los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo aquellos con enfermedades hepáticas (p. ej., cirrosis), tumores sólidos o procesos malignos hematológicos, pueden tener bacteriemia por este microorganismo por infecciones localizadas (p. ej., heridas por mordeduras) y la bacteriemia puede sembrar otros sitios y conducir a neumonía, meningitis u otras complicaciones. En el recuadro 9-9 se ofrece más información sobre el espectro clínico de *P. multocida*.

Se han investigado los factores de virulencia fundamentalmente con cepas de *P. multocida* que se asocian con enfermedades de importancia económica en animales, como la rinitis atrófica en los cerdos. Algunas cepas son encapsuladas y se describieron cinco grupos capsulares, designados A, B, D, E y F. Estos grupos capsulares pueden ser divididos en los serotipos somáticos 1 a 16.¹²⁸⁶ La mayoría de las cepas *P. multocida* aisladas en humanos pertenecen al grupo capsular A y, en menor grado, al grupo D. Las cepas de *P. multocida* que causan rinitis atrófica producen una toxina dermonecrótica de 145 kDa que es un factor de virulencia esencial para el desarrollo de esta infección progresiva del aparato respiratorio.⁷⁷⁷ La producción de toxina se asocia fundamentalmente con los tipos capsulares A y D, y el gen de la toxina, *tox A*, se localiza en una región conservada del cromosoma de *P. multocida*. El análisis fenotípico y genotípico de cepas toxigénicas ha mostrado que estas cepas no son clonales y no pudieron hallarse diferencias importantes entre las cepas toxigénicas de origen porcino o humano cuando se las investigó mediante métodos bioquímicos, serológicos o de tipificación genómica.³⁴⁷ Se han creado métodos moleculares para la detección directa del gen *tox A* en cepas de *P. multocida* aisladas en animales.⁷⁷⁷ No se conoce el papel de la toxina dermonecrótica en la enfermedad humana. Las cepas clínicas de *P. multocida* también producen lipasas, que pueden ser factores de virulencia para este microorganismo.¹⁰²⁷

CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN

No es difícil aislar ni identificar a *P. multocida*, aunque el conocimiento del tipo de muestra y el antecedente de exposición a animales aumentan el índice de sospecha acerca de su presencia. *P. multocida* crece bien en agar chocolate y agar sangre de carnero y forma colonias grises suaves que tienen 0,5 y 2 mm después de 24 horas de incubación en CO₂ (véase lámina en color 9-5A y B). El microorganismo es no hemolítico y no crece en agar de MacConkey, agar eosina azul de metileno (EMB) u otros tipos de medios entéricos selectivos o diferenciales. Las cepas provenientes del aparato respiratorio pueden ser mucoides. Se observa a menudo un olor característico (similar a *E. coli*, pero más acre), tal vez por la formación de grandes cantidades de indol por el microorganismo. *P. multocida* es oxidasas positivo, catalasa positivo, ornitina descarboxilasa positivo, indol positivo y ureasa negativo. La prueba de indol en el sitio utilizando el reactivo *p*-aminocinnamaldehído suele ser fuertemente positiva (véase lámina en color 9-5C). Produce ácido, pero no gas, a partir de glucosa, sacarosa y manitol, pero no de maltosa o lactosa. Para las cepas típicas aisladas en focos probables, como la mordedura o el arañazo de un gato, la demostración de bacilos gramnegativos oxidasas positivos fuertemente indol positivos y que no crecen en agar de MacConkey suele ser suficiente para identificar a *P. multocida*. Las cepas de *P. multocida* pueden dividirse a su vez en tres subespecies

Recuadro 9-8 Especies de *Pasteurella* y *Mannheimia* reconocidas en la actualidad

Especie/subespecie	Hábitat e importancia clínica en los seres humanos
Especies de <i>Pasteurella</i>	
<i>P. multocida</i> subespecie <i>multocida</i>	Aparato respiratorio de los mamíferos no humanos; cepas clínicas de infecciones en seres humanos
<i>P. multocida</i> subespecie <i>septica</i>	Igual que el anterior
<i>P. multocida</i> subespecie <i>gallicida</i>	Igual que el anterior; también se asocia con cólera en aves de corral
<i>P. pneumotropica</i>	Aparato respiratorio de cobayos, ratas, hámsters, gatos y perros; pocas veces se aísla de seres humanos
<i>P. aerogenes</i>	Flora normal en el tubo digestivo de los cerdos; infección humana luego de la mordedura de un cerdo
<i>P. bettyae</i>	Abscesos humanos de glándula de Bartolino y de los dedos de las manos; puede asociarse con enfermedad ulcerosa genital; bacteriemia posparto; neumonía y derrame pleural en pacientes con SIDA
<i>P. dagmatis</i>	Aparato respiratorio de perros y gatos; heridas por mordeduras de animales e infecciones sistémicas en seres humanos
<i>P. canis</i>	Aparato respiratorio de perros y corderos; heridas por mordeduras de perros en seres humanos
<i>P. stomatis</i>	Aparato respiratorio de perros; infecciones de heridas por mordeduras de perros
<i>P. caballi</i>	Cepa equina que produce neumonía, infección de herida; se ha comunicado una única infección de herida humana
<i>P. gallinarum</i>	Aparato respiratorio de pollos y gallinas; dos casos comunicados de bacteriemia en seres humanos
<i>P. anatis</i>	Flora del tubo digestivo de patos
<i>P. langaaensis</i>	Flora del aparato respiratorio de pollos y otras aves de corral
<i>P. avium</i>	Flora del aparato respiratorio de aves de corral sanas
<i>P. lymphangitis</i>	Linfangitis bovina
<i>P. mairi</i>	Aborto espontáneo en marranas; sepsis en chanchitos
<i>P. testudinis</i>	Patógeno en algunas especies de tortugas del desierto
<i>P. trehalosi</i>	Septicemia en corderos adolescentes
<i>Pasteurella</i> sp. nueva especie 1	Flora de las vías respiratorias altas de perros y gatos; se asocia con heridas de mordeduras de perros y gatos; también se ha comunicado endocarditis humana
Especies de <i>Mannheimia</i>	
<i>M. haemolytica</i>	Infecciones neumónicas en el ganado vacuno; mastitis en las ovejas; septicemia en las cabras y en las ovejas; flora de las vías respiratorias altas de los rumiantes; se han comunicado raras infecciones humanas
<i>M. glucosida</i>	Flora de las vías respiratorias altas de ganado vacuno y ovejas
<i>M. granulomatis</i>	Enfermedad granulomatosa progresiva (paniculitis) en el ganado; bronconeumonía y conjuntivitis en especies leprinas y ciervos
<i>M. ruminalis</i>	Flora normal en el rumen de ovejas y ganado
<i>M. varigena</i>	Neumonía, mastitis y septicemia en ganado vacuno; también se encuentra como parte del aparato respiratorio, el rumen y la flora intestinal del ganado vacuno; la flora del aparato respiratorio de los cerdos; sepsis, enteritis y neumonía en cerdos

subespecies *multocida*, *septica* y *callicida*) sobre la base de la producción de ácido a partir de sorbitol y dulcitol (véase cuadro 9-5). Las cepas de *P. multocida* subespecie *multocida* también son α -glucosidasa negativas, mientras las cepas de la subespecie *septica* son α -glucosidasa positivas.⁶¹³ En realidad, las cepas de la subespecie *septica* aisladas en felinos pueden constituir una especie separada.⁷³⁷ La identificación de subespecies es de interés en el estudio de las cepas aisladas veterinarias pero no es particularmente relevante o importante en las cepas aisladas en humanos. Como sucede con muchos otros microorganismos, se describieron técnicas moleculares para la identificación de especies y subespecies.^{737,865}

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos indican que las cepas de *P. multocida* son ampliamente sensibles a distintos antibióticos in vitro. El microorganismo es sensible a penicilina, ampicilina, amoxicilina-clavulanato, penicilinas de amplio espectro (ticarcilina, piperacilina, mezlocilina), cefalosporinas de amplio espectro (es decir, cefotaxima, cefoperazona, cefuroxima, ceftazidima, ceftizoxima), tetraciclinas y cloranfeni-

col.^{476,899,944} Se ha observado menos actividad con las cefalosporinas de primera generación, como cefalotina y cefazolina, y con las penicilinas semisintéticas.^{476,944} Los aminoglucósidos tienen una actividad moderada a escasa contra las cepas de *P. multocida* in vitro y el microorganismo es resistente a vancomicina y clindamicina.⁴⁷⁷ Entre los macrólidos, azitromicina, claritromicina, roxitromicina y diritromicina tienen mayor actividad contra *P. multocida* que la eritromicina.⁴⁷⁷⁻⁴⁸⁰ Las cepas de *P. multocida* también son muy sensibles a las fluoroquinolonas y las oxazolidinonas, pero los datos clínicos que apoyan su eficacia como quimioterápicos son limitados.^{479,480} Las cepas animales de *P. multocida* a menudo son resistentes a tetraciclina debido a la presencia de un determinante de resistencia a la tetraciclina *tet(H)* asociado con transposones.⁵³⁸

Aunque los resultados de las pruebas de sensibilidad por difusión con discos para las cepas de *P. multocida* suelen correlacionarse con los obtenidos mediante técnicas de dilución en agar y caldo, se han observado discrepancias con aminoglucósidos y eritromicina. Con estos agentes, las pruebas de difusión con discos a menudo indican una mayor resistencia a estos fármacos que los procedimientos cuantitativos. A pesar de la sensibilidad in vitro de *P. multocida* a numerosos agentes, la expe-

Cuadro 9-5 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Pasteurella*

ESPECIES	HEMÓLISIS, SBA	OXIDASA	CATALASA	CRECIMIENTO, AGAR DE MACCONKEY	REDUCCIÓN DE NITRATO	INDOL	UREASA	ODC	FOSFATASA	ONPG	REQUERIMIENTO DE FACTOR V
<i>P. multocida</i> subespecie <i>multocida</i>	–	+	+	–	+	+	–	+	ND	–	–
<i>P. multocida</i> subespecie <i>septica</i>	–	+	+	–	+	+	–	+	ND	–	–
<i>P. multocida</i> subespecie <i>gallicida</i>	–	+	+	–	+	+	–	+	ND	–	–
<i>P.(A.) pneumotropica</i>	–	+	+	V	+	+	+	+	ND	–	–
<i>P.(A.) aerogenes</i>	–	+	+	+	+	–	+	V	ND	–	–
<i>P. bettyae</i>	–	V	–	V	+	+	–	–	+	–	–
<i>P. dagmatis</i>	–	+	+	–	+	+	+	–	+	–	–
<i>P. canis</i>	–	+	+	–	+	V	–	+	+	–	–
<i>P. stomatis</i>	–	+	+	–	+	+	–	–	+	–	–
<i>P. caballi</i>	–	+	–	–	+	–	–	V	+	+	–
<i>P. gallinarum</i>	–	+	+	–	+	–	–	–	+	–	–
<i>P. anatis</i>	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–
<i>P. langaaensis</i>	–	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
<i>P. avium</i>	–	+	+	–	+	–	–	–	+	–	+
<i>P. lymphangiditis</i>	–	–	+	V	–	–	+	–	+	–	–
<i>P. mairi</i>	V	+	V+	V	+	–	+	V+	+	V	–
<i>P. testudinis</i>	+	+	+	V	–	+	–	–	–	V+	–
<i>Pasteurella</i> , nueva especie 1	–	+	+	–	+	+	+	–	ND	ND	–
<i>Pasteurella</i> , especie A	–	+	+	–	ND	–	–	–	ND	ND	+
<i>Pasteurella</i> , especie B	–	+	+	–	ND	+	–	+	ND	ND	–

ESPECIES	GLU	MAL	SAC	LAC	XIL	MNTL	TRE	MAN	ARAB	SORB	GAL	INOS	RAF	DULC
<i>P. multocida</i> subespecie <i>multocida</i>	+	–	ND	– ^a	V	+	V	ND	–	+	+	ND	ND	–
<i>P. multocida</i> subespecie <i>septica</i>	+	–	ND	– ^a	+	+	+	ND	–	–	+	ND	ND	–
<i>P. multocida</i> subespecie <i>gallicida</i>	+	–	ND	– ^a	+	+	–	ND	V	+	+	ND	ND	+
<i>P.(A.) pneumotropica</i>	+	+	ND	V ^b	+ ^c	–	+	ND	–	–	+	ND	ND	
<i>P.(A.) aerogenes</i>	+ ^d	+	ND	V ^b	+ ^c	–	–	ND	–	–	ND	ND	ND	–
<i>P. bettyae</i>	+	V	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–
<i>P. dagmatis</i>	+	+	+	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+ ^d	ND
<i>P. canis</i>	+	–	+	–	V [–]	–	V	+	–	–	+	–	–	ND
<i>P. stomatis</i>	+	–	+	–	–	–	+	+	–	–	+	–	–	ND
<i>P. caballi</i>	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	ND
<i>P. gallinarum</i>	+	+	+	–	V	–	+	+	–	–	+	–	V ⁺	ND
<i>P. anatis</i>	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+ ^d	ND
<i>P. langaaensis</i>	+	–	+	+	–	+	+	+	–	–	+	–	–	ND
<i>P. avium</i>	+	–	–	V	V	–	–	+	–	–	+	–	–	ND
<i>P. lymphangiditis</i>	+	V	V	–	–	+	+	+	+	V	+	–	–	ND
<i>P. mairi</i>	+	V	+	V [–]	+	V ⁺	V [–]	+	+	V ⁺	+	V	–	ND
<i>P. testudinis</i>	+	V ⁺	+	V [–]	+	V	V	–	V	V	V ⁺	+	V	ND
<i>Pasteurella</i> nueva especie 1	+ ^e	+	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pasteurella</i> , especie A	+	V	ND	V ⁺	V	V	+	ND	+	–	ND	ND	–	ND
<i>Pasteurella</i> , especie B	+	+	ND	–	+	–	+	ND	–	–	ND	ND	–	ND

^aRaras cepas pueden ser lactosa positivas.
^bLa mayoría de las reacciones son negativas para los microorganismos indicados.
^cRaras cepas pueden ser xilosa negativas.
^dGas producido a partir de glucosa por la mayoría de las cepas.
^eAlgunas cepas forman pequeñas cantidades de gas a partir de hidratos de carbono.
 +: reacción positiva; –: reacción negativa; V: reacción variable; V⁺: reacción variable, la mayoría de las cepas son positivas; V[–]: reacción variable, la mayoría de las cepas son negativas; +^d: reacción positiva débil; ND: datos no disponibles; SBA: agar sangre de carnero; ODC: ornitina descarboxilasa; Glu: glucosa; Mal: maltosa; Sac: sacarosa; Lac: lactosa; Xil: xilosa; MntI: manitol; Man: manosa; Arab: arabinosa; Sorb: sorbitol; Gal: galactosa; Inos: inositol; Raf: rafinosa; Dulc: dulcitol.

Cuadro 9-6 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Mannheimia*

CARACTERÍSTICA	<i>M. HAEMOLYTICA</i>	<i>M. GLUCOSIDA</i> ^a	<i>M. GRANULOMATIS</i>	<i>M. RUMINALIS</i> ^b	<i>M. VARIGENA</i> ^c
Hemólisis, sangre bovina	β	β	—	—	β
Oxidasa	+ ⁻	+	+ ⁻	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+
Citrato	—	—	—	—	—
Motilidad	—	—	—	—	—
Ureasa	—	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—	V
Arginina dihidrolasa	—	—	—	—	—
Ornitina descarboxilasa	—	V ^d	—	—	+ ⁻
Gas a partir de glucosa	V	V	V	V	V
Ácido a partir de:					
Adonitol	—	—	—	—	—
Amigdalina	—	+	V	—	—
Arabinosa	—	V ^e	—	—	+
Arbutina	—	+	V	—	—
Celobiosa	—	+	V	—	—
Dextrina	+	+	V	V	V
Esculina	—	+	V	—	—
Gentabiosa	—	V ^f	V	—	—
Mesoinositol	V	+	V	—	V
Maltosa	+	+	V	V	V
Manitol	+	+	+	+	+
Manosa	—	—	—	—	—
Melibiosa	—	—	—	—	V
Salicina	—	+	V	—	—
Sorbitol	+	+	+	V	—
Trehalosa	—	—	—	—	—
Xilosa	+	+	V	V	+
β-glucosidasa	—	+	+	—	V
β-galactosidasa	V	+	V	+	V
β-xilosidasa	V	V	+ ⁻	—	V
β-fucosidasa	+	V	—	—	V
Fuente	Ganado, ovejas	Ovejas	Ovejas, ciervos	Ganado, ovejas ^g	Ganado, cerdos

^aDividido en 9 biovariedades, A–I^bDividido en 2 biovariedades, 1, 2.^cDividido en 2 biovariedades, 1, 2.^dBiovariedades A–E e I son positivas; biovariedades F, G y H son negativas.^eBiovariedades A, C, D, G e I son positivas; biovariedades B, E, F y H son negativas.^fBiovariedades A, B, D–H son positivas, biovariedades C e I son negativas.^g+ : reacción positiva; — : reacción negativa; V : reacción variable; + : mayoría de cepas positivas, raras cepas negativas; —* : mayoría de cepas negativas, raras cepas positivas.

riencia clínica con muchos de ellos es limitada y, por lo tanto, impide su recomendación para el tratamiento empírico. En la actualidad, la penicilina y las cefalosporinas parenterales de amplio espectro siguen siendo los agentes de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por *P. multocida*. La resistencia a la penicilina a través de la producción de β-lactamasas mediadas por plásmidos es bastante rara entre *P. multocida* y se comunicó por primera vez en cepas aisladas en animales.⁷⁹¹ En 1991, se aisló la primera cepa de *P. multocida* productora de β-lactamasa en un ser humano de una muestra respiratoria.¹⁰⁹³ Esta cepa era resistente a penicilina, ticarcilina, cefalotina, sulfamidas y tetraciclinas; el clavulanato y el sulbactam redujeron 64 veces las CIM para los fármacos β-lactámicos. Esta β-lactamasa fue caracterizada como tipo ROB-1 según las especificidades de sustrato y de inhibición y las determinaciones del punto isoelectrónico. En 2001, se aisló una cepa de *P. multocida* de origen humano que era resistente a la penicilina debido a la

producción de una β-lactamasa TEM-1 codificada por un plásmido de 4,3 Kb.⁹²²

Otras especies de *Pasteurella* aisladas de infecciones humanas **PASTEURELLA PNEUMOTROPICA** (“*ACTINOBACILLUS PNEUMOTROPICA*”)

P. pneumotropica es parte de la flora del aparato respiratorio de perros, gatos, ratas y ratones. En roedores de laboratorio, el microorganismo produce infecciones de las vías respiratorias bajas. Los seres humanos adquieren el microorganismo a través de la exposición traumática a animales, como mordeduras de perros y gatos. Las infecciones humanas atribuidas a *P. pneumotropica* incluyen meningitis, bacteriemia con shock, infecciones osteoarticulares, infección de heridas, celulitis e infección de las vías respiratorias altas.^{63,436,444,872,1083} También se documentó una neumonía intersticial bilateral debida a *P. pneumotropica* en un paciente de 27 años con SIDA que vivía

Recuadro 9-9 Espectro clínico de las infecciones humanas por *Pasteurella multocida***Infecciones de heridas y celulitis**

Las infecciones de heridas locales en los seres humanos se asocian con mordeduras de gatos, arañazos de gatos o mordeduras de perros. Estas infecciones se caracterizan por el rápido desarrollo de dolor, eritema, tumefacción, celulitis con formación de abscesos o no y secreción purulenta o serosanguinolenta en el sitio de la herida.¹³⁶⁶ Se presenta linfadenopatía regional en el 30-40% de los casos y pueden presentarse o no signos sistémicos de infección. Las complicaciones localizadas graves (p. ej., artritis séptica, osteomielitis) siguen más a menudo a las mordeduras de gatos, en que la herida puede ser profunda, forzada y traumática para los tejidos subyacentes. Como la mayoría de las heridas por mordeduras están sobre las manos, se suelen observar complicaciones óseas y articulares en estos sitios. También pueden desarrollarse infecciones graves de las heridas que requieren desbridamiento escisional (p. ej., fasciitis necrosante) en pacientes con enfermedades subyacentes como diabetes.^{531,1424} En ocasiones, este microorganismo se encuentra en heridas que no se asocian con mordeduras de animales o con una exposición obvia a ellos. También han ocurrido infecciones de heridas por *P. multocida* como resultado de la lamida de un perro o de un gato sobre heridas abiertas o parcialmente cicatrizadas.²⁷⁸ La bacteria ha sido aislada de úlceras por decúbito, de abscesos perioculares y de infecciones de heridas abdominales y ortopédicas posquirúrgicas.⁶¹⁵

Infecciones de huesos y articulaciones

Las infecciones de huesos y articulaciones son el resultado de la implantación de *P. multocida* en el hueso y los espacios articulares por una mordedura traumática (habitualmente de un gato), por la siembra hematógena de los espacios articulares o por la propagación continua desde una celulitis adyacente. La artritis séptica por *P. multocida* a menudo se asocia con enfermedad articular preexistente, artritis reumatoide y el uso de corticosteroides; las infecciones suelen ser más graves en los pacientes con enfermedades subyacentes (p. ej., cáncer, gota).^{191,402} La propagación hematógena de *P. multocida* puede también conducir a infección de las prótesis articulares.^{817,1249} Puede ocurrir una osteomielitis por la extensión directa de la infección del tejido blando por la inoculación traumática de microorganismos en el periostio óseo en el momento de la mordedura.

Infecciones del aparato respiratorio

P. multocida puede ser recuperado también de las vías respiratorias altas y bajas, donde puede existir como un comensal o como causa de epiglotitis, neumonía, empiema, absceso pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, bronquitis, sinusitis, amigdalitis y otitis media.^{160,470,786,864,974,1383} Los individuos con colonización por *P. multocida* del aparato respiratorio a menudo tienen antecedentes de exposición ocupacional o recreativa a los animales. La mayoría de los pacientes sintomáticos suelen tener cierto compromiso preexistente de las vías respiratorias altas o los pulmones (p. ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis o sinusitis crónica, bronquiectasis, carcinoma pulmonar, SIDA). Los síntomas de la neumonía por *P. multocida* incluyen un inicio insidioso o brusco con fiebre, malestar general, disnea y dolor torácico pleurítico. En la radiografía de tórax, la presentación más frecuente es la consolidación lobular, con afectación principal del lóbulo inferior. Las complicaciones incluyen el desarrollo de derrames pleurales y empiema. La infección de las vías respiratorias altas también puede tener presentaciones clínicas atípicas. Se comunicó un caso de amigdalitis por *P. multocida* en un paciente luego de la ingestión accidental de un cultivo de caldo de microorganismo y otro caso de amigdalitis en una mujer cuyo gato habitualmente lamía su cepillo de dientes.^{1045,1433}

Endocarditis

P. multocida puede ser una causa rara tanto de endocarditis de válvula natural como de válvula protésica.^{458,932,1318} Los pacientes no suelen tener antecedentes de cardiopatía subyacente o preexistente, aunque comúnmente se encuentra como antecedente la exposición a un gato o a un perro y una enfermedad subyacente (hepatitis, cirrosis). Con esta infección, se afecta la válvula aórtica más a menudo que la válvula mitral. La endocarditis debida a *P. multocida* suele ser subaguda en su presentación clínica, como lo indica un retraso de 1 semana a 4 meses del inicio de los síntomas al diagnóstico etiológico. El único caso de endocarditis de válvula protésica ocurrió en una mujer de 72 años con un implante de una válvula de Carpentier-Edwards por una estenosis aórtica 3 años antes del inicio de la enfermedad.⁹³² La paciente respondió a penicilina y ampicilina-sulbactam y no fue necesario el reemplazo valvular.

Infecciones del sistema nervioso central

Las infecciones del sistema nervioso central causadas por *P. multocida* han incluido meningitis, empiema subdural y absceso encefálico.^{147,499,760,1338} La presentación clínica de la meningitis por *P. multocida* es similar a la causada por otros agentes; el LCR es casi siempre purulento y se observan cocobacilos gramnegativos en las tinciones de Gram. Se han comunicado infecciones del SNC en individuos ancianos con enfermedades subyacentes y en lactantes. Los casos de meningitis en lactantes habitualmente se han asociado con la exposición atraumática a los animales. En un caso, un lactante de 7 meses con meningitis no tuvo ninguna exposición directa a un gato doméstico (p. ej., mordeduras, arañazos o lamidas), pero su hermano de 2 años, cuyas manos habían sido lamadas por el perro doméstico, a menudo reconfortaba al niño dejándolo que succionara sus dedos.¹³³⁸

Infecciones oculares

P. multocida ha sido aislado de raros casos de conjuntivitis, absceso peridural con celulitis, queratitis y endoftalmitis. Se diagnosticó una conjuntivitis purulenta en el propietario de un caballo que no recordaba haber recibido ninguna mordedura o arañazo del animal.¹²⁷¹ La queratitis por *P. multocida* y las úlceras corneales habitualmente ocurren luego de laceraciones corneales por arañazos de gatos o perros.¹²⁴¹ La endoftalmitis por *P. multocida* ha ocurrido luego de heridas penetrantes por arañazos de gato como una complicación posoperatoria inmediata o tardía de la cirugía de cataratas o de implante del cristalino.^{25,260} Esta infección puede conducir a la pérdida de la agudeza visual o a la necesidad de enucleación del ojo.

Recuadro 9-9 Espectro clínico de las infecciones humanas por *Pasteurella multocida* (cont.)**Sepsis y bacteriemia**

La sepsis y la bacteriemia por *P. multocida* pueden ocurrir por propagación del microorganismo desde una herida por mordedura localizada o pueden originarse en un sitio infectado en cualquier otra parte.¹⁰⁴³ En algunos casos, la herida inicial es tan inocua (p. ej., un rasguño menor que un perro produce con sus patas) que es ignorada hasta que aparecen signos y síntomas de sepsis. La bacteriemia ocurre predominantemente en casos de enfermedad hepática preexistente (p. ej., cirrosis) u otros trastornos subyacentes, como neoplasias sólidas, procesos malignos hematológicos, lupus eritematoso sistémico e infección por HIV.^{77,177,194,406,1043} Sin embargo, se ha observado una sepsis profunda debida a *P. multocida* luego de mordedura de animales en individuos que no tenían ninguna enfermedad subyacente.¹¹⁰⁸ En los pacientes con bacteriemia, la diseminación hematogena puede producir infección intraabdominal, meningitis, neumonía, artritis séptica, bursitis y osteomielitis vertebral.¹⁰⁴³ También se describió una sepsis biliar mortal por *P. multocida* en un paciente con cirrosis complicada por el desarrollo del síndrome de Waterhouse-Friderichsen.⁶¹⁹

Infecciones intraabdominales

P. multocida es una causa infrecuente de infecciones intraabdominales, como infecciones de heridas posquirúrgicas, peritonitis bacteriana espontánea, apendicitis, abscesos intraabdominales y abscesos esplénicos o hepáticos.^{485,594,1043,1251} Los pacientes en los cuales se desarrollan estas infecciones siempre tienen enfermedades subyacentes como cirrosis, tumores de órganos sólidos o procesos hematológicos malignos. Desde el punto de vista clínico, la peritonitis causada por *P. multocida* es similar a la causada por bacterias entéricas, con dolor abdominal, fiebre, hemorragia gastrointestinal e hipotensión. *P. multocida* es recuperado de líquido de paracentesis en cultivo, aunque las tinciones de Gram directas del líquido a menudo son negativas. Como la mayoría de los pacientes con peritonitis suelen tener bacteriemia simultánea, se cree que la siembra de la cavidad peritoneal es a través de la vía hematogena en la mayoría de los casos, aunque se ha comunicado una infección peritoneal asociada con endoscopia alta.⁷⁰¹ Aunque la mayoría de los casos de peritonitis se asocian con el contacto con animales, algunos pacientes no recuerdan o no han tenido ninguna exposición importante a gatos o perros.¹⁰³ La peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua causada por *P. multocida* es inusual pero ha sido comunicada.^{795,915} En algunos casos, el microorganismo fue introducido en la cavidad peritoneal por mordeduras o arañazos de gato sobre la tubuladura de diálisis peritoneal.^{662,991}

Infecciones obstétricas, ginecológicas y urinarias

En ocasiones, *P. multocida* coloniza los genitales externos femeninos, y produce infecciones ginecológicas o perinatales graves, que incluyen meningitis, en el recién nacido. Las infecciones del aparato genital femenino y neonatales han incluido infección difusa del aparato genital, absceso tuboovárico, absceso de la glándula de Bartolino, endometritis relacionada con dispositivos intrauterinos, infección intrauterina seguida por aborto séptico, corioamnionitis con sepsis neonatal, neumonía o meningitis.^{215,796,1073,1343} La mayoría de los pacientes tienen algún tipo de enfermedad subyacente o compromiso inmune, como traumatismo craneal previo, neurocirugía, cirrosis hepática, infección de heridas posoperatorias, carcinoma de cuello uterino y malformaciones congénitas del aparato genitourinario. También se describió sepsis puerperal, con el aislamiento del microorganismo de la sangre y la secreción endocervical en una mujer previamente sana con exposición no traumática al gato de la familia.¹³³⁶ En este caso, las “huellas digitales” mediante PCR probaron la identificación genotípica de las cepas clínicas aisladas de la paciente y de la cavidad bucal de su gato. Muy pocas infecciones urinarias pueden ser causadas por *P. multocida*. Estos casos se asocian más a menudo con gatos, y los pacientes suelen tener una anatomía urológica anormal como resultado de una cirugía.⁷⁹⁰

con varios perros.²⁹² Recientemente se informó una peritonitis por *P. pneumotropica* resultante de la contaminación de la tubuladura de diálisis por un hámster doméstico en un paciente en diálisis ambulatoria continua.¹⁹⁶ Las muestras que dieron cultivos positivos incluyeron secreción de heridas, fragmentos óseos, líquido articular, hisopados de fauces, orina, líquido pleural y sangre.

Después de 24 horas de incubación, las colonias de *P. pneumotropica* en agar sangre tienen un tamaño variable (0,5-1 mm de diámetro), son lisas, convexas y no hemolíticas. Son ureasa positivas, indol positivas y ornitina descarboxilasa positivas (véase cuadro 9-5). Las dos últimas pruebas de identificación ayudan a diferenciar *P. pneumotropica* de *A. ureae*, que es negativo para estas dos reacciones (véase cuadro 9-3). Algunas cepas de *P. pneumotropica* crecen en agar de MacConkey. La prueba de ureasa positiva y las reacciones diferenciales para maltosa y manitol ayudan a diferenciar este microorganismo de *P. multocida*.

Una “especie” que está estrechamente relacionada con *P. pneumotropica* recibió los nombres provisionarios de especies de *Pasteurella* nueva especie 1, *Pasteurella* “gas” o grupo SP.²⁰⁵ Esta especie fue aislada de mordeduras de animales, otras

muestras de seres humanos y muestras orofaríngeas de perros y gatos. Este microorganismo se asemeja a *P. pneumotropica* en las características de cultivo y las reacciones bioquímicas. Las colonias tienden a ser ligeramente más grandes que las de *P. pneumotropica* después de 24 horas de incubación. Al igual que *P. pneumotropica*, es indol positiva, ureasa positiva y maltosa positiva, pero puede diferenciarse por la falta de actividad de ornitina descarboxilasa y de producción de ácido a partir de xilosa. La ureasa, la ornitina descarboxilasa y la producción de ácido a partir de maltosa son útiles para diferenciar esta especie de *P. multocida*. Las cepas “similares a *P. pneumotropica*” ureasa negativas también han sido denominados especies de *Pasteurella* taxón 16.¹⁴⁰ Algunas cepas de *Pasteurella* “gas” producen pequeñas cantidades de gas a partir de glucosa y otros hidratos de carbono. Algunos miembros de este taxón más algunos otros microorganismos “similares a *P. pneumotropica*” han sido reclasificados como *P. dagmatis* (véase cuadro 9-5). Las cepas de *P. pneumotropica* habitualmente son sensibles a penicilina; ampicilina; cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación; piperacilina; tetraciclina; eritromicina; cloranfenicol y ciprofloxacina. La mayoría de las cepas son sensibles a los aminoglucósidos y a trimetoprim-sulfametoxazol.²⁹²

PASTEURELLA AEROGENES ("ACTINOBACILLUS AEROGENES")

P. aerogenes es parte de la flora orofaríngea e intestinal de los cerdos.⁸⁴² Algunas raras infecciones humanas han sido el resultado de mordeduras, heridas por ataques con los colmillos u otras exposiciones ocupacionales a cerdos y jabalíes.³⁶⁹ Este microorganismo también se asocia con abortos y mortinatos en animales, incluidos cerdos, perros y conejos. *P. aerogenes* fue aislado en los oídos y la faringe de un mortinato de 31 de gestación.¹²⁷⁴ También se lo aisló en los cultivos vaginales de la madre después del parto. En la investigación, los autores descubrieron que la mujer trabajaba como asistente en una granja de cerdos en Dinamarca. No se supo si el microorganismo infectó al feto por vía hematológica o por una infección ascendente del aparato genital. También se diagnosticó osteomielitis vertebral por *P. aerogenes* en un hombre inmunocompetente de 67 años que no tenía antecedentes de exposición a animales.¹⁰³⁹

P. aerogenes produce colonias lisas, convexas, circulares y no hemolíticas en agar sangre y también crece en agar de MacConkey. Es indol negativo y ureasa positivo; la mayoría de las cepas también producen ornitina descarboxilasa (véase cuadro 9-5). Como su nombre lo indica, esta especie es "aerógena", lo que sugiere que se produce gas a partir de glucosa durante la fermentación. Las cepas de *P. aerogenes* aisladas en heridas humanas han sido sensibles a ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, aminoglucósidos, ciprofloxacina y tetraciclina.³⁶⁹ Las cepas aisladas en los animales pueden ser resistentes a ampicilina y cefalotina debido a la producción de β -lactamasa y también son resistentes a menudo a las tetraciclina.

PASTEURELLA DAGMATIS

P. dagmatis es parte de la flora bucal de perros y gatos y se asocia con mordeduras y arañazos de estos animales. En una serie de 32 aislamientos provenientes de heridas por mordeduras de perro remitidas a un laboratorio de referencia de Australia, tres fueron identificados como *P. dagmatis*.⁹⁹⁶ De 159 cepas de *Pasteurella* remitidas a un laboratorio veterinario en Dinamarca, cinco fueron identificadas como *P. dagmatis*. Estas cepas fueron aisladas en un caso de celulitis (1), un absceso inguinal (1), un absceso faríngeo (1) y heridas por mordeduras de perro (2).⁵⁹² También se lo aisló en heridas producidas por mordedura de gato.¹⁴³⁰ El microorganismo es una causa rara de endocarditis y se han comunicado tres casos en la bibliografía.^{510,1095,1202} En una de estas comunicaciones, la endocarditis se complicó con osteomielitis vertebral.¹²⁰² Ésta era una paciente de 55 años que trabajaba en una agencia protectora de animales y había sufrido múltiples mordeduras y arañazos de gatos extraviados. También se documentó neumonía por *P. dagmatis* en una paciente de 54 años con carcinoma epidermoide de la faringe, en la que se aisló el microorganismo en cultivo puro de una muestra de esputo.¹⁰⁴⁷ La paciente mantenía una compañía estrecha con un perro como parte de un sistema de apoyo que le ofrecía su asistente social. También se observó una bacteriemia por *P. dagmatis* en un hombre de 50 años con historia prolongada de diabetes,⁹² que había sufrido una celulitis por *P. multocida* del dedo del pie con bacteriemia un año antes. En ese momento, la infección fue rastreada hasta su perro salchicha, que había lamido una ampolla abierta en el pie del paciente. En su segunda hospitalización, desarrolló *P. dagmatis* en los hemocultivos; nuevamente fue probable que la infección se debiera a las lamidas cariñosas de su terrier Yorkshire. Este microorganismo también produce peritonitis en pacientes que se encuentran en diálisis peritoneal ambulatoria

continua.¹³⁴⁷ Las cepas de *P. dagmatis* aisladas en infecciones humanas han sido sensibles a penicilina, ampicilina, ticarcilina, cefalosporinas y cefamicinas, aminoglucósidos, tetraciclina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol.^{392,1047,1202}

PASTEURELLA CANIS Y PASTEURELLA STOMATIS

Tanto *P. stomatis* como *P. canis* también han sido aislados en infecciones de heridas resultantes de mordeduras de perros.^{592,1025,1250} Las cepas de *P. canis* se dividen en dos biotipos: el biotipo 1 se encuentra en la cavidad bucal de los perros, mientras que el biotipo 2 ha sido aislado en terneros.⁷⁸ En el estudio llevado a cabo por Holst y cols., 28 de 159 cepas examinadas fueron identificadas como *P. canis*; todas eran de heridas por mordeduras de perro y pertenecían al biotipo 1.⁵⁹² Diez de las 159 cepas fueron identificadas como *P. stomatis*; ocho eran de heridas por mordeduras de perro y dos fueron por abscesos. En las ocho infecciones de heridas por *P. stomatis*, se aislaron simultáneamente *P. multocida* o *P. canis* con *P. stomatis*. La formación de abscesos y la osteomielitis debidas a *P. canis* también pueden ser complicaciones de la infección de heridas por mordeduras.⁵³⁹ *P. canis* y *P. stomatis* son sensibles a ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefalotina, cefotaxima, linezolid y aminoglucósidos, tetraciclina, piperacilina y fluoroquinolonas.^{478,479,480,593,1025} Las pruebas taxonómicas recientes sugieren que el nombre de *P. canis* es incorrecto y debe ser reclasificado como *P. multocida*.⁶⁶⁰

PASTEURELLA BETTYAE

P. bettyae (antes conocida como grupo HB-5 de los CDC y luego como *P. bettii*) ha sido aislada fundamentalmente en el aparato genitourinario y muestras relacionadas (vagina, cuello uterino, uretra y líquido amniótico).^{75,1194} En 1989, se identificó en Tennessee un conjunto de cinco pacientes con uretritis, enfermedad inflamatoria pelviana o abscesos de la glándula de Bartolino, en los cuales se aisló *P. bettyae* como agente etiológico. Este brote sugirió que el microorganismo puede ser un patógeno de transmisión sexual.⁷⁵ *P. bettyae* también puede ser asociado con enfermedad ulcerosa genital. En un estudio llevado a cabo en Ruanda, se aisló el microorganismo en 25 (3,6%) de 675 pacientes (204 mujeres y 471 hombres) con enfermedad ulcerosa genital, pero sólo en uno de 983 pacientes sin esa enfermedad.¹⁵⁰ De 145 hombres con secreción uretral pero sin úlceras genitales, fue aislado sólo de uno. En 1996, fue aislado en los hemocultivos de una mujer de 25 años con bacteriemia periparto y como causa de neumonía y derrame pleural fatales en un hombre de 40 años con infección por HIV.^{896,1168}

P. bettyae es un cocobacilo gramnegativo que crece tanto en agar sangre como en agar chocolate; la capacidad para crecer en agar de MacConkey es variable. Después de 24 horas de incubación en un medio enriquecido con CO₂, las colonias son puntiformes, no hemolíticas, lisas y blancas. El microorganismo es oxidasa variable o tardía, aunque se suelen obtener resultados positivos con el reactivo de tetrametilfenileno diamina. La reacción de catalasa es negativa. El nitrato es reducido a nitrito, pero no a gas y no se produce ureasa. Se forma ácido a partir de glucosa (junto con gas) y, en ocasiones, maltosa y manosa, pero no a partir de maltosa, sacarosa, lactosa, manitol y xilosa (véase cuadro 9-5). El microorganismo produce indol después de una incubación de toda la noche en caldo de triptófano; la cantidad de indol formada puede ser pequeña, de modo que a menudo se necesita la extracción de xileno del caldo y el uso del reactivo de indol de Ehrlich para su detección.

En general, las cepas de *P. bettyae* son sensibles a ampicilina, cefalosporinas, aztreonam, imipenem, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol y son resistentes a eritromicina, clindamicina, vancomicina y tetraciclina. Los cinco aislamientos del grupo de Tennessee fueron sensibles a la ampicilina, mientras que 7 de los 24 aislamientos evaluados en el estudio de Ruanda fueron resistentes a la ampicilina y produjeron β -lactamasa.^{75,150}

PASTEURELLA CABALLI

P. caballi es un habitante de las vías respiratorias altas de los caballos. También ha sido aislado en cultivo puro, mixto o ambos de infecciones equinas como endocarditis, neumonía, peritonitis, heridas, abscesos e infecciones del aparato genital.^{256,1144} Los casos documentados de infección humana por *P. caballi* incluyen una lesión supurada similar a un panadizo de un dedo de la mano que ocurrió sin ninguna lesión traumática previa en un veterinario de 28 años que trabajaba con caballos y ponis y una infección cutánea de una herida por mordedura de caballo en un hombre de 56 años.^{139,387} Las cepas de *P. caballi* son muy sensibles a los antibióticos; sin embargo, algunas son resistentes a lincomicina, estreptomycin y sulfamidas y tienen una sensibilidad intermedia a penicilina G.¹¹⁴⁴ La cepa aislada en el veterinario era sensible a todos los antibióticos excepto a la penicilina y las sulfamidas.¹³⁹

PASTEURELLA GALLINARUM

P. gallinarum es un cocobacilo gramnegativo que habita en el aparato respiratorio de las aves de corral domésticas. La primera comunicación de una infección humana apareció en 1995, cuando el microorganismo fue aislado en los hemocultivos de un varón de 12 años de Arabia Saudita que sufrió una endocarditis 10 años después de la reparación quirúrgica de una comunicación interventricular.¹⁵ La cepa era sensible a penicilina, ampicilina y cefotaxima, y el paciente respondió a 6 semanas de tratamiento con los dos últimos agentes. El paciente no refirió ninguna mordedura, arañazo ni contacto con animales. La segunda comunicación apareció en 1999 en Japón, cuando se aisló *P. gallinarum* en los hemocultivos de un hombre de 34 años con gastroenteritis aguda.⁴⁷ Esta cepa era sensible a ampicilina, cefazolina, cefotaxima, azitromicina, imipenem, norfloxacina y aminoglucósidos, y el paciente respondió al tratamiento con cefazolina. La gastroenteritis se produjo 2 días después de que el paciente comiera pollo en un restorán y los autores sugirieron que esta comida puede haber sido la fuente. Sin embargo, esta cepa puede haber sido mal identificado.⁴³⁷ En 2002, se aisló *P. gallinarum* en la sangre, orina y LCR de un recién nacido de 4 días como resultado de un parto séptico en el hogar.³ El microorganismo era sensible a penicilina, cefotaxima y aminoglucósidos.

Las características bioquímicas de *P. bettyae*, *P. dagmatis*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. caballi* y *P. gallinarum* se presentan en el cuadro 9-4 junto con las de otras pasteurelas animales.

Especies de *Mannheimia* (antes complejo "*Pasteurella haemolytica*/*Pasteurella granulomatis*")

Las cepas de *P. haemolytica* son reconocidas como patógenos importantes en los animales domésticos, y causan enfermedades graves y pérdidas económicas considerables en el ganado vacuno, ovejas, cerdos e industrias avícolas. Históricamente, las cepas de *P. haemolytica* eran divididas en dos biotipos designa-

dos A (asociado con ganado vacuno) y T (asociado con ovejas).²⁰⁵ Las cepas biotipo A producían ácido a partir de arabinosa pero no de trehalosa, mientras que las cepas biotipo B producían ácido a partir de trehalosa pero no de arabinosa. Cada uno de estos biotipos fue dividido en 17 serotipos; y los serotipos 1, 2, 5-9, 11-14, 16 y 17 pertenecían al biotipo A y los serotipos 3, 4, 10 y 15 pertenecían al biotipo T. En 1985, *P. haemolytica sensu stricto* fue excluida del género *Pasteurella* sobre la base de estudios de hibridación de DNA-DNA y la hibridación de DNA-rRNA confirmó su exclusión de los géneros *Pasteurella*, *Haemophilus* y *Actinobacillus*.⁹¹⁸ Algunas investigaciones genotípicas de cepas de "*P. haemolytica*" trehalosa positivas (biotipo T) han conducido a su reclasificación como *Pasteurella trehalosi*, aun cuando muestran una afinidad genética marginal con el género *Pasteurella*.¹¹⁹⁴ Los exámenes de muchas cepas diversas de "*P. haemolytica*" trehalosa negativas (biotipo A) por criterios fenotípicos, electroforesis enzimática multilocus, ribotipificación y secuenciación de rRNA 16S condujeron a proponer un género nuevo, *Mannheimia*, para encuadrar a las cepas trehalosa negativas del complejo "*P. haemolytica*" y "*P. granulomatis*".^{304,1069} Sobre la base de la secuenciación de rRNA 16S, se han establecido cuatro grupos relacionados distintos que corresponden a cinco especies nuevas en el género nuevo *Mannheimia*: *M. haemolytica* y *M. glucosida* (grupo I), *M. ruminalis* (grupo II), *M. granulomatis* (grupo III) y *M. varigena* (grupo IV).³⁸ Estas especies nuevas están más estrechamente relacionadas con el género *Actinobacillus* (sobre todo *A. lignieresii*) y "*P. trehalosi*". Las especies de *Mannheimia* pueden ser separadas del género *Pasteurella* porque las especies anteriores no producían ácido a partir de manosa y porque la mayoría de las especies de *Actinobacillus* asociadas con animales eran ureasa negativas. Las especies de *Mannheimia* son manitol positivas, lo que las separa de las especies del género *Haemophilus*, que son manitol negativas. Las características bioquímicas del género *Mannheimia* y de las especies de *Mannheimia* se presentan en los cuadros 9-1 y 9-6, respectivamente.

Las cepas de *M. haemolytica* son bien reconocidas como agente etiológico de la pasteurelosis neumónica bovina o "fiebre del transporte" y otras distintas infecciones del ganado vacuno, ovejas, cerdos y liebres.³⁷ En el ganado vacuno, esta infección es desencadenada por el hacinamiento, el estrés, la inmunosupresión y la infección viral simultánea del aparato respiratorio. Las cepas de *M. haemolytica* aisladas del ganado vacuno con pasteurelosis neumónica producen una leucotoxina que es específica de especie y tiene actividad citolítica contra las células linfoides de los rumiantes.^{570,571} La leucotoxina es una proteína de 105 a 108 kDa que pertenece a la familia de las toxinas RTX, que también incluye la hemolisina de *E. coli*, la adenilato ciclasa/hemolisina de *B. pertussis* y la toxina Apx de *A. pleuropneumoniae*.¹¹¹⁴ RTX (repeticiones en la toxina) se refiere a la presencia de unidades repetidas ricas en glicina características en el término C de la molécula peptídica. En bajas concentraciones, la leucotoxina de *M. haemolytica* activa los neutrófilos, induce la formación de citocinas inflamatorias y provoca cambios en el citoesqueleto que conducen a la apoptosis.¹²²² En concentraciones más altas, la toxina produce la formación de poros en las membranas celulares que conducen a tumefacción celular y lisis. In vitro, la leucotoxina provoca cambios citopáticos en los alvéolos bovinos, donde se asocia con las membranas de los macrófagos y los neutrófilos en degeneración. Los mutantes de *M. haemolytica* leucotoxina negativos muestran una reducción importante de la virulencia en los modelos animales en comparación con las cepas productoras de leucotoxina.¹²⁶⁴

Los miembros del ex complejo "*P. haemolytica*" se aíslan pocas veces en seres humanos y las infecciones casi siempre son el resultado de la exposición ocupacional o recreativa a los animales. Rivera y cols. comunicaron un caso de infección de un injerto aórtico debida tanto a "*P. haemolytica*" biotipo A (*M. haemolytica*) como a estreptococos β -hemolíticos del grupo C en un hombre de 50 años.¹⁰⁷⁶ Yaneza y cols. informaron de un caso de endocarditis causada por este microorganismo.¹⁴¹⁵ El paciente no había tenido contacto con ganado vacuno ni otros animales de granja. Las cepas de *M. haemolytica* aisladas son sensibles a penicilina, ampicilina, amoxicilina-clavulanato, macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina), cloranfenicol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas y resistentes al linezolid.⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰

Cardiobacterium hominis

Taxonomía

C. hominis es la única especie del género *Cardiobacterium*. Este microorganismo, originariamente descrito como grupo IID de los CDC, fue denominado *Cardiobacterium hominis* por Slotnick y Dougherty en 1964.¹¹⁹⁰ Estos investigadores demostraron sus características bioquímicas singulares y su falta de relación antigénica con otras bacterias gramnegativas y grampositivas con requerimientos nutricionales especiales. El microorganismo tiene la pared celular típica de los gramnegativos con una capa externa extraordinariamente densa y casquetes terminal y polar en penacho adheridos a la membrana celular.¹⁰⁶⁷ Estas características explican su aspecto atípico en la tinción de Gram (véase más adelante). En 1990, Dewhirst y cols. examinaron cepas de *Cardiobacterium* mediante análisis de secuencia de rRNA de 16S y observaron que este microorganismo y *Kingella indologenes* estaban estrechamente relacionados y diferían significativamente de las cepas de referencia de otros microorganismos con requerimientos nutricionales especiales.³³⁰ Estos autores propusieron la familia *Cardiobacteriaceae* para incluir *C. hominis*, *Kingella indologenes* y el microorganismo relacionado del suelo *Dichelobacter nodosus*. Las similitudes fenotípicas también apoyaron la relación genética de *C. hominis* y *K. indologenes*.¹⁸⁶ Este último fue eliminado de la familia *Neisseriaceae*, su nombre se cambió por *Suttonella indologenes* y fue colocado en la familia *Cardiobacteriaceae* junto con las especies de *Cardiobacterium* y de *Dichelobacter*.³³⁰ Las cardiobacterias pertenecen al orden propuesto "Cardiobacteriales" en la subdivisión γ de las proteobacterias⁴⁵⁵ (véase más adelante).

Importancia clínica

C. hominis es un microorganismo de muy baja incidencia y tiene la característica singular de producir endocarditis casi exclusivamente; se han publicado alrededor de 50 casos de endocarditis.^{295,1397} El microorganismo es parte de la flora del aparato respiratorio normal, pero pocas veces se observa en muestras respiratorias debido a su baja tasa de crecimiento. Como sucede con otros microorganismos HACEK, *C. hominis* entra en el torrente circulatorio y suele infectar las válvulas cardíacas que ya estaban enfermas o dañadas (p. ej., cardiopatía reumática, comunicaciones interventriculares). Sin embargo, la endocarditis por *C. hominis* también se puede desarrollar en individuos sin evidencia de cardiopatía previa. Alrededor del 20% de las infecciones por *C. hominis* comunicadas han afectado

distintos tipos de válvulas cardíacas protésicas; entre ellas, válvulas de tejido de homoinjerto aórtico, válvulas aórtica y mitral de xenoinjertos porcinos, válvulas aórtica y mitral mecánicas (válvulas de Starr-Edwards, Björk-Shiley y Carpentier-Edwards) y electrodos de marcapasos.^{45,949,1030,1265} En general, los pacientes son de edad mediana a ancianos y tienen una dentadura en mal estado o el antecedente de procedimientos dentales recientes. En la comunicación de un caso, se desarrolló una endocarditis de válvula protésica luego de una endoscopia gastrointestinal alta.¹⁰³⁰ La infección sigue una evolución muy subaguda, con inicio insidioso, fiebre leve y síntomas vagos que pueden persistir durante 7 a 9 meses antes de hacer un diagnóstico. En los que sufren una enfermedad de bajo grado y prolongada, se puede presentar esplenomegalia, hemorragias conjuntivales y lineales subungueales, hematuria y anemia. *C. hominis* tiende a formar vegetaciones grandes y friables sobre las válvulas cardíacas, de modo que las complicaciones más graves son embolia séptica, aneurismas micóticos e insuficiencia cardíaca congestiva.^{249,295,781,903} También puede ocurrir bacteriemia y sepsis por *C. hominis* sin endocarditis en pacientes inmunodeprimidos.¹⁰⁸⁹ El aislamiento de *C. hominis* de muestras distintas de los hemocultivos es raro. En 1983, Francioli y cols. diagnosticaron una meningitis por cardiobacterias en un paciente como complicación de la endocarditis y, en 1991, Rechtman y Nadler informaron sobre la recuperación de *C. hominis* junto con *Clostridium bifermentans* de un absceso abdominal y de la sangre de un hombre de 65 años con diabetes y adenocarcinoma agresivo de riñón y ciego.^{432,1052} En 1998, Nurnberger y cols. informaron de un caso de infección por *C. hominis* asentada en el electrodo auricular de un marcapasos sin afectación valvular que se complicó por una presunta osteomielitis vertebral hematógena; el microorganismo fue aislado en los hemocultivos pero no en la biopsia de las vértebras afectadas.⁹⁴⁹

Características de los cultivos e identificación

C. hominis puede crecer esencialmente en todos los medios de hemocultivo disponibles en el comercio. El microorganismo crece lentamente y no produce ningún cambio visible en el medio para hemocultivo (p. ej., hemólisis, formación de película, turbidez). Cuando la observación microscópica de los frascos de hemocultivo es negativa, se deben realizar subcultivos a ciegas en agar chocolate y agar sangre. En la comunicación reciente de un caso, el microorganismo fue aislado sólo después del día 10 de incubación de un subcultivo a ciegas.⁸⁰¹ Es posible que las tinciones de Gram de los frascos de hemocultivo no pongan en evidencia el microorganismo; la centrifugación a baja velocidad de una alícuota del medio para eliminar los eritrocitos seguida por la centrifugación a alta velocidad para aglomerar pequeñas cantidades de microorganismos puede ayudar a su visualización. En las tinciones de Gram, los microorganismos pueden aparecer como gramvariables, con una tendencia de las células a retener el colorante de violeta de gerciana (cristal violeta) en los polos. Las células individuales pueden aparecer tumefactas en uno o ambos extremos, lo que conduce a microorganismos con forma de lágrima, pesa y "chupachús". A menudo, las células adoptan agrupamientos similares a rosetas o se alinean en disposiciones de "cercas" en su orientación unas con otras (véase lámina en color 9-3D). La morfología de las células individuales depende del tipo de medio de cultivo utilizado; en los medios que contienen extracto de levadura, aparecen como bacilos gramnegativos uniformes con extremos redondeados.

En agar sangre y agar chocolate, *C. hominis* crece como colonias opacas, brillantes y muy pequeñas, generalmente después de 48 a 72 horas a 35 °C en CO₂ al 5-7% (véase lámina en color 9-3E). Algunas cepas también pueden producir una depresión en el agar luego de su incubación. No se observa ningún crecimiento en agar de MacConkey o en otros agares selectivos o diferenciales entéricos. *C. hominis* es oxidasa positivo y catalasa, nitrato y ureasa negativo. Las reacciones de reducción de oxidasa positiva y de catalasa negativa ayudan a diferenciarlo de *H. aphrophilus/paraphrophilus* y *A. actinomycetemcomitans*, pero son similares a las reacciones observadas para *Eikenella*, *Kingella* y *Suttonella*. La característica más útil para identificar a este microorganismo es la producción de indol. El caldo de triptona debe tener un inóculo importante (con un hisopo) y debe incubarse durante 48 horas. La extracción con xileno o cloroformo y el uso del reactivo de Ehrlich más que del reactivo de Kovac permite la detección de pequeñas cantidades del indol producido por este microorganismo. Es posible que el reactivo de indol en el sitio (*p*- amino cinnamaldehído) no pueda detectar confiablemente la producción de indol por *C. hominis*. Se puede detectar la producción de sulfuro de hidrógeno utilizando tiritas de acetato de plomo. *C. hominis* produce ácido a partir de glucosa, fructosa, sacarosa, manosa y sorbitol; la producción de ácido a partir de maltosa y manitol es variable y la mayoría de las cepas producen reacciones positivas. No se fermenta lactosa, xilosa, galactosa, trehalosa ni rafinosa. Desde el punto de vista fenotípico, *C. hominis* es muy similar a *S. indologenes* (cuadro 9-7).¹⁸⁶ También puede ser diferenciado de *S. indologenes*, *E. corrodens* y de las especies de *Kingella* mediante análisis de ácidos grasos celulares.¹³⁴⁴ Como sucede con otros agentes de endocarditis bacteriana, se han utilizado con éxito los métodos moleculares para la detección directa de *C. hominis* de muestras clínicas.^{903,939}

Sensibilidad a los antibióticos

Al igual que en otros miembros del grupo HACEK, las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son difíciles debido a los requerimientos nutricionales especiales del microorganismo y su ritmo de crecimiento lento. No se han establecido niveles de corte, medios óptimos ni requerimientos de incubación para *C. hominis* ni para otros microorganismos con estos requerimientos. En general, las cepas de *C. hominis* son sensibles a la mayoría de los antibióticos, como penicilina, ampicilina, cefalotina, cefalosporinas de tercera generación (cefixima, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima), imipenem, meropenem, fluoroquinolonas (ciprofloxacina, clinafloxacina, levofloxacina, ofloxacina y trovafloxacina), aminoglucósidos, cloranfenicol, rifampicina y tetraciclina.⁷³⁶ En general, los pacientes con endocarditis por *C. hominis* han sido tratados con penicilina sola o penicilina combinada con un aminoglucósido. También se han logrado curaciones con monoterapia con cefazolina y ciprofloxacina.^{249,1335} En la actualidad, el tratamiento recomendado incluye las cefalosporinas de tercera generación.¹³⁸² Las cepas resistentes a la penicilina y productoras de β-lactamasa son raras y han sido comunicadas dos veces. En 1994, se aisló una cepa productora de β-lactamasa de un caso de endocarditis en un hombre de 76 años.⁷⁶⁹ Esta cepa era sensible a tetraciclina, rifampicina, vancomicina e imipenem y resistente a eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, amoxicilina, ticarcilina, cefotaxima y piperacilina. El paciente respondió a vancomicina/rifampicina, seguida de amoxicilina-clavulanato. El segundo microorganismo productor de β-lactamasa fue aislado en una mujer de 66 años.⁸⁰¹ Este

era resistente a penicilina y ampicilina y sensible a amoxicilina-clavulanato, cefotaxima, ceftriaxona, gentamicina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol. Muchas cepas también son resistentes a vancomicina y eritromicina; este hecho es de cierta importancia, dado que estos agentes se utilizan a veces para la profilaxis dental de pacientes alérgicos a la penicilina.¹⁰²⁹ La mayoría de los pacientes que tienen una endocarditis de válvula nativa debida a *C. hominis* son tratados con éxito con antibióticos solos, aunque algunos pueden requerir resección valvular parcial o reemplazo valvular debido al compromiso hemodinámico, fenómenos embólicos, insuficiencia cardíaca progresiva o aneurismas micóticos.^{249,1265}

Eikenella corrodens

Taxonomía y virulencia

Originariamente, el género *Eikenella* (antes grupo HB-1 de los CDC) definía cepas consideradas facultativas de la especie anaerobia *Bacteroides corrodens*. Con posterioridad, se demostró que estos microorganismos eran fenotípica y genéticamente distintos. La especie anaerobia estricta fue denominada *Bacteroides ureolyticus* y los anaerobios facultativos fueron colocados en el género inespecífico nuevo *Eikenella* como *E. corrodens*. Una característica clave que separa las especies anaerobias de las especies facultativas es la actividad de ureasa, en que *B. urealyticus* anaerobio es ureasa positivo y *E. corrodens* es ureasa negativo. *B. ureolyticus* también es sensible a clindamicina y metronidazol, mientras que *E. corrodens* es resistente a estos agentes. Sobre la base de la secuencia del RNA ribosómico 16S y de la hibridación de rRNA-DNA, se demostró que *E. corrodens* está relacionado con especies de *Neisseria* y está incluido ahora en la familia enmendada *Neisseriaceae* en el orden propuesto "Neiseriales" en el subgrupo β de las proteobacterias.^{329,1100}

Se ha intentado definir los factores de virulencia de *E. corrodens*. En 1988, Yamazaki y cols. describieron una proteína similar a la lectina sobre la superficie de cepas de *E. corrodens* que funcionaba en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales de los surcos humanos e interactuaba con un receptor sobre la superficie de la célula epitelial que contiene galactosa.¹⁴¹⁴ Esta molécula también aglutinaba eritrocitos. La investigación reciente ha mostrado que *E. corrodens* expresa pili tipo 4 y muestra variación de fase que comprende la transición irreversible de las variantes con pili o sin pili.^{1328,1329} En medios agar, las variantes con pili forman colonias pequeñas con depresiones, mientras que las variantes sin pili producen colonias más grandes sin depresiones. La formación de los pili es controlada por el locus *pilA*, que incluye cuatro genes: *pilA1*, *pilA2*, *pilB* y *hagA*. Los loci *pilA1* y *pilA2* codifican las proteínas estructurales de los pili tipo IV, *pilB* codifica una proteína de ensamblado de los pili y *hagA* codifica una hemaglutinina.^{1328,1329} Las células con pili sintetizan y exportan las proteínas de los pili hacia la superficie celular, mientras que las variantes sin pili sintetizan pili pero no los exportan hacia la superficie celular. Además, las células con pili muestran "movimientos espasmódicos" y son capaces de sufrir transformación natural, mientras que las células sin pili carecen de estas características. *E. corrodens* también tiene un OMP principal con un peso molecular aparente de 33 a 42 kDa.⁸¹² Esta proteína puede desencadenar la liberación de enzimas lisosómicas por los macrófagos y puede estimular o deprimir la actividad de los macrófagos en forma dependiente de la dosis. Al igual que otras bacterias gramnegativas, *E. corrodens* tiene un

lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa que cumple actividades biológicas similares al LPS hallado en las bacterias entéricas.¹⁰³² Los antígenos de superficie de *E. corrodens* tienen reacciones cruzadas amplias con otros microorganismos, entre ellos *K. kingae*, *K. denitrificans* y *Moraxella bovis*.²³⁰

Importancia clínica

E. corrodens es parte de la flora normal de la boca y de las vías respiratorias altas. En la cavidad bucal puede desempeñar un papel en ciertos tipos de enfermedad periodontal. Suda y cols. observaron que la prevalencia más alta de *E. corrodens* en las muestras de placas subgingivales ocurría en pacientes jóvenes con enfermedad periodontal, mientras que la prevalencia era más baja en los individuos sin esa enfermedad.¹²³⁷ En las personas sanas, la prevalencia del microorganismo en las muestras gingivales profundas disminuyó con la edad del individuo. Entre los que tenían enfermedad periodontal, la prevalencia más alta se observó en los menores de 20 años con periodontitis juvenil, seguida de aquellos con periodontitis posjuvenil, periodontitis prepuberal, periodontitis rápidamente progresiva y periodontitis del adulto.¹²³⁷ Además de la enfermedad periodontal, *E. corrodens* puede desempeñar un papel en otras infecciones bucales, como gingivitis, abscesos periapicales e infecciones de los conductos radiculares.

E. corrodens ha sido aislado en distintas infecciones humanas,^{1043,1170} que incluyen infecciones oculares (p. ej., canaliculitis, celulitis periorbitaria, ulceraciones corneales, endoftalmitis, abscesos lagrimales), infecciones de cabeza y cuello (p. ej., sinusitis, otitis media, mastoiditis, absceso encefálico, empiema subdural/extradural, osteomielitis craneal, absceso submandibular), infecciones pleuropulmonares (p. ej., neumonía aspirativa, abscesos pulmonares bacterianos mixtos, empiema), infecciones intraabdominales (p. ej., absceso hepático) e infecciones esqueléticas (p. ej., osteomielitis vertebral).^{46,62,66,560,566,609,654,655,695,1130} La infección pulmonar por *E. corrodens* se observa en individuos inmunodeprimidos, con tendencia a la aspiración pulmonar y en presencia de una enfermedad pulmonar subyacente que conduce a compromiso de los mecanismos de defensa locales.^{609,655,688} También se lo implicó junto con especies anaerobias estrictas (especies de *Actinomyces* o *Arachnia*) en la patogenia de un trastorno denominado osteomielitis esclerosante difusa crónica, una infección mixta de la mandíbula que tiene patrones radiológicos y tomográficos característicos y ocurre principalmente en mujeres jóvenes.⁸²⁷ Por extensión desde infecciones periodontales, de oído medio o sinusales, el microorganismo puede entrar en el SNC y provocar meningitis, abscesos encefálicos o paraespinales, y empiema subdural.¹⁷⁴

E. corrodens es un microorganismo que se aísla en forma poco frecuente en otras varias infecciones graves. Se ha observado bacteriemia y endocarditis por *E. corrodens* en huéspedes inmunodeprimidos, adictos a drogas intravenosas e individuos con daño valvular previo que habían recibido recientemente un tratamiento dental extenso.^{554,968} Sin embargo, también se observó endocarditis en individuos sanos sin factores de riesgo reconocidos.¹³⁵³ Se ha comunicado endocarditis de válvulas protésicas e infecciones de prótesis vasculares permanentes asociadas con *E. corrodens*.^{307,554} Asimismo, puede ocurrir una bacteriemia por *E. corrodens* con endocarditis o sin ella en los individuos con enfermedades subyacentes, como artritis reumatoide y procesos malignos hematológicos.^{391,886} También puede ser reconocido en abscesos subcutáneos y celulitis de tejidos blandos en adictos a drogas intravenosas. Estas infecciones son resultado de la aplicación de saliva para limpiar la

piel antes de la inyección de las drogas.^{39,488,968} *E. corrodens* también puede producir celulitis y osteomielitis de la mano como resultado de "lesiones con el puño cerrado" (por puñetazos), mordeduras crónicas de las uñas y mordeduras humanas.^{152,934} La implantación traumática del microorganismo en el tejido subcutáneo puede conducir a la extensión de la infección en los huesos y articulaciones con el desarrollo de osteomielitis y artritis séptica. En estas circunstancias, a menudo el microorganismo desarrolla en cultivo mixto con otros microorganismos facultativos (estreptococos α -hemolíticos y β -hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, bacilos gramnegativos entéricos y anaerobios estrictos [especies de *Peptostreptococcus*, especies bucales de *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas*]). La discitis vertebral por *E. corrodens* también puede ocurrir como complicación de la cirugía espinal.³⁶ En el año 2000, se comunicó un caso atípico de osteomielitis vertebral por *E. corrodens* en un hombre de 65 años en quien se inoculó el espacio paravertebral por un hueso de pescado que le había atravesado la faringe.⁷⁶⁴ También se informaron infecciones bacteriémicas por *E. corrodens* que conducen a celulitis hematológica, artritis séptica, osteomielitis vertebral, discitis intervertebral, absceso paraespal y corioamnionitis.^{35,36,376,416,764,1040} *E. corrodens* sobrevive en el aparato gastrointestinal y puede aislarse en abscesos abdominales, esplénicos, hepáticos y pancreáticos e infecciones peritoneales junto con la flora facultativa y anaerobia del intestino.^{54,654,1046,1218} También ha sido aislado en infecciones ginecológicas, como corioamnionitis, endometritis y cervicitis resultante de la colonización de los dispositivos intrauterinos.^{35,638}

Características de los cultivos e identificación

E. corrodens crece en agar sangre y agar chocolate pero no en el agar de MacConkey. Las colonias son pequeñas (0,5-1 mm) después de 48 horas. Alrededor del 50% de las cepas pueden "deprimir" el agar cuando crecen y se pueden observar tanto variantes con depresión como sin depresión en el mismo cultivo (véase lámina en color 9-3E y G). En general, se produce un pigmento amarillo pálido (observado mejor en un hisopo blanco que se desliza a través del crecimiento en una placa de agar chocolate) y la mayoría de las cepas tienen un olor semejante al del hipoclorito de sodio (lejía o lavandina). En la tinción de Gram los microorganismos aparecen como bacilos o cocobacilos gramnegativos delgados y regulares con extremos redondeados (véase lámina en color 9-3F).

Las características bioquímicas de las cepas de *E. corrodens* que producen depresiones o de las que no la producen son bastante uniformes. Los microorganismos son oxidasa positivos y catalasa negativos, aunque raras cepas pueden ser débilmente catalasa positivas. El microorganismo reduce el nitrato a nitrito y no requiere factores X o V, si bien la hemina es necesaria para el crecimiento aerobio. Las cepas que no producen depresión pueden ser confundidas con especies de *Haemophilus* y cuando se evalúan con discos de factores X y V, muestran crecimiento alrededor del disco con factor X pero no con factor V. No se produce indol ni ureasa, pero la mayoría de las cepas son lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa positivas (véase lámina en color 9-3H). Al contrario de otros microorganismos del grupo HACEK, *E. corrodens* es asacarolítico. Sus características fenotípicas se presentan en el cuadro 9-7, junto con las otras bacterias HACEK con requerimientos nutricionales especiales oxidasa positivas y catalasa negativas.

Como sucede con muchos de los microorganismos implicados en la infección periodontal, se han explorado enfoques

Cuadro 9-7 Características bioquímicas para la identificación de *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, especies de *Kingella* y *Suttonella indologenes*

CARACTERÍSTICA	<i>C. HOMINIS</i>	<i>E. CORRODENS</i>	<i>K. KINGAE</i>	<i>K. DENITRIFICANS</i>	<i>K. ORALIS</i>	<i>S. INDOLOGENES</i>
Hemólisis, SBA	—	—	+ ^a	—	—	—
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Catalasa	—	— ^b	—	—	—	—
NO ₃ a NO ₂	—	+	—	+	—	—
NO ₂ a gas N ₂	+	—	+	+	—	+
Indol	+	—	—	—	—	+
Ureasa	—	—	—	—	—	—
Ornitina descarboxilasa	—	+	—	—	—	—
Hidrólisis de esculina	—	—	—	—	—	—
Hidrólisis de ONPG	—	—	—	—	—	—
Gas a partir de glucosa	—	—	—	—	—	—
Ácido producido a partir de:						
Glucosa	+	—	+	+	+	+
Maltosa	+ ^c	—	+	—	—	+
Fructosa	+	—	—	—	—	+
Sacarosa	+	—	—	—	—	+
Lactosa	—	—	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—	—	—
Manitol	+ ^c	—	—	—	—	—
Manosa	+	—	—	—	—	+
Galactosa	—	—	—	—	—	—
Trehalosa	—	—	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	+	—	—	—	—	—

^aLa mayoría de las cepas producen una β -hemólisis "suave" en agar sangre de carnero.

^bRaras cepas pueden ser débilmente catalasa positivas.

^cRaras cepas pueden ser maltosa negativas; manitol negativas o ambas.

moleculares para la detección, identificación y tipificación de *E. corrodens*. Se han diseñado sondas de DNA específicas, así como sondas para otros patógenos periodontales, mediante análisis de rRNA 16S, identificación de secuencias únicas de nucleótidos y síntesis química de las moléculas de las sondas que son complementarias de estas secuencias específicas de especie.⁷⁸⁷ Estas sondas han sido utilizadas para la detección directa del microorganismo en muestras de la placa subgingival de pacientes con gingivitis y periodontitis. También se han aplicado algunos métodos epidemiológicos, que incluyen SDS-PAGE, electroforesis en gel de campo pulsado, análisis de endonucleasas de restricción y técnicas de PCR preparado arbitrariamente a *E. corrodens* para determinar su relación con otras bacterias y las diferencias entre las cepas de *E. corrodens* aisladas en pacientes.^{229,230,231,1217}

Sensibilidad a los antibióticos

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de rutina de *E. corrodens* son difíciles debido a los requerimientos nutricionales especiales del microorganismo. En general, las pruebas se realizan mediante dilución en agar, que es poco práctica para los laboratorios clínicos. En 1998, Alcalá y cols. comunicaron un procedimiento de microdilución en caldo para *E. corrodens* utilizando medio de prueba para *Haemophilus*.⁸ Según el antibiótico, se observó una concordancia entre el 75% y el 97% ($\pm 1 \log_2$ de dilución) entre los procedimientos de microcaldo y dilución en agar. La mayoría de las cepas de *E. corrodens* son sensibles a ampicilina, amoxicilina y tetraciclinas y resistentes a las penicilinas resistentes a la penicilinas, clindamicina, vancomicina, eritromicina, metronidazol y aminoglucósidos.^{481,804}

La sensibilidad a la penicilina puede variar de una cepa a otra. La mayoría tiene una sensibilidad variable a las cefalosporinas de primera generación y la cefazolina es la más activa.⁴⁸¹ *E. corrodens* también es sensible a cefoxitina, ceftriaxona, cefepima, ciprofloxacina y carbapenémicos (imipenem, meropenem).^{8,481,736,1170} Se han informado raras cepas β -lactamasas positivas.^{481,744} La enzima β -lactamasa de *E. corrodens* se asocia altamente con las células, muestra poca actividad contra las cefalosporinas y es inhibida fuertemente por clavulanato y sulbactam.⁷⁴⁴

Especies de *Kingella* y *Suttonella*

Taxonomía

La especie tipo del género *Kingella*, *K. kingae*, fue descrita originariamente en la década de 1960 y denominada en ese momento grupo M-1 de los CDC. Las primeras descripciones sugirieron una relación con las moraxelas, salvo en que estas cepas eran catalasa negativas.¹¹⁹⁵ El grupo M-1 de los CDC fue redenominado *Moraxella kingii*, nombre que luego se enmendó taxonómicamente por *Moraxella kingae*.¹⁵⁵ Debido a diferencias genéticas, quimiotaxonómicas y fenotípicas importantes, Henriksen y Bovre recomendaron eliminar a *M. kingae* del género *Moraxella* y lo redenombraron como género nuevo y especie *Kingella kingae* en la familia *Neisseriaceae* en 1976.⁵⁶² Ese mismo año, Snell y LaPage propusieron la transferencia de otras dos especies sacarolíticas similares a moraxelas, oxidasas positivas y catalasa negativas al género *Kingella*.¹¹⁹⁶ Estas especies nuevas incluían el microorganismo denominado antes "TM-1" descrito por Hollis, Wiggins y Weaver (*Kingella denitrificans*) y cepas indol positivas que habían sido aisladas originariamente en casos de conjuntivitis (*Kingella indologenes*).^{586,1196} Sobre la base de las comparaciones de secuencias de rRNA 16S, Dewhirst y cols. mostraron que *K. indologenes* estaba relacionado más estrechamente con *C. hominis* que con las otras especies de *Kingella* o con los otros miembros de la familia *Neisseriaceae*.³³⁰ Además, a pesar de las características fenotípicas similares de *C. hominis* y *K. indologenes*, el contenido G + C de su DNA difería lo suficiente como para justificar la condición de géneros y especies separadas. En consecuencia, *K. indologenes* excluido de la familia *Neisseriaceae* y se lo ubica como única especie en el género nuevo *Suttonella* como *Suttonella indologenes* (en honor del microbiólogo australiano R. G. A. Sutton) en la familia *Cardiobacteriaceae* en el subgrupo γ de las proteobacterias.^{330,455} *K. kingae* y *K. denitrificans* se mantienen en la familia enmendada *Neisseriaceae*, que también está en el subgrupo γ de las proteobacterias.¹¹⁰⁰ En 1993, Dewhirst y cols. describieron una especie nueva de *Kingella* que fue recuperada de la placa dental humana de un paciente con periodontitis del adulto.³²⁸ Esta especie nueva fue denominada *Kingella orales* y modificada luego como *Kingella oralis*. Este microorganismo constituye el 0,4% de la microbiota total de la placa dental de individuos periontónicamente sanos y alrededor del 4,6% de la microbiota en la placa dental de los pacientes adultos y juveniles con periodontitis.²²⁸

Importancia clínica

Aunque forman parte de la flora de los aparatos respiratorio y genitourinario normales de los seres humanos, las especies de *Kingella* y *K. kingae* en particular se reconocen en forma creciente como patógenos humanos importantes. Desde su des-

cripción inicial, *K. kingae* fue considerado una causa rara de infección en pacientes con endocarditis. Sin embargo, durante la última década ha surgido como un patógeno importante en pacientes pediátricos, causando principalmente bacteriemia e infecciones osteoarticulares.³⁵¹ Este microorganismo puede aislarse en las vías respiratorias altas de lactantes y niños; se observó que casi el 75% de los niños mayores de 6 meses lo transportan en la orofaringe en algún momento.^{1406,1407} La prevalencia del microorganismo en el aparato respiratorio es máxima entre los niños de 6 meses a 4 años, lo que corre paralelo a las edades que tienen las tasas más altas de ataque para una enfermedad invasiva.¹⁴⁰⁷ Las tasas de portación son más bajas entre los niños menores de 6 meses y mayores de 4 años de edad. Algunos estudios en poblaciones de guarderías han mostrado que *K. kingae* puede ser transmitido de un niño a otro por la vía respiratoria en este contexto.¹¹⁸⁹ Es probable que la entrada para el microorganismo en el torrente circulatorio sea a través de lesiones en la mucosa orofaríngea.

Las infecciones osteoarticulares son las manifestaciones clínicas más frecuentes de infección por *K. kingae* en los niños: estas infecciones se presentan como bacteriemia, artritis séptica, osteomielitis, discitis, tenosinovitis y dactilitis.^{133,339,902,1403,1404} De hecho, con la disponibilidad de vacunas eficaces contra *H. influenzae* tipo b, *K. kingae* ha reemplazado esencialmente a *H. influenzae* como la bacteria gramnegativa más frecuente que produce infecciones osteoarticulares en los niños menores de 3 años.³³⁹ La mayoría de los lactantes con infecciones sistémicas por *K. kingae* presentan fiebre leve; también se observan a menudo infecciones virales de las vías respiratorias altas y estomatitis.^{27,133,339} En la mayoría de los casos, la artritis séptica por *K. kingae* es una infección aguda y los pacientes suelen presentarse dentro de los 3 días de la aparición de signos y síntomas. Estos niños habitualmente se encuentran febriles y las articulaciones afectadas están tumefactas, sensibles a la palpación y muestran menor amplitud de movimiento. Los hemocultivos suelen ser negativos.³³⁹ La artritis séptica por *K. kingae* suele ser una monoartritis, y la articulaciones más afectadas son la rodilla, la cadera y el tobillo. En general, la osteomielitis debida a *K. kingae* es una infección indolente que sigue un curso subagudo y los pacientes suelen presentarse 7 a 10 días después de la aparición de los síntomas. Esta osteomielitis afecta el fémur y otros huesos largos y la tibia, el cúbito, el radio y el calcáneo. Los pacientes con osteomielitis de huesos largos suelen ser incapaces de apoyar peso sobre el miembro afectado y existe sensibilidad local a la palpación sobre el hueso comprometido.⁹⁰² La siembra hematológica del disco intervertebral conduce a espondilitis y discitis intervertebral.^{339,751,1403} Las infecciones de los espacios disciales pueden afectar el espacio lumbar, torácico, lumbosacro o toracolumbar.^{751,1404} Los niños con infecciones invasivas por *K. kingae* a menudo tienen trastornos subyacentes importantes, como leucemia linfocítica aguda o cardiopatía congénita. Aunque raras, se han diagnosticado infecciones osteoarticulares debidas a *K. kingae*, que incluyen discitis intervertebral y artritis séptica en los adultos.^{389,852}

Como sucede con otras bacterias HACEK, *K. kingae* y las otras especies de *Kingella* son causas raras de bacteriemia y endocarditis. La endocarditis por *K. kingae* ocurre primariamente en personas con cardiopatía subyacente o prótesis cardíacas, al igual que las otras bacterias con requerimientos nutricionales especiales explicadas hasta ahora, aunque se han comunicado casos en personas sin cardiopatía previa.^{214,405,1363,1387} A diferencia de las infecciones osteoarticulares, la endocarditis por *K. kingae* se observa más en adultos y

niños en edad escolar, aunque ocurren casos en niños pequeños.^{1363,1404} Puede haber complicaciones, como pericarditis, absceso pericárdico, aneurisma micótico, infarto cerebral e insuficiencia cardíaca congestiva durante el curso clínico de la enfermedad. Se observa que los pacientes inmunodeprimidos tienen mala higiene dental, faringitis o ulceraciones mucosas debido al tratamiento para otros trastornos (p. ej., radioterapia). También se ha comunicado bacteriemia por *K. kingae* sin endocarditis en adultos inmunocompetentes luego de manipulaciones dentales.¹⁰⁸⁶ Otras complicaciones de la bacteriemia y las infecciones óseas por *K. kingae* son meningitis, endoftalmitis hematógena, infección de tejidos blandos y absceso corneal.^{200,883,1087,1312} Se ha comunicado endocarditis por *K. kingae* en una mujer con lupus eritematoso sistémico y bacteriemia por *K. kingae* como causa inmediata de muerte en un paciente con SIDA.^{1300,1387} Se ha aislado *K. kingae* en muestras de sangre y esputo de pacientes con neumonía, epiglotitis y traqueobronquitis.⁶⁷⁸ La septicemia por *K. kingae* también puede imitar las infecciones sistémicas por neiserias (meningococemia o infección gonocócica diseminada) en su presentación clínica. Redfield y cols. comunicaron un caso de bacteriemia por *K. kingae* en un varón de 4 años con leucemia linfocítica aguda que se presentó con lesiones cutáneas y afectación articular sugestivas de una infección gonocócica diseminada.¹⁰⁵³ También se informó una meningitis aguda por *K. kingae* en un paciente con anemia drepanocítica, bacteriemia por *K. kingae* que se presenta como meningococemia en un hombre con cirrosis y un síndrome de artritis-dermatitis "similar a la infección gonocócica diseminada" debida a septicemia por *K. kingae* en una mujer de 21 años antes sana.^{1164,1283}

Pocas veces se ha aislado *K. denitrificans* y *S. indologenes* de infecciones de importancia clínica. *K. denitrificans* constituye parte de la flora de los aparatos respiratorio y genitourinario normales y ha sido documentado como causa rara de septicemia y endocarditis de válvulas nativas y protésicas.⁵⁴³ Las edades de los pacientes con endocarditis variaron de 22 a 66 años y todos salvo uno tenían una enfermedad valvular preexistente o una válvula protésica colocada. Los pacientes a menudo se habían sometido a procedimientos dentales sin profilaxis o tenían infecciones respiratorias simultáneas. Se ha aislado *K. denitrificans* en el empiema de un paciente con carcinoma broncogénico, en la médula ósea de un paciente con SIDA y en el líquido amniótico de una mujer de 23 años con corioamnionitis.^{805,870,882} *S. indologenes* ha sido aislado de infecciones oculares humanas y fue comunicado inicialmente en asociación con un caso de endocarditis de válvula protésica en 1987.^{634,1196} *K. oralis* no se ha asociado con ningún proceso infeccioso.

Características de los cultivos e identificación

Las especies de *Kingella* son bacilos o cocobacilos gramnegativos pletóricos y cortos (2-3 por 0,3 μm) que a veces se presentan en pares o cadenas cortas. Son oxidasa positivos y, a diferencia de las especies de *Neisseria* y *Moraxella*, son catalasa negativos. Todas las especies crecen en agar chocolate y agar sangre y no crecen en agar de MacConkey u otros medios entéricos. Se describió un medio selectivo para la recuperación de *K. kingae* de muestras respiratorias; está compuesto por agar tripticasa de soja que contiene sangre de carnero al 5-7% y vancomicina (2 $\mu\text{g/mL}$).¹⁴⁰⁶ La vancomicina inhibe la flora bacteriana orofaríngea grampositiva y facilita la detección de la β -hemólisis producida por el microorganismo. Todas las especies de *Kingella* y *Suttonella* son oxidasa positivas y catalasa nega-

tivas y ninguna de ellas produce lisina u ornitina descarboxilasas, arginina dihidrolasa o ureasa.

K. kingae es β -hemolítico en agar sangre de carnero; la reacción hemolítica es "tenue" y se asemeja a la de los estreptococos del grupo B y puede observarse sólo en áreas de crecimiento confluyente o después de extraer la colonia de la superficie del agar (véase lámina en color 9-4A). Con la incubación prolongada, algunas cepas de *K. kingae* (y *K. denitrificans*) pueden "deprimir" el agar como *E. corrodens*. *K. kingae* produce ácido a partir de glucosa y maltosa solamente. *K. denitrificans* fue denominado "TM-1" y reconocido al principio por su capacidad para crecer en medio de Thayer-Martin (véase lámina en color 9-4B).⁵⁸⁶ Produce ácido sólo a partir de glucosa en medios con complementos, pruebas rápidas de degradación de hidratos de carbono y distintos sistemas comerciales y también es proil-aminopeptidasa positivo (véase lámina en color 9-4C). Debido a estas características, puede ser confundido con *N. gonorrhoeae*, sobre todo en muestras orofaríngeas y genitourinarias. Este microorganismo, al contrario de otras especies del género, reduce el nitrato a nitrito, y la mayoría de las cepas también reducen el nitrito a gas nitrógeno con una incubación prolongada. *S. indologenes* produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa, pero no de lactosa y se distingue por su capacidad para producir indol. Al igual que *C. hominis*, esta característica debe determinarse en caldo de triptona con extracción de xileno y agregado de reactivo de indol de Ehrlich. *S. indologenes* puede diferenciarse de *C. hominis*, al que se asemeja estrechamente, por su aspecto en la tinción de Gram, actividad de fosfatasa alcalina positiva y falta de producción de ácido a partir de manitol y sorbitol.^{186,330} *K. oralis* produce ácido sólo a partir de glucosa, pero puede ser diferenciado de *K. denitrificans* por su falta de reducción de nitrato y nitrito, y la ausencia de actividad de proil-aminopeptidasa.³²⁸ *E. corrodens* puede ser diferenciado tanto de *C. hominis* como de especies de *Kingella* por su morfología en la tinción de Gram, la falta de fermentación de los hidratos de carbono y las reacciones de ornitina y lisina descarboxilasa positivas. En el cuadro 9-6 se presentan las reacciones bioquímicas para la identificación de especies de *Kingella* y *S. indologenes*.

Aunque la identificación de estos microorganismos es fácil una vez que han sido aislados, algunos investigadores han encontrado dificultades para el crecimiento de *K. kingae* a partir de muestras clínicas, sobre todo muestras de líquido articular, de pacientes con artritis y osteomielitis. Yagupsky y cols. observaron que la siembra directa del material aspirado fue mucho menos sensible para la recuperación de *K. kingae* que la inoculación de medios de cultivo en sangre BACTEC.¹⁴⁰⁵ Entre 100 muestras cultivadas por ambos métodos, 34 dieron muchos microorganismos; 10 de los 11 aislamientos de *K. kingae* que fueron obtenidos crecieron sólo en el medio BACTEC y no fueron recuperados en la siembra directa. La discrepancia en la tasa de aislamiento de *K. kingae* no se observó para otros microorganismos que producen infecciones osteoarticulares. También se detectó *K. kingae* en sangre y líquidos sinoviales utilizando el sistema BacT/Alert® (Organon Tenia) y el tubo microbiano Isolator 1,5® pediátrico (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ).^{765,1412} Utilizando líquido sinovial sembrado con inóculos pequeños de 24 aislamientos diferentes de *K. kingae*, Host y cols. detectaron el 100% de los 24 utilizando los frascos para aerobios BacT/Alert Aerobic y BacT/Alert Pedi-BacT, el 88% con el frasco para aerobios BacT/Alert FAN y el 63% con el frasco BACTEC Plus Aerobic F®.⁶⁰⁴ La mejor recuperación de *K. kingae* de muestras de líquido sinovial inoculadas en medios de hemocultivo puede deberse a la dilución de factores

inhibidores en líquido sinovial por el medio de cultivo (p. ej., sistemas de hemocultivo con base de caldo) o por la extracción de los microorganismos del medio para líquido sinovial (p. ej., cultivos Isolator). En cualquiera de los casos, la inoculación de líquidos osteoarticulares en frascos para hemocultivo debe ser el estándar para el procesamiento de estas muestras en el laboratorio clínico.^{902,1404} También se han utilizado métodos moleculares (p. ej., PCR) para la detección directa de *K. kingae* en líquido articular.¹²¹³

Sensibilidad a los antibióticos

Las cepas de *K. kingae* son sensibles a penicilina, ampicilina, oxacilina, cefalosporinas de todas las generaciones, cloranfenicol, aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Algunas pueden ser relativamente resistentes a eritromicina y la mayoría son resistentes a clindamicina, lincomicina y vancomicina.^{133,636,736} Las cepas de *K. denitrificans* tienen sensibilidades a los antibióticos similares a las de *K. kingae*; el crecimiento de *K. denitrificans* en agar de Thayer-Martin indica que son resistentes a vancomicina y colistina.⁵⁸⁶ Una cepa de *K. indologenes* aislada en una endocarditis fue sensible a ampicilina, cefazolina y tobramicina, según un informe de Jenny y cols.⁶³⁴ En 1993, Sordillo y cols. lograron el crecimiento de una cepa de *K. kingae* a partir de la sangre de un paciente de 29 años con SIDA. La cepa que produjo β -lactamasa y era altamente resistente a ampicilina, cefazolina y ticarcilina, pero era sensible a los agentes resistentes a la β -lactamasa y a fármacos combinados que contenían inhibidores de la β -lactamasa (clavulanato y sulbactam).¹²⁰³ Entre cinco casos de infección por *K. kingae* comunicados en Islandia en 1997, tres de las cinco cepas produjeron enzimas β -lactamasa y eran resistentes a penicilina y ampicilina.¹³³

Especies humanas de *Capnocytophaga*

Taxonomía

Las especies de *Capnocytophaga* fueron descritas originalmente por Prévost en 1956 en el Pasteur Institute. Al principio, se pensaba que estos microorganismos eran variantes fermentativas e indol negativas de *Fusobacterium nucleatum*; fueron denominados "*F. nucleatum* variedad *ochraceus*". El análisis del contenido de G + C de cepas similares puso en evidencia que estos microorganismos estaban más estrechamente relacionados con las bacterias denominadas "especies de *Risella*" que con las fusobacterias y se propuso reclasificar las cepas de *F. nucleatum* variedad *ochraceus* como *Ristella ochracea*.⁵⁹³ Al mismo tiempo, Loesche estaba examinando cepas de "*Bacteroides oralis*" de la cavidad bucal humana; algunas tenían morfologías "fusiformes" sugestivas de fusobacterias.⁷⁶¹ Loesche sugirió el nombre "*Bacteroides oralis* variedad *elongatus*" para estas cepas. Aunque se habían perdido las cepas originales de Prevot, un mejor examen de "*Ristella ochracea*" y "*Bacteroides oralis* variedad *elongatus*" confirmó que estos nombres describían al mismo microorganismo y fue cambiado por "*Bacteroides ochraceus*".¹¹⁹⁹ Durante los primeros años de la década de 1960, Elizabeth O. King también estaba estudiando en los CDC varias cepas gramnegativas aisladas en muestras clínicas humanas, las cuales fueron designadas como grupo DF-1 de los CDC, en que "DF" significa "fermentador disgónico". Esto se refiere a las bajas capacidades fermentadoras de estos microorganismos en medio no complementado con suero. Estas cepas no eran anaerobias en su metabolismo, pero mos-

traban un requerimiento distinto de CO₂ para el crecimiento en medios de agar.

Durante fines de la década de 1970, los investigadores de la University of Massachusetts y en el Forsyth Dental Center en Boston publicaron estudios sobre un grupo de bacilos gramnegativos fusiformes que necesitaban CO₂ tanto para el crecimiento aerobio como anaerobio y mostraban movilidad por deslizamiento.^{593,761,1199,1377} Estos microorganismos parecían tener un papel en la patogenia de la enfermedad periodontal humana y fueron denominados especies de *Capnocytophaga*, lo que refleja el "consumo" o requerimiento de CO₂ del microorganismo para su crecimiento. Algunos grupos de los laboratorios en UCLA y en el Wadsworth VA Hospital compararon cepas y arribaron a la conclusión de que las especies de *Capnocytophaga* de los investigadores de Boston, el grupo DF-1 de los CDC y "*Bacteroides ochraceus*" eran nombres diferentes para los mismos microorganismos.^{935,1378} La especie tipo de este grupo fue denominada *Capnocytophaga ochracea*. Las cepas relacionadas estudiadas al mismo tiempo fueron denominadas *Capnocytophaga sputigena* y *Capnocytophaga gingivalis*. Los estudios de investigación posteriores que utilizaron otros métodos (p. ej., análisis de ácidos grasos celulares; perfiles de aminopeptidasa) apoyaron la condición de especie de *Capnocytophaga*, la sinonimia de las distintas "especies" descritas por los científicos de Estados Unidos y Europa, y la inclusión de tres especies separadas dentro del género.³⁰⁸ En 1994, se identificaron dos nuevas especies humanas de *Capnocytophaga* —*C. granulosa* y *C. haemolytica*— en muestras de placa dental.^{57,1413} Sobre la base del análisis de rRNA 16S, las cinco especies de *Capnocytophaga* halladas en los seres humanos se clasifican en la familia *Flavobacteriaceae* junto con especies de *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Weeksella*, en el orden propuesto "Flavobacteriales" en el filo *Bacteroidetes*.^{455,1305}

Importancia clínica

Las especies de *Capnocytophaga* son bacterias gramnegativas con movilidad por deslizamiento que forman parte de la flora orofaríngea normal. Estos microorganismos pueden desempeñar un papel (junto con *A. actinomycetemcomitans*) en la patogenia de la periodontitis juvenil localizada y otras enfermedades periodontales. También pueden ser agentes de sepsis en pacientes con procesos malignos, granulocitopenia y otras enfermedades subyacentes graves (p. ej., leucemia mieloblástica, leucemia linfocítica aguda, adenocarcinoma, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, carcinoma endometrial).^{132,484,731} Los episodios de bacteriemia a menudo coinciden con períodos de granulocitopenia profunda debida a procesos malignos hematológicos (sobre todo leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda) y a la administración de quimioterapia citotóxica. En los casos típicos, se encuentran mucositis y ulceraciones bucales en los pacientes profundamente inmunosuprimidos, lo que establece así una vía de entrada eficaz para el microorganismo en el torrente circulatorio.^{83,731} Las especies de *Capnocytophaga* se aíslan principalmente de fuentes respiratorias (surcos gingivales, bolsillos periodontales) y en ocasiones, de sangre y LCR.⁶⁹⁰ Pocas veces se pueden aislar en las vías respiratorias bajas, abscesos pulmonares, infecciones de heridas, líquidos pleural/peritoneal, líquido articular, muestras de hueso, conjuntiva y córnea y vítreo.^{374,551,985,1106,1269,1352,1384} Se han aislado especies de *Capnocytophaga* de infecciones del aparato genital femenino como causas de infecciones intrauterinas, intraamnióticas y perinatales graves (p. ej., endometritis,

amionitis, corioamionitis), aborto prematuro, bacteriemia congénita y sepsis neonatal.^{7,352,400,838,860} Se han comunicado endocarditis, linfadenitis cervical, empiema, absceso pulmonar, sinusitis, osteomielitis vertebral, absceso subfrénico, piodermitis, absceso hepático, osteomielitis y lesiones en los puños causadas por especies de *Capnocytophaga* tanto en pacientes inmunodeprimidos como no.^{192,360,374,985,1156,1266,1354} En 1995, se documentó el primer caso de especies de *Capnocytophaga* (*C. sputinea*) como causa de peritonitis relacionada con diálisis peritoneal ambulatoria continua en un hombre de 73 años con enfermedad renal en estadio terminal.³⁸⁸ En el año 2000, se aisló la especie recién descrita *C. granulosa* en un absceso de un paciente inmunodeprimido.³⁶³

Los estudios de los factores de virulencia producidos por *Capnocytophaga* se han centrado en su papel reconocido en la enfermedad periodontal. Los microorganismos aislados en lesiones bucales producen distintas aminopeptidasas, proteasas, elastasas y enzimas similares a la quimiotripsina.^{457,1212} Estas enzimas pueden funcionar como factores de virulencia en forma directa produciendo la degradación del tejido periodontal e indirecta, por su acción sobre las proteínas en la placa dental que generan pequeñas moléculas que tienen el potencial inflamatorio conocido en la enfermedad periodontal (p. ej., bradícina). Estas moléculas causan aumentos de la permeabilidad vascular, acumulación de células polimorfonucleares y dolor. *C. ochracea* y *C. sputigena* producen neuraminidasa, una enzima producida por muchos otros microorganismos y que se considera que contribuye a la virulencia.⁸⁸⁵ En relación con la enfermedad periodontal y la sepsis, las especies de *Capnocytophaga* producen una sustancia dializable que altera el aspecto microscópico de neutrófilos e inhibe mucho la quimiotaxis in vitro.^{1174,1311} Esta sustancia puede actuar localmente en el tejido orofaríngeo y bloquear la función de los neutrófilos en pacientes que ya están inmunodeprimidos. Los extractos de especies de *Capnocytophaga* preparados con células sometidas a ultrasonido contienen una sustancia proteica de 14 kDa que produce la inhibición dependiente de las dosis de la proliferación linfocítica en respuesta a mitógenos.⁹⁵⁴ Las especies de *Capnocytophaga* también secretan proteasas IgA, lo que permite la inutilización de la respuesta inmunitaria mucosa.⁴³³ La producción de polisacárido extracelular también puede contribuir a la virulencia al inhibir la respuesta de linfocitos T a mitógenos y antígenos.¹⁵¹ Por último, el LPS de las especies de *Capnocytophaga* puede volver algunas cepas resistentes a los efectos bactericidas del suero humano normal.¹³⁸⁰

Características de los cultivos e identificación

Las especies de *Capnocytophaga* tienen crecimiento lento, las colonias se vuelven visibles por lo general después de 48 horas de incubación y desarrollan una morfología característica después de este período. Todas las especies necesitan un medioambiente rico en CO₂ para su crecimiento; esto puede ser provisto en una incubadora con CO₂ o una jarra de anaerobiosis con vela. Las colonias del microorganismo son amarillas, ocre o ligeramente rosadas y tienen proyecciones digitiformes marginales (movilidad por deslizamiento) que aparecen como una película que rodea el área central de la colonia (véase lámina en color 9-4D). Las partes centrales de las colonias también tienen un aspecto moteado y húmedo. Las especies de *Capnocytophaga* crecen en agar sangre y agar chocolate, pero no en agar de MacConkey. También se puede observar un buen crecimiento en agar de Thayer-Martin modificado debido a la resistencia de los microorganismos a vancomicina, colistina y

trimetoprim. Los microorganismos son gramnegativos, largos (2.5-7.5 por 0.5 µm), fusiformes y que parecen rectos o ligeramente curvos (véase lámina en color 9-4E). El pleomorfismo, con células tumefactas o grandes en forma de cocos, es característico en los cultivos más antiguos. Todas las especies son catalasa negativas y oxidasa negativas, y producen ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y manosa, pero no a partir de ribosa, xilosa, manitol o sorbitol.¹¹⁹⁹ No se produce indol ni ureasa, y tanto las reacciones de lisina descarboxilasa como de ornitina descarboxilasa y de arginina dihidrolasa son negativas. Las especies de *Capnocytophaga* producen perfiles uniformes característicos en el análisis de ácidos grasos celulares que permiten la identificación del género pero no de especies.³⁰⁸ Las especies son identificadas mediante una serie ampliada de pruebas (reducción de nitrato y nitrito, hidrólisis de almidón y dextrán, etc.). La especie recién descrita *C. haemolytica* es β-hemolítica en sangre de carnero y es la única especie hemolítica humana.¹⁴¹³ Las cepas de *C. granulosa* forman inclusiones granulosas intracelulares que se tiñen con carbol fucsina cuando los microorganismos crecen en condiciones anaerobias en peptona-caldo de levadura glucosa en condiciones anaerobias.¹⁴¹³ Estas dos especies recién descritas pueden ser diferenciadas también de las tres especies humanas de *Capnocytophaga* descritas antes mediante la determinación de las actividades de distintas aminopeptidasas. Las cepas de *C. ochracea* han mostrado reacciones cruzadas con algunos reactivos de aglutinación del látex (Serobact *Legionella*, Disposable Products, Adelaida, Australia) utilizados para la identificación de especies de *Legionella*.²³³ En el cuadro 9-8 se muestran las características bioquímicas de las cinco especies de *Capnocytophaga* asociadas con seres humanos.

Sensibilidad a los antibióticos

Las especies de *Capnocytophaga* en general son sensibles a eritromicina, clindamicina, tetraciclina y fluoroquinolonas y son variadamente sensibles a penicilina, aztreonam, colistina y metronidazol.^{55,109,1109} Las cepas de *Capnocytophaga* resistentes a la penicilina producen nuevas enzimas β-lactamasas que confieren resistencia a las cefalosporinas y penicilinas de amplio espectro.^{430,1092} Estas cepas productoras de β-lactamasa son muy resistentes a penicilina, amoxicilina y cefazolina; el agregado de clavulanato produce una disminución de 64 veces en la CIM de amoxicilina para más del 90% de las cepas productoras de β-lactamasa.¹⁰⁹¹ Estas cepas también son menos sensibles a cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima que las cepas β-lactamasa negativas.¹⁰⁹¹ El imipenem parece ser activo tanto contra las cepas de *Capnocytophaga* β-lactamasa positivas como β-lactamasa negativas. En general, las especies de *Capnocytophaga* son resistentes a los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina), trimetoprim, colistina y vancomicina, aunque algunas cepas pueden ser sensibles.^{1091,1109} Gomez-Garces y cols. comunicaron un caso de bacteriemia mortal causado por una cepa de *C. sputigena* productora de β-lactamasa resistente a la ciprofloxacina que era resistente a todos los β-lactámicos (salvo cefoxitina) y aminoglucósidos, pero era sensible a tetraciclina, eritromicina, clindamicina, aztreonam e imipenem.⁴⁸⁴ En general, los pacientes inmunodeprimidos y aquellos con granulocitopenia son tratados empíricamente con una combinación de un antibiótico β-lactámico y un aminoglucósido, y suelen ser necesarios niveles bactericidas de los antibióticos para una respuesta terapéutica óptima. Por lo tanto, es importante que el microbiólogo reconozca pronto las características sobresalientes de este

Cuadro 9-8 Características bioquímicas de *Capnocytophaga ochracea*, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. haemolytica* y *C. granulosa*

CARACTERÍSTICA	<i>C. OCHRACEA</i>	<i>C. GINGIVALIS</i>	<i>C. SPUTIGENA</i>	<i>C. HAEMOLYTICA</i>	<i>C. GRANULOSA</i>
Hemólisis, SBA	—	—	—	β (pérdida en subcultivo)	—
Oxidasa	—	—	—	—	—
Catalasa	—	—	—	—	—
Motilidad deslizante	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	—	—	—	—	—
NO ₃ a NO ₂	—	v	—	+	—
NO ₂ a gas N ₂	—	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—	—
Ureasa	—	—	—	—	—
Arginina dihidrolasa	—	—	—	—	—
Lisina descarboxilasa	—	—	—	—	—
Ornitina descarboxilasa	—	—	—	—	—
Hidrólisis de esculina	v	—	—	+	—
Hidrólisis de glucógeno	v	—	—	+	—
Hidrólisis de almidón	+	—	—	+	+
Hidrólisis de dextrán	+	v	—	v	—
Gas a partir de glucosa	—	—	—	—	—
Producción de ácido a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Fructosa	v ^a	v	v ^b	ND	ND
Sacarosa	+	+	+	+	+
Lactosa	+	v	—	+	+
Xilosa	—	—	—	—	—
Manitol	—	—	—	—	—
Trehalosa	—	—	—	ND	ND
Manosa	+	+	+	+	+
Rafinosa	v	v	v	ND	ND
Galactosa	v ^a	—	—	ND	ND
Ribosa	—	—	—	—	—
Arabinosa	—	—	—	ND	ND
Salicina	—	—	—	ND	ND
Sorbitol	—	—	—	—	—
L-alanil-aminopeptidasa	2+	2+	3+	—	1+
L-arginina-aminopeptidasa	2+	2+	3+	—	2+
L-γ-glutamilaminopeptidasa	1+	1+	1+	—	1+
L-leucil-aminopeptidasa	2+	2+	3+	—	2+
L-lisil-aminopeptidasa	2+	2+	3+	—	2+
N-α-benzoyl-DL-arginilamino-peptidasa	—	1+	—	—	—

^a Mayoría de cepas positivas.

^b Mayoría de cepas negativas.

+: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable; ND: no disponible; 1+ a 4+: intensidad de las reacciones de aminopeptidasas; SBA: agar sangre de carnero.

microorganismo. Se debe comunicar al médico lo antes posible la resistencia intrínseca de las especies de *Capnocytophaga* a los aminoglucósidos y la producción de enzimas β-lactamasas por algunas cepas clínicas (detectada mediante la prueba de nitrofecina).

Especies caninas de *Capnocytophaga*

Taxonomía

El grupo DF-2 de los CDC fue aislado originariamente en 1976 de los cultivos de sangre y líquido cefalorraquídeo de un paciente que se había vuelto sintomático después de sufrir la mordedura de un perro.¹⁴⁶ Con ulterioridad se publicaron varias

comunicaciones que describen microorganismos similares y, durante 1987, más de 150 microorganismos aislados, denominados grupo DF-2 de los CDC (por fermentador disgónico) se enviaron a la Rama de Bacteriología Especial de los CDC.⁵⁶⁷ En 1989, DF-2 y un grupo de microorganismos “similares a DF-2” fueron clasificados como especies de *Capnocytophaga* sobre la base de las características fenotípicas y los estudios de relación del DNA.¹⁶⁵ El grupo DF-2 se denomina ahora *Capnocytophaga canimorsus* (latín para “mordedura de perro”) y las cepas “similares a DF-2” se denominan *Capnocytophaga cynodegmi* (griego para “mordedura de perro”). De estas dos especies, *C. canimorsus* se aísla mucho más a menudo y parece ser más virulento. Los estudios en macrófagos de ratón cultivados han mostrado que *C. canimor-*

sus es fagocitado, se multiplica dentro de la célula y produce muerte celular dentro de las 48 horas, mientras que *C. cynodegmi* no demuestra efectos citopáticos.⁴¹³ Aunque estos microorganismos son genotípicos y fenotípicamente diferentes de las especies de *Capnocytophaga* aisladas de seres humanos, son similares a ellas en relación con la morfología en la tinción de Gram, los ácidos grasos celulares, la motilidad por deslizamiento y las condiciones de cultivo para el crecimiento. *C. canimorsus* y *C. cynodegmi* son clasificados con las especies humanas de *Capnocytophaga* en la familia *Flavobacteriaceae* en el filo *Bacteroidetes*.⁴⁵⁵

Importancia clínica

En general, las infecciones por *C. canimorsus* se asocian con mordeduras de perros o contactos estrechos con ellos.^{606,785,1003,1113} Kullberg y cols. revisaron más de 60 casos de infección por *C. canimorsus* y observaron que el 47% de los pacientes tenían antecedentes de mordedura y el 27% refería contacto con perros sin mordeduras ni arañazos.⁷³⁹ Las manifestaciones clínicas más graves ocurren en individuos que presentan enfermedades subyacentes o trastornos que los predisponen a una infección grave por este microorganismo, como enfermedad hepática secundaria a alcoholismo (p. ej., cirrosis), esplenectomía previa relacionada con otras circunstancias médicas, enfermedad de Hodgkin, tricoleucemia, fibrosis pulmonar, síndrome de malabsorción, enfermedad renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad ulcerosa péptica, macroglobulinemia de Waldenström y el uso de corticosteroides sistémicos o tópicos.^{542,567,739,825,1078,1107} La asociación observada con mayor frecuencia de infección sistémica por *C. canimorsus* con asplenia sugiere que la firmeza que el sistema reticuloendotelial desempeña un papel importante para contener la propagación del microorganismo. Las principales características clínicas de la infección por *C. canimorsus* incluyen infección de heridas con celulitis, meningitis, bacteriemia con shock séptico, insuficiencia renal, lesiones cutáneas hemorrágicas que recuerdan enfermedad meningocócica, neumonía con empiema y endocarditis tanto de válvulas nativas como protésicas.^{31,142,217,714,766,938} La sepsis fulminante por *C. canimorsus* puede asemejarse clínicamente a la enfermedad meningocócica grave, con desarrollo de coagulación intravascular diseminada, púrpura fulminante, lesiones cutáneas hemorrágicas rápidamente evolutivas, gangrena periférica simétrica y síndrome de Waterhouse-Friderichsen.^{542,739,877} Las presentaciones atípicas y las complicaciones de la sepsis por *C. canimorsus* incluyeron hipotensión de rápida instalación complicada por síndrome de dificultad respiratoria del adulto, pleuritis, infarto de miocardio, mononeuropatía musculocutánea y púrpura trombocitopénica trombótica sin coagulación intravascular diseminada.^{82,217,367,411,608,709} Las complicaciones gastrointestinales y renales incluyen cuadros de abdomen agudos, diarrea secretoria profusa, síndrome urémico-hemolítico y peritonitis relacionada con diálisis.^{213,322,905,995,1139,1278} Se ha aislado *C. canimorsus* en la orofaringe y la saliva de perros y, al menos en un caso de sepsis, la cepa aislada en sangre del paciente también se halló en muestras de hisopados gingivales del perro del paciente.⁸²⁵ Se han comunicado infecciones oculares, entre ellas, blefaritis angular, úlceras corneales crónicas, úlcera corneal con perforación y endoftalmitis causada por *C. canimorsus*.^{242,324,468,1010,1435} En un caso el paciente había sufrido un arañazo de su perro sobre la córnea y había sido tratado, entre otras medidas, con prednisona tópica. Cabe destacar que algunos casos de infección por *C. canimorsus*, incluidas queratitis e infección sisté-

mica, han ocurrido en individuos que sufrieron mordeduras o arañazos de gatos domésticos.^{204,242,810,989,1302}

Características de los cultivos e identificación

En general, *C. canimorsus* se aísla en los hemocultivos, aunque puede hallarse en otras muestras (cultivos de heridas, aspirados de celulitis, LCR). *C. cynodegmi* ha sido identificado en la boca de perros o en heridas por mordedura de perros.¹⁶⁵ En casos de bacteriemia de alto grado, en realidad puede observarse la bacteria en frotis de sangre periférica.⁸⁷⁷ El microorganismo se desarrolla en varios tipos de medios para hemocultivo y el crecimiento suele ser lento. También se ha utilizado el método de lisis-centrifugación (Isolator) con éxito para la recuperación de *C. canimorsus*.¹²⁷⁷ En la mayoría de las comunicaciones, los cultivos se tornan positivos 3 a 7 días después de la recolección. El microorganismo crece tanto en agar sangre como en agar chocolate incubado a 35 °C y en una estufa de CO₂ o en una jarra de anaerobiosis con vela y humedad aumentada.⁵⁵⁹ El escaso crecimiento en agar sangre de carnero de rutina ha sido atribuido al uso de una base de tripticasa de soja. Se observa mejor crecimiento cuando se utiliza una base de infusión de corazón. Heltberg y cols. notaron que los medios complementados con cisteína son propicios para un crecimiento óptimo.⁵⁵⁹ Los distintos tipos comerciales de agar chocolate con suplementos que contienen IsoVitalex (que contiene cisteína) u otros enriquecimientos similares son satisfactorios. Aparecen colonias puntiformes luego de 3 o 4 días de incubación. Después de algunos días más las colonias se presentan circulares, lisas y convexas (véase lámina en color 9-4F). En la tinción de Gram, las bacterias aparecen como bacilos fusiformes delgados de 2 a 4 µg de longitud (véase lámina en color 9-4G). Algunas células pueden parecer ligeramente curvas. Al igual que las otras bacterias con requerimientos nutricionales especiales que explicamos hasta ahora, no se observa ningún crecimiento en agar de MacConkey. *C. canimorsus* y *C. cynodegmi* son catalasa y oxidasa positivos. Estas dos reacciones los diferencian de las otras especies de *Capnocytophaga*, que son tanto oxidasa como catalasa negativas. Ambas especies caninas también son arginina dihidrolasa positivas y ONPG positivas. Las pruebas de lisina y ornitina descarboxilasa son negativas. *C. canimorsus* y *C. cynodegmi* son diferenciados mediante las pruebas de utilización de hidratos de carbono, y el último microorganismo produce ácido a partir de una variedad más amplia de azúcares. En el cuadro 9-9 se muestran las reacciones bioquímicas de *C. canimorsus* y *C. cynodegmi* junto con las características bioquímicas generales de las otras especies de *Capnocytophaga* explicadas antes. El término "disgónico" significa que los medios de prueba bioquímicos para la identificación, incluido el medio basal para la fermentación de hidratos de carbono, deben ser complementados con suero (tres a cinco gotas por 5 mL de caldo) para obtener reacciones confiables y reproducibles.

Sensibilidad a los antibióticos

El lento crecimiento de *C. canimorsus* en medios de agar y la falta de crecimiento de algunas cepas en ciertos tipos de medios de caldo han impedido efectuar estudios adecuados de la sensibilidad a los antibióticos de este microorganismo. Algunos estudios no estandarizados que utilizaron procedimientos de difusión con discos diseñados para bacterias de crecimiento más rápido habían comunicado que las cepas de *C. canimorsus* eran sensibles a la mayoría de los antibióticos, pero resistentes

Cuadro 9-9 Características bioquímicas de *Capnocytophaga canimorsus* (DF-2), *C. cynodegmi* (similar a DF-2) y otras especies de *Capnocytophaga*

CARACTERÍSTICA	<i>C. CANIMORSUS</i>	<i>C. CYNODEGMI</i>	ESPECIES DE CAPNOCYTOHPAGA*
Hemólisis, SBA	—	—	—
Oxidasa	+	+	—
Catalasa	+	+	—
Motilidad en vuelo	+	+	+
Crecimiento en agar de MacConkey	—	—	—
NO ₃ a NO ₂	—	v	v
NO ₂ a gas N ₂	v	v	—
Indol	—	—	—
Ureasa	—	—	—
Arginina dihidrolasa	+	+	—
Lisina descarboxilasa	—	—	—
Ornitina descarboxilasa	—	—	—
Hidrólisis de esculina	v	+	v
Hidrólisis de ONPG	+	+	v
Producción de ácido a partir de:			
Glucosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Fructosa	v	+	v
Sacarosa	—	+	+
Lactosa	+	+	v
Xilosa	—	—	—
Manitol	—	—	—
Manosa	v	+	+
Rafinosa	—	+	—
Inulina	—	+	ND
Galactosa	+	v	v
Melibiosa	—	+	—
Hidrólisis de glucógeno	+	v	v
Hidrólisis de almidón	+	+	v

**C. ochracea*, *C. gingivalis* y *C. sputigena*.

+: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable; ND: no disponible; SBA: agar sangre de carnero.

a los aminoglucósidos. En 1988, Verghese y cols. informaron sobre una técnica de dilución en caldo que utilizaba el caldo de Schaedler como medio de crecimiento.¹³²⁶ Las ocho cepas de *C. canimorsus* evaluadas fueron sensibles a todos los antibióticos excepto a aztreonam. Estos antibióticos fueron penicilina, eritromicina, ticarcilina, piperacilina, cefazolina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas. La sensibilidad de *C. canimorsus* a las sulfamidas y los aminoglucósidos es poco clara en la actualidad, dado que los resultados in vitro con estos agentes parecen ser dependientes del método. Los antibióticos que por lo general son más activos contra los microorganismos grampositivos, como vancomicina, clindamicina, eritromicina y rifampicina, también fueron activos contra *C. canimorsus*. Estos datos apoyan la eficacia clínica observada con penicilina (CIM promedio de la penicilina, $0,04 \pm 0,01$ µg/mL para todas las cepas evaluadas).

Especies de *Dysgonomonas*

La denominación de grupo DF-3 de los CDC se aplica a una cepa clínica infrecuente clasificada hace poco en el género nuevo *Dysgonomonas* como *D. capnocytophagoides*.⁵⁸¹ Desde el punto de vista bioquímico, este microorganismo se asemeja

a ciertas especies de *Capnocytophaga* (su epíteto de especie significa "similar a *Capnocytophaga*"), pero los estudios de secuenciación de rRNA 16S indican la relación genética con *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides forsythus* y *Prevotella melaninogenica*, que son bacilos gramnegativos anaerobios.^{581,1305} Las dos primeras comunicaciones de este microorganismo en asociación con una enfermedad humana fueron publicadas en 1988. En un caso, se aisló *D. capnocytophagoides* en cultivo puro de múltiples muestras de heces de una mujer anciana con hipogammaglobulinemia variable común de larga data.¹³⁴² En el segundo caso, se lo aisló en los hemocultivos de un varón de 24 años con leucemia linfocítica aguda en recaída y granulocitopenia profunda como resultado de la quimioterapia y la radioterapia intensivas.⁵⁷ En 1991, Gill y cols., en el National Cancer Institute, evaluaron muestras de heces de 690 pacientes y observaron 11 con crecimiento moderado a importante de *D. capnocytophagoides*.⁴⁶⁴ De estos 11 pacientes, 4 tenían antecedentes de diarrea prolongada y fueron tratados; se había documentado diarrea en los otros 7 pacientes, pero los microorganismos desaparecieron en forma espontánea. Blum y cols. recuperaron *D. capnocytophagoides* de las heces de 8 pacientes durante un período de un año.¹⁴⁴ Todos eran inmunodeprimidos o presentaban una enfermedad subyacente grave, incluidos tres pacientes con una infección por HIV y dos con enfermedad inflamatoria intesti-

nal. Entre estos pacientes, el espectro clínico de *D. capnocytophagoides* varió desde una diarrea crónica con respuesta clínica al tratamiento antibiótico hasta un estado de portador asintomático.¹⁴⁴ Otros investigadores también observaron la asociación de una infección entérica por *D. capnocytophagoides* tanto con infección por HIV como con hipogammaglobulinemia variable común.⁵⁵² Este microorganismo también ha sido aislado en abscesos de tejidos blandos, en úlceras por decúbito y en las vías urinarias de pacientes inmunodeprimidos.^{81,853,1149}

D. capnocytophagoides se aísla más fácilmente si se siembran muestras de heces en agar sangre con cefoperazona-vancomicina-anfotericina incubado a 35 °C en CO₂ al 5-7%. El agar sangre no selectivo también debe ser incubado, ya que algunas cepas no crecen en este medio selectivo para *Campylobacter*.⁴⁶⁴ También se logró su crecimiento en agar sangre con kanamicina y vancomicina luego de la incubación en condiciones anaerobias.⁸⁵³ *D. capnocytophagoides* crece con relativa lentitud y las colonias puntiformes son visibles después de 24 horas de incubación. Después de 48 a 72 horas, las colonias son blanco grisáceas, lisas y no hemolíticas, y algunas cepas producen un olor dulce durante el crecimiento en medios de agar (véase lámina en color 9-4H).^{57,121,144,464,1342} En la tinción de Gram, los microorganismos aparecen como pequeños cocobacilos gramnegativos. Tanto la reacción de oxidasa como la de catalasa son negativas, no se reduce el nitrato y no se hidroliza la urea. Se produce indol en caldo de triptona y se hidroliza la esculina. No se produce lisina, ornitina descarboxilasa ni arginina dihidrolasa. Esta bacteria produce ácido de forma fermentativa a partir de glucosa, xilosa y maltosa; la mayoría de las cepas también producen ácido a partir de sacarosa y lactosa pero no de manitol (cuadro 9-10). Se describieron algunas cepas “similares a DF-3” que son constantemente sacarosa negativas y ligeramente hemolíticas.³⁰⁰ La cromatografía gas-líquido también es útil para la identificación, ya que todas las cepas demuestran constantemente 12 y 13-metiltetradecanoato, con cantidades menores de tetradecanoato y hexadecanoato en su pared celular.^{121,144,300,1345} Además de *D. capnocytophagoides*, se describieron otras dos especies de *Dysgonomonas*. Un microorganismo que se denominó *Dysgonomonas gadei* se aisló por única vez en una vesícula humana. *Dysgonomonas mossii* fue aislado en muestras clínicas humanas.^{581,759}

Se ha determinado la sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *D. capnocytophagoides* mediante los métodos de difusión en disco, dilución en caldo y Etest.^{57,144,552,853,1342} Las cepas de *D. capnocytophagoides* son resistentes a varios agentes, entre ellos penicilina, ampicilina, ampicilina-sulbactam, aztreonam, aminoglucósidos, cefalosporinas (incluidas cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, cefoperazona y ceftazidima), eritromicina, ciprofloxacina y vancomicina. La mayoría de las cepas son sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y cloranfenicol y tienen sensibilidad variable a piperacilina, clindamicina, tetraciclina e imipenem. En general, los pacientes responden al tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol, clindamicina o tetraciclina.^{144,464}

Grupos EF-4A y EF-4B de los CDC

Estas bacterias, que antes formaban un grupo de afiliación taxonómica incierta, se clasifican ahora como miembros sin nombre de la familia *Neisseriaceae*.¹¹⁰⁰ El grupo EF-4 de los CDC (fermentador eugónico 4) forma parte de la flora bucal

normal de gatos y perros, y también puede causar infecciones cutáneas y pulmonares purulentas en estos animales.^{285,1368} EF-4 fue aislado en heridas humanas producidas por arañazos y mordeduras de gatos y perros y en la sangre de una mujer de 65 años con un tumor carcinóide hepático de células pequeñas metastásico.^{359,1250} La paciente era dueña de un perro, pero no recordaba haber sido mordida por él. EF-4 fue aislado simultáneamente con *Pasteurella multocida* de una laceración ocular y el líquido vítreo de una niña de 8 años después de que había sido arañada en el rostro por su gato y fue hallado en la secreción auricular purulenta de un hombre de 36 años que había sido lamido repetidas veces en las orejas por su perro dálmatá.^{1082,1317}

La denominación de grupo EF-4 se refiere a un cocobacilo gramnegativo que crece tanto en agar sangre como en agar chocolate; algunas cepas pueden crecer también en agar de MacConkey. Después de 24 horas de incubación, las colonias miden alrededor de 1 mm de diámetro, son opacas, lisas y amarillentas, tienen un borde entero y son débilmente α -hemolíticas o no hemolíticas. Algunas cepas tienen un olor característico similar a las “palomitas de maíz”. En el único caso bacteriémico, se detectó EF-4 radiométricamente por el sistema BACTEC después de 2 días de incubación. El microorganismo es inmóvil, oxidasa positivo y catalasa positivo, y reduce nitrato a nitrito. Algunas cepas también pueden reducir nitrito a gas nítrgeno.¹⁸⁶ El microorganismo no produce ureasa ni indol. Las cepas EF-4 se dividen en los subgrupos EF-4a y EF-4b sobre la base de la utilización de hidratos de carbono (véase cuadro 9-10). Las cepas EF-4a fermentan la glucosa, no producen ácidos a partir de otros hidratos de carbono y son arginina dihidrolasa positivas.^{537,1368} Asimismo, las cepas EF-4b producen ácido en condiciones oxidativas y no fermentativas a partir de glucosa solamente. Las cepas EF-4b tampoco reducen el nitrato en su totalidad hasta el gas y son arginina dihidrolasa negativas.⁵³⁷ La mayoría de las cepas EF-4 son sensibles a penicilina, ampicilina, cefazolina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, claritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas y aminoglucósidos.

Especies de *Simonsiella*

Las especies de *Simonsiella* son bacilos gramnegativos aerobios con requerimientos nutricionales especiales que tienen la característica morfológica inusual de disponerse en configuraciones multicelulares que miden 20-50 por 4-8 μ m. Estas configuraciones se forman con seis a ocho células, con el eje mayor de los bacilos individuales en ángulos rectos con el eje del grupo celular. El grupo celular muestra movilidad por deslizamiento y forma colonias amarillas pálidas en agar sangre después de 18 a 24 horas a 37 °C. El género *Simonsiella* contiene tres especies: *S. muelleri* se encuentra en la cavidad bucal humana, mientras que *S. crassa* y *S. steedae* se hallan en la cavidad bucal de ovejas, y de perros y gatos, respectivamente. *S. muelleri* fue aislado en el aspirado gástrico de un recién nacido, pero no ha sido implicado como patógeno humano.¹³⁷² El género se clasifica en la familia *Neisseriaceae*.¹¹⁰⁰

Streptobacillus moniliformis

Taxonomía

S. moniliformis es el único miembro del género *Streptobacillus* y su posición taxonómica actual es incierta. Sobre la base de estudios de secuenciación de rRNA 16S, actualmente se clasifi-

Cuadro 9-10 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Dysgonomonas* y grupos EF-4A y EF-4B de los CDC

CARACTERÍSTICA	<i>D. CAPNOCYTOPHAGOIDES</i>	<i>D. GADEI</i>	<i>D. ROSSII</i>	GRUPO EF-4A	GRUPO EF-4B
Hemólisis, SBA	—	—/α	—	—/α ^d	—/α ^d
Oxidasa	—	—	—	+	+
Catalasa	—	+	v	+	+
Motilidad	—	—	—	—	—
Crecimiento en agar de MacConkey	—	—	—	v	v
NO ₃ a NO ₂	—	—	—	+	+
NO ₃ a gas N ₂	ND	ND	ND	v	v
Indol	v	v	+	—	—
Acetoína	—	—	—	ND	ND
Ureasa	—	—	—	—	—
Hidrólisis de gelatina	ND	—	—	v	—
Fosfatasa alcalina	+	+	+	ND	ND
Arginina dihidrolasa	—	—	—	+	—
Ornitina descarboxilasa	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrólisis de esculina	+	+	+	—	—
Gas a partir de glucosa	—	—	—	—	—
Ácido producido a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+ ^a	+ ^b
Adonitol	—	—	ND	ND	ND
L-arabinosa	+	+	ND	ND	ND
Celobiosa	ND	+	ND	ND	ND
Dulcitol	—	—	ND	ND	ND
Eritritol	ND	—	ND	ND	ND
Fructosa	ND	+	+	ND	ND
Glucógeno	ND	—	ND	ND	ND
Inositol	—	—	+ ^d	ND	ND
Lactosa	+	+	+	—	—
Maltosa	+	ND	+	—	—
Manitol	—	—	+ ^d	—	—
Manosa	+	+	+	ND	ND
Melecitosa	ND	+	ND	ND	ND
Melibiosa	+	+	ND	ND	ND
Rafinosa	+	+	v	ND	ND
Ramosa	ND	+	+ ^w	ND	ND
Ribosa	ND	+ ^d	ND	ND	ND
Salicina	ND	+	+	ND	ND
Sorbitol	—	—	ND	ND	ND
Almidón	ND	+	ND	ND	ND
Sacarosa	+	+	+	—	—
Trehalosa	—	+	+	ND	ND
Xilosa	+	+	+	—	—
β-glucuronidasa	—	+	—	ND	ND
N-acetil-β-glucosaminidasa	—	+	+	ND	ND
α-fucosidasa	—	+	+	ND	ND

+ : reacción positiva; — : reacción negativa; +d : reacción positiva débil; v : reacción variable; ND : datos no disponibles; SAB : agar sangre de carnero.

^aGlucosa fermentada.

^wGlucosa oxidada.

ca a *S. moniliformis* en la familia propuesta “*Fusobacteriaceae*” en la clase “*Fusobacterias*” del filo *Fusobacteria*.⁴⁴⁵

Importancia clínica

Streptobacillus moniliformis es un bacilo gramnegativo con requerimientos nutricionales especiales que normalmente se encuentra en la orofaringe de roedores y puede ser transmitido a los seres humanos por las mordeduras de estos animales. Los roedores son su reservorio natural y desempeñan un papel clave

en su transmisión. El microorganismo se encuentra en las vías respiratorias altas de ratas salvajes, ratas y ratones de laboratorio, y roedores domésticos (p. ej., cobayos, gerbos) y puede producir enfermedad en estos animales.^{692,713} También puede ser transportado por los animales que atrapan roedores o se alimentan de ellos, como perros o gatos.

En los seres humanos, *S. moniliformis* causa una enfermedad denominada “fiebre por mordedura de rata” o fiebre de Haverhill cuando es adquirida por la ingestión del microorganismo. El último nombre proviene de Haverhill, Massachu-

setts, donde se lo aisló en hemocultivos de varios pacientes durante un brote local de la enfermedad.^{745,1165} En la actualidad, la mayoría de los casos comprenden mordeduras de ratas o la exposición a roedores y muchas de estas infecciones ocurren en niños.^{497,963} Tras un período de incubación de 7 a 10 días después de la mordedura de una rata o de la ingestión de alimentos o agua contaminados con excremento de ratas, existe un inicio brusco de fiebre alta, escalofríos, cefalea, mialgas, vómitos y otros síntomas inespecíficos.⁹⁶³ Algunos días después puede aparecer una erupción sobre las extremidades (que incluyen las palmas y las plantas) y dolor articular grave, poliartritis migratoria y asimétrica o artritis séptica franca en alrededor del 50% de los pacientes.^{294,523,577,591,1112} En los casos típicos, la erupción es rosada-roja y maculopapulosa, aunque puede ser petequial, purpúrica o pustulosa.¹¹³ También se describieron abscesos cutáneos y subcutáneos con edema depresible en asociación con esta infección.^{523,1282,1319} La enfermedad se puede resolver en forma espontánea sin síntomas residuales o puede desarrollarse en un trastorno crónico y periódicamente febril. Las complicaciones relacionadas con la diseminación sistémica a través del torrente circulatorio son endocarditis, neumonía con derrame pleural, septicemia, absceso encefálico, amnionitis, prostatitis, pancreatitis, abscesos cutáneos y del aparato genital, y muerte.^{199,333,399,1014,1090,1110,1158} Los síntomas artríticos pueden persistir durante años después de la resolución o del tratamiento de la infección. Sin un indicio sobre el origen de la infección, la fiebre por mordedura de rata o fiebre de Haverhill puede asemejarse a una infección viral, meningococemia, fiebre tifoidea o fiebre manchada de las montañas Rocosas.^{1021,1399} El diagnóstico también puede ser problemático porque se han comunicado casos en pacientes sin antecedentes de mordeduras de roedores o exposición directa a ellos.⁴¹⁷ Por otra parte, la revisión de 45 casos que ocurrieron en California en los últimos treinta años puso en evidencia que la fiebre por mordedura de rata se sospecha en el 75% de los casos en los cuales se dio un diagnóstico tentativo.⁴⁹⁷ Debido a los requerimientos nutricionales especiales del microorganismo y a las dificultades involucradas con el cultivo, se han hecho diagnósticos retrospectivos de infección por *S. moniliformis* en ocasiones mediante técnicas serológicas, que incluyen la detección de aglutininas y anticuerpos fijadores del complemento contra la forma bacilar del microorganismo en suero. Sin embargo, no se dispone fácilmente de pruebas serológicas para esta infección y la mayoría de los enfoques serológicos se han utilizado para evaluar la presencia de este microorganismo en colonias de roedores de laboratorio.

Características de los cultivos e identificación

S. moniliformis es un bacilo gramnegativo pleomorfo con requerimientos nutricionales especiales que tiende a formar células filamentosas únicas, delgadas y largas. Estas células delgadas (aproximadamente 1 µm) pueden tener más de 100 µm de longitud y plegarse en asas y espirales. En ocasiones, tienen una tinción variable con Gram. Con una incubación prolongada, puede aparecer una tumefacción bulbosa o con forma de salchicha a lo largo del filamento, que hace que el microorganismo tenga un aspecto arrosariado. En medios enriquecidos que contienen suero, los microorganismos aparecen como bacterias fusiformes gramvariables, delgadas y regulares con extremos redondeados o puntiagudos. También pueden perder su pared celular y existir como una “forma en L (‘deficiente en pared celular’).” De hecho, existen pruebas genéticas, fenotípicas, serológicas y estructurales que sugieren su relación taxo-

nómica con los micoplasmas y los ureaplasmas, los cuales carecen de una pared celular bacteriana típica.¹³⁹⁹ *S. moniliformis* es microaerófilo y el crecimiento en medio líquido suele requerir un suplemento con suero (10-20%), sangre o líquido ascítico.

El diagnóstico de fiebre por mordedura de rata o fiebre de Haverhill se hace por la demostración de *S. moniliformis* en hemocultivos, líquido sinovial, lesiones cutáneas y material de abscesos.^{366,1165,1166} Como el microorganismo es inhibido por el anticoagulante SPS, la sangre (10 mL) debe ser anticoagulada con citrato (10 mL de citrato de sodio al 2,5%) antes de su procesamiento.^{745,1166} También creció con éxito en medios de hemocultivo que contienen SPS con resinas (p. ej., BACTEC Peds-Plus, BD Biosciences).⁵⁹¹ Las células sanguíneas citradas sedimentan mediante centrifugación y los eritrocitos centrifugados se inoculan en medio de agar (agar infusión de corazón) que contiene suero de caballo sin complemento y estéril al 10-20% y extracto de levadura al 0,5%. El inóculo se propaga suavemente sobre la superficie de agar. También se inocula un medio de caldo de ingredientes similares (caldo de infusión de corazón con suero al 10-20% y extracto de levadura) con los eritrocitos centrifugados. El aislamiento de *S. moniliformis* también se ha logrado utilizando un medio bifásico con caldo de tripticasa de soja que contiene una porción inclinada (pico de flanta) de agar tripticasa de soja. Los medios se incuban a 35 °C en una jarra de anaerobiosis con vela o una estufa con CO₂. Se pueden cultivar de la misma manera otras muestras (líquido articular citrado, aspirados, material de abscesos, etc.).

En el medio de caldo el microorganismo crece como pequeñas “bolas” (*puff balls*) cerca de la parte inferior del tubo o el frasco y por encima de los eritrocitos y la estroma. La acumulación de ácido en los medios de caldo puede destruir al microorganismo, de modo que es necesario un subcultivo frecuente para mantener la viabilidad. En el medio de agar enriquecido con suero, el crecimiento puede aparecer en 2 a 3 días o requerir una semana o más. Las colonias son pequeñas (1-2 mm de diámetro), convexas, blanco grisáceas, lisas y de consistencia de mantequilla. Se forman variantes microscópicas en fase L en forma espontánea debajo de las colonias o alrededor de ellas; la morfología típica en “huevo frito” con un centro denso similar a la morfología de especies de *Mycoplasma* se puede observar con un microscopio de disección. La identificación de *S. moniliformis* se logra observando la morfología filamentosas gramnegativa típica en la tinción de Gram y realizando pruebas de identificación bioquímica en medio con suplemento de suero.^{366,1399} Se pueden realizar pruebas de utilización de hidratos de carbono en caldo con nutrientes que contiene hidratos de carbono esterilizados por filtro al 1% y suero de caballo estéril al 0,5%. Estas pruebas deben ser incubadas durante 3 semanas antes de la lectura, aunque se han obtenido resultados confiables y reproducibles cuando los cultivos sólo fueron incubados durante una semana antes de la interpretación de las pruebas. También se puede lograr una rápida identificación del microorganismo mediante los análisis de los perfiles de ácidos grasos utilizando cromatografía gas-líquido, por la detección de las actividades enzimáticas de distintas aminopeptidasas y glucosidasas utilizando la banda API-ZYM (BioMerieux, Inc.) y por los patrones proteicos obtenidos por PAGE.^{286,366,1104} Los ésteres metílicos de ácidos grasos detectados mediante cromatografía gas-líquido incluyen ácido hexadecanoico (C_{16:0}), ácido linoleico (C_{18:2}) y ácidos octadecanoicos (C_{18:1}, C_{18:0}).^{366,591,1104} Las técnicas PAGE también pueden ser útiles para la tipificación de las cepas clínicas.²⁸⁶ Las reacciones de *S. moniliformis* a distintas pruebas de identificación bioquímica se muestran en

el cuadro 9-11. Se ha desarrollado una amplificación de amplio rango basada sobre PCR de una parte del gen de rRNA de 16S seguida por la secuenciación de amplicones para la detección de *S. moniliformis* en colonias de roedores, bandadas de pavos y seres humanos.^{113,153} Este método se utilizó para diagnosticar fiebre por mordedura de rata en un varón de 11 años sintomático en el cual se desarrolló fiebre, vómitos, erupción y artritis después de haber sido mordido por su rata mascota. Los cultivos de sangre, LCR y orina fueron negativos, pero el líquido proveniente de una ampolla cutánea fue positivo por el ensayo de amplificación/secuenciación.¹¹³

Sensibilidad a los antibióticos

Los datos de sensibilidad a los antibióticos in vitro indican que *S. moniliformis* es sensible a penicilina, ampicilina, penicilinas de amplio espectro y resistente a penicilinas (azlocilina, mezlocilina, piperacilina, oxacilina), cefalosporinas (cefazolina, cefixima, cefotaxima, cefoxitina, cefpirona, ceftazidima), eritromicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, imipenem y vancomicina.^{366,1399} El microorganismo tiene una sensibilidad intermedia a aminoglucósidos, cloranfenicol y ciprofloxacina, y en general es resistente a nalidixato, norfloxacina, colistina y trimetoprim-sulfametoxazol. El fármaco de elección para el tratamiento es la penicilina G procaína, aunque la cefalotina, la tetraciclina y otras cefalosporinas también han obtenido eficacia clínica.

Especies de *Brucella*

Epidemiología de la brucelosis

La brucelosis (infección por especies de *Brucella*) tiene una distribución mundial y ha sido conocida históricamente como fiebre ondulante, enfermedad de Bang, fiebre de Gibraltar, fiebre mediterránea y fiebre de Malta. El microorganismo fue aislado por primera vez en 1887 por sir David Bruce, que obtuvo un germen sospechoso en cultivos esplénicos de soldados británicos que murieron por fiebre de Malta.¹⁰⁴² Más tarde se observó que la leche, el queso y otros alimentos elaborados con leche de cabra eran la fuente de la infección de estos soldados. Se aislaron microorganismos similares en el ganado vacuno y porcino y en seres humanos expuestos a estos animales y sus productos. La brucelosis pasó a ser una zoonosis de gran importancia económica y una preocupación para la industria ganadera en muchas partes del mundo. En los países desarrollados, algunas infecciones humanas se asocian con ocupaciones relacionadas con el procesamiento de carnes y productos lácteos.¹⁴²¹ En los Estados Unidos, la mayoría de los casos comunicados en los últimos años han provenido de California, Iowa, Virginia y Texas, en relación con las actividades centrales de esos estados con respecto a la ganadería, la exportación de sus derivados y la industria láctea.

La brucelosis se transmite entre los animales a través del aparato digestivo, la piel y las mucosas. Luego de la infección, los microorganismos alcanzan los ganglios linfáticos y ocurre la bacteriemia. En algunos animales (p. ej., infección por *B. abortus* en el ganado vacuno), los microorganismos proliferan en el útero y en la glándula mamaria. Su proliferación en las membranas coriónicas del animal preñado conduce al aborto. Muchos animales se recuperan de la infección espontáneamente, pero siguen eliminando la bacteria durante tiempos variables en orina, secreciones vaginales y leche.

Cuadro 8-11 Características bioquímicas de *Streptobacillus moniliformis*

CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
Oxidasa	—
Catalasa	—
Reducción de nitrato	—
Indol	—
Ureasa	—
Hidrólisis de esculina	+
Producción de H ₂ S (acetato de plomo)	+
Fosfatasa alcalina	+
Producción de gas a partir de glucosa	—
Ácido producido a partir de:	
Glucosa	+
Maltosa	+
Fructosa	+
Sacarosa	v
Lactosa	v
Xilosa	—
Manitol	—
Manosa	+

+: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable.

Las especies de *Brucella* reciben el nombre según las especies de huéspedes primarios y se subdividen a su vez en biovariedades sobre la base de la aglutinación serológica con los antígenos M y A asociados con el "lipopolisacárido liso (S-LPS)" (véase más adelante). *B. melitensis* se encuentra fundamentalmente en cabras y ovejas, pero también puede hallarse en el ganado vacuno por el contacto indirecto con rebaños de ovejas y cabras infectadas que han contaminado los pastos de donde se obtienen forrajes para las vacas que amamantan.¹¹⁷² *B. melitensis* se divide en tres biovariedades (1-3). *B. abortus* es patógeno para el ganado vacuno; también puede infectar ovejas, cabras, cánidos, caballos y seres humanos. La especie está formada por siete biovariedades (1-6 y 9 [las biovariedades 7 y 8 ya no son más válidas]). *B. suis* contiene cinco biovariedades; las biovariedades 1, 2 y 3 se encuentran en cerdos, mientras que la biovariedad 4 se encuentra en renos y caribú en las regiones árticas de América del Norte y Rusia, y la biovariedad 5 causa infecciones en los roedores. *B. suis* biovariedad 1 también se ha establecido en rebaños de ganado vacuno en Brasil y Columbia.¹¹⁷² Las cepas de *B. canis* comprenden una única biovariedad y se presentan en perros (sobre todo beagles) en los Estados Unidos, México, Argentina, España, China, Japón y Túnez. *B. ovis* y *B. neotomae* contienen una única biovariedad y se encuentran en carneros y ratas del bosque, respectivamente. Se ha demostrado variación antigénica entre las biovariedades existentes para cada una de las especies de *Brucella*, lo que establece que las clasificaciones de las biovariedades requieren más estudio y expansión. *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se asocian con enfermedad humana; *B. melitensis* se considera la especie más virulenta, seguida de *B. suis* y *B. abortus*. *B. canis* pocas veces provoca infecciones en seres humanos, y las infecciones comunicadas a menudo se han asociado con el laboratorio. Las complicaciones proteiformes asociadas con las infecciones por *Brucella* por lo general no se observan en las infecciones humanas por *B. canis*.

En 1994, se aisló una especie de *Brucella* que no había sido reconocida antes en mamíferos marinos y un delfín en Escocia y California, respectivamente.^{170,261,422} Con posterioridad, se aislaron otras cepas en focas, marsopas y nutrias,⁶²⁶ que correspondían al menos a dos biovariedades primariamente halladas en focas y cetáceos, denominadas tentativamente "*Brucella maris*".⁶²⁶ También se caracterizaron cepas obtenidas de fetos abortados de delfines nariz de botella y se propuso el nombre "*Brucella delphini*" para ellos.⁸⁶⁸ Algunos controles serológicos de especies de focas, marsopas, delfines y ballenas han mostrado que los anticuerpos contra las especies de *Brucella* se distribuyen ampliamente entre los mamíferos marinos.^{639,1291} El análisis molecular mostró que las cepas aisladas en ballenas, focas, marsopas y delfines son especies de *Brucella* pero difieren entre ellas y de otras especies de *Brucella* en muchos aspectos, como la estructura del LPS y los OMP.^{100,170,635} El elemento de inserción IS711, que se encuentra en todas las especies de *Brucella*, también se halla en los aislamientos marinos, pero el elemento está en una localización cromosómica diferente.²⁶² Mientras las especies de *Brucella* reconocidas contienen dos genes *omp2* comprendidos por una copia cada uno de *omp2a* y *omp2b* o dos genes *omp2a*, las brucelas marinas transportan dos copias de genes *omp2b*. La secuenciación de estos genes también puso en evidencia una heterogeneidad importante entre los aislamientos marinos, lo que indica que estos microorganismos comprenden más de una única especie ("*B. maris*"), como se había propuesto.^{261,263} Sobre la base de la preferencia del huésped y del polimorfismo en el locus *omp2*, Cloeckert y cols. propusieron dos especies nuevas, "*B. pinnipediae*" y "*B. cetaceae*", para incluir las cepas aisladas en focas y delfines, respectivamente.²⁶³ Ciertas pruebas también sugieren que estas especies nuevas pueden tener un potencial patógeno ampliado. Rhyen y cols. inocularon a seis vacas con una cepa de *Brucella* de una foca que la albergaba y observaron que todos los animales sufrían una seroconversión en las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos contra *B. abortus*. Dos de las vacas tuvieron abortos y en los fetos mortinatos se aislaron las brucelas, lo que indicó que estas cepas eran patógenas también para los mamíferos terrestres.¹⁰⁶⁸ Se necesitan otras investigaciones para delinear las relaciones filogenéticas entre estas especies nuevas y determinar sus relaciones con las especies del género actualmente reconocidas.⁴²³

En los Estados Unidos, la incidencia de brucelosis humana ha disminuido constantemente como resultado de las medidas de control implementadas en la industria ganadera. Estas medidas incluyen la vacunación de los animales jóvenes y el sacrificio de los animales enfermos o de los animales más viejos con pruebas serológicas de infección.¹⁴²¹ En el momento en que comenzó el Programa de erradicación de brucelosis cooperativo del Estado Federal y de la pasteurización de rutina de los productos lácteos en 1945, se comunicaban más de 5 000 casos humanos a los CDC por año. En 1981, la incidencia doméstica anual de brucelosis humana había caído hasta 185 casos y desde ese momento, se habían informado menos de 200 casos por año. Sin embargo, es probable que la brucelosis humana sea subdiagnosticada y subcomunicada, y se estima que por lo menos 25 casos no son reconocidos por cada caso que sí lo es.¹⁰⁴² En las últimas dos décadas, se han diagnosticado muchas infecciones por brucela de adquisición doméstica entre individuos que viven en Texas y California que han ingerido queso mexicano preparado con leche de cabra no pasteurizada.^{245,1267} Con la disponibilidad y la popularidad crecientes de los viajes internacionales, muchos casos de brucelosis diagnosticados en residentes de los Estados Unidos ocurren en personas que han visi-

tado países donde el microorganismo es endémico en los rebaños ovinos y bovinos y en los cuales los productos lácteos (sueño, manteca, yogures, cremas) no son pasteurizados. La infección refleja en parte la participación en aspectos de una cultura extraña que son tan atractivos para los viajeros ("vivir como lo hacen los nativos").¹⁰⁴² Los seres humanos también pueden infectarse por el contacto con animales infectados, productos de la concepción (sobre todo veterinarios, trabajadores del zoológico) o líquidos corporales de animales. La transmisión interhumana es rara. Las infecciones por *Brucella* han sido transmitidas a través de transfusiones de sangre y trasplantes de médula ósea de donantes infectados.^{17,383} La infección neonatal puede ser adquirida por vía transplacentaria, durante el parto o a través de la ingestión de leche materna contaminada.⁹⁸⁴

La brucelosis se distribuye en todas las áreas del hemisferio oriental y del occidental. Las infecciones de animales indígenas y seres humanos ocurren en la región del Mediterráneo, el golfo arábigo, el subcontinente de la India, América Latina, Asia y partes de México. *B. abortus* se encuentra en todo el mundo y *B. suis* es endémico en el sur de los Estados Unidos, sudeste de Asia y América Latina. Se han diagnosticado infecciones por *B. canis* en América Latina, Europa central y Japón. Se ha identificado brucelosis bovina y porcina causada por *B. melitensis* y *B. suis*, respectivamente, en todos los países de América Central, y la infección caprina y ovina por *B. melitensis* está restringida a Guatemala.⁸⁹² El norte de Europa, Dinamarca y Noruega no tienen infecciones animales debido a los programas exitosos de control y erradicación, pero los países del sur de Europa siguen teniendo *B. melitensis* en las poblaciones ovina y caprina y, en consecuencia, comunican una alta cantidad de infecciones humanas.^{382,472} Estos países también han observado el resurgimiento de la infección por *B. suis* biovariedad 2 en cerdos debido a la extensión de la población de cerdos salvajes.⁴⁷² La brucelosis en animales y seres humanos sigue siendo un problema en la región de los Balcanes del centro y sudeste de Europa. La infección por *B. melitensis* ocurre ampliamente entre ovejas, cabras y seres humanos y *B. abortus* se encuentra en rebaños de ganado vacuno en Grecia y Macedonia.¹²⁵² La infección por *B. melitensis* en rebaños de ovejas y cabras y la infección por *B. suis* biovariedad 2 en cerdos se encuentran en Yugoslavia y Croacia, respectivamente.¹²⁵² Rumania ha erradicado con éxito la infección por *B. abortus* en el ganado y la incidencia de infecciones en ovejas y cerdos se mantiene baja.³³⁶

Los países con incidencia más alta tanto de brucelosis animal como humana son Arabia Saudita, Irán, Siria, la Autoridad Palestina, Jordania y Omán. En la región del Cercano Oriente, la enfermedad ocurre en todos los animales domésticos, incluidos ganado vacuno, ovejas, cabras, camellos, caballos, cerdos y búfalos. *B. melitensis* biovariedad 3 (Egipto, Israel, Túnez, Turquía, Jordania), *B. melitensis* biovariedad 2 (Arabia Saudita, Turquía) y *B. melitensis* biovariedad 1 (Libia, Omán, Israel) representan la mayor parte de la enfermedad, pero las infecciones por *B. abortus* biovariedades 1, 2, 3 y 6 han sido comunicadas en Egipto, Irán, Turquía y Sudán, respectivamente.¹⁰⁵⁵ Las biovariedades de *B. abortus* han surgido como la especie predominante en Yemen. En general, las infecciones humanas adquiridas en estas regiones se deben a *B. melitensis*, sobre todo biovariedad 3.¹⁰⁵⁵

Las especies de *Brucella* también plantean un peligro ocupacional para los trabajadores del laboratorio debido a accidentes, derrames o manipulaciones inapropiadas de muestras o cultivos que contienen *Brucella*.⁵⁰² En 2000, Yagupsky y otros autores describieron siete casos adquiridos en el laboratorio de

infección por *B. melitensis* en un centro médico del sur de Israel.¹⁴¹¹ Este brote fue causado por tres biovariedades diferentes de *B. melitensis*, lo que indicó múltiples exposiciones y las infecciones ocurrieron en un período de 3 meses cuando el 10% de 530 hemocultivos positivos dieron especies de *Brucella*. Con la investigación, no se descubrieron fuentes ni violaciones de la seguridad del laboratorio. También se diagnosticó brucelosis en siete empleados de un hospital (seis técnicos de laboratorio y un patólogo) en un período de 9 años en un hospital de Riyadh, Arabia Saudita.⁸⁵⁵ Las infecciones fueron diagnosticadas mediante pruebas serológicas, junto con signos y síntomas clínicos compatibles. La morbilidad resultante incluyó una recaída en dos pacientes y complicaciones (flebitis séptica, prótesis infectadas, epididimoorquitis y espondilitis lumbar) en otros cuatro. Las infecciones en los técnicos fueron rastreadas hasta la manipulación de cultivos de *Brucella*. En una comunicación de Italia, 12 trabajadores de laboratorio se infectaron después de la rotura accidental de un tubo de la centrifuga.⁴¹² Estos individuos fueron tratados y controlados con pruebas serológicas. Aun cuando los laboratorios involucrados en estos experimentos utilizaran gabinetes de seguridad biológica clase II para las manipulaciones de muestras y cultivos, el riesgo para las infecciones adquiridas en el laboratorio es importante, sobre todo en los localizados en regiones endémicas. La adherencia estricta a los protocolos de seguridad y los procedimientos en todos los laboratorios y la vigilancia y el cuidado cuando se manipulan muestras o cultivos es un requerimiento absoluto para la prevención de las infecciones adquiridas en el laboratorio de cualquier tipo. Luego de un brote en el hospital Riyadh, la respuesta del laboratorio fue la adquisición de una instalación de Bioseguridad nivel 3.⁸⁵⁵

Taxonomía de las especies de *Brucella*

Durante muchos años, la posición taxonómica de las especies de *Brucella* fue incierta. En 1985, Verger y cols. utilizaron las técnicas de hibridación de DNA-DNA para investigar 51 cepas de *Brucella* que representan todas las especies y observaron que todas tenían una homología superior a $96 \pm 4\%$ entre sí.¹³²⁵ Estos científicos propusieron que todas las brucelas pertenecían a una sola especie (*Brucella melitensis*) y que las especies reconocidas deben considerarse biovariedades de *B. melitensis* (*B. melitensis* biovariedades Melitensis, Abortus, Suis y Canis). El análisis electroforético enzimático multilocus de cepas de *Brucella* también apoyó esta propuesta de género monoespecífica.⁴⁴⁸ Esta propuesta no ha sido aceptada debido a diferencias bioquímicas y serológicas entre las especies, los rangos divergentes de huéspedes mostrados por estas especies, las diferencias reconocidas en la virulencia y la presencia de OMP específicos de especies y genes que sustentan el estado de las especies existentes.⁸⁹³ Algunos estudios de genética molecular (mapeo de endonucleasas de restricción) pusieron luego en evidencia polimorfismos genéticos que podían diferenciar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* junto con líneas convencionales de especies, aunque estos métodos no podían delinear las biovariedades dentro de las especies.¹⁸ Uno de los genes polimorfos que ayudan a la diferenciación es el gen de porina *omp2*, que codifica un OMP de 36 kDa responsable de determinar la sensibilidad a los colorantes utilizados para la identificación de especies convencionales.⁴⁰⁷

Algunos estudios sobre las relaciones genéticas de las brucelas revelaron otras características singulares del género. A diferencia de otras bacterias, algunas especies de *Brucella* tienen dos cromosomas salvo *B. suis* biovariedad 3, que tiene un

único cromosoma.⁶⁵⁶ Recientemente se secuenció el genoma de *B. melitensis* cepa 16M y está compuesto por 3 294 935 pares de bases distribuidas en dos cromosomas circulares de 2 117 144 pares de bases y 1 177 787 pares de bases, respectivamente.^{315,316} Cada cromosoma codifica funciones que son esenciales para la replicación y la supervivencia del microorganismo; de ahí su clasificación como cromosomas y no como plásmidos. No se describieron plásmidos endógenos, transformación ni conjugación en especies de *Brucella*. La hibridación de DNA-RNA y los estudios de secuenciación de rRNA 16S han determinado que algunas especies de *Brucella* están relacionadas con *Agrobacterium*, especies de *Rhizobium* y *Mesorhizobium* endosimbióticas y especies de *Bartonella*, y están filogenéticamente más próximas a las especies de *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium*, que los patógenos quimioautotróficos de vida libre de las plantas tropicales.^{589,992} Las especies de *Brucella* están más estrechamente relacionadas con *O. anthropi* grupo de hibridación 2, para el cual se ha propuesto el nombre de la nueva especie *O. intermedium*.¹³²⁰ La relación genética de estos microorganismos es tan próxima que *O. anthropi* es reactivo en un ensayo basado sobre PCR que es "específico" para especies de *Brucella*.²⁹⁷ En la actualidad, las especies de *Brucella* son clasificadas en el subgrupo α_2 de las *Proteobacteria* en la familia *Brucellaceae* en el orden propuesto "Rhizobiales".^{455,894}

Virulencia de las especies de *Brucella*

Las especies de *Brucella* sufren variación antigénica o "disociación" en subcultivo. Las colonias pasan de una morfología "lisa" a una "rugosa" que conduce a la pérdida de virulencia y a una menor reactividad con los anticuerpos específicos de *Brucella*. A nivel molecular, la variación antigénica es el resultado de la menor expresión de los genes que codifican la glucosilación adicional de las porciones polisacáridas del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular.⁷³⁰ Los microorganismos que se encuentran en la fase lisa tienen un LPS de tipo liso (S-LPS) y son resistentes a la destrucción intracelular por los leucocitos polimorfonucleares (PMN), presumiblemente al inhibir la desgranulación de los lisosomas y el estallido respiratorio asociado con la activación de los PMN.^{19,1072} Fuera de la variación antigénica de los LPS y su relación con la virulencia, las especies de *Brucella* no producen exotoxinas y se sabe muy poco más en relación con otros mecanismos de virulencia en esas especies.

El LPS de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* contiene dos determinantes antigénicos importantes denominados A (por "Abortus") y M (por "Melitensis").¹⁸⁹ Además de proporcionar marcadores para las determinaciones de las biovariedades, estas moléculas cumplen un papel en la virulencia del microorganismo, ya que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el S-LPS son protectores en modelos de animales expuestos y las cepas lisas que han perdido el S-LPS por mutagénesis de transposones tienen una patogenicidad atenuada en los ratones.⁸⁸⁸ Las cadenas O (antígeno somático) del S-LPS de cepas lisas de *B. melitensis* y *B. abortus* están compuestas por polímeros de 4,6-didesoxi-4-formamido-D-manosa (*N*-formil-D-perosamina). En S-LPS de *B. abortus*, la cadena O contiene aproximadamente 100 residuos, casi todos los cuales tienen uniones $\alpha_{1,2}$ y un pequeño porcentaje tiene uniones $\alpha_{1,3}$ (determinantes A). En las cadenas O de *B. melitensis*, las uniones $\alpha_{1,2}$ y $\alpha_{1,3}$ ocurren en una relación 4:1 (determinantes M). El antígeno A serodominante suele tener forma de bacilo, la cual está determinada por los cinco residuos consecutivos con uniones

α_{12} , mientras que el antígeno M serodominante tiene forma "retorcida" porque el cuarto residuo está unido al quinto por una unión α_{13} . La expresión común de N-formil-D-perosamina no terminal con unión α_{12} es responsable de la reactividad cruzada observada entre S-LPS de las cepas lisas de *B. abortus* y las cepas lisas de *B. melitensis* y de la reactividad cruzada que se observa con otras especies (p. ej., *Vibrio cholerae* O:1, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30 y *Stenotrophomonas maltophilia*).¹⁸⁹ Se utiliza la aglutinación en portaobjetos o la EIA con anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para los epítomos A o M para determinar la preponderancia de antígeno A o M y las designaciones de las serovariedades de cepas de *Brucella*.^{189,453} Las cepas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* pueden ser antígeno A positivas, antígeno M positivas o tanto antígeno A como antígeno M positivas. Los determinantes antigénicos A y M no se encuentran en *B. canis* o *B. ovis*; estas especies son característicamente rugosas, no muestran variación de fase y tienen un número limitado de huéspedes.

Las especies de *Brucella* son microorganismos intracelulares facultativos, y el espectro de sus enfermedades se explica en parte por su capacidad para evadir los mecanismos de defensa del huésped en virtud de la existencia intracelular. Las brucelas son transmitidas a los seres humanos por tres vías principales: contacto directo con tejidos animales infectados, ingestión de carne o productos lácteos contaminados e inhalación de micropartículas en suspensión con microorganismos.^{283,1042} Una vez en el interior del huésped, los microorganismos son fagocitados pero no pueden sobrevivir dentro de las células, presumiblemente por la supresión o inactivación mediada por monofosfato de adenina y guanina de los mecanismos de defensa de mieloperoxidasa-peroxidasa intracelulares y por la producción de superóxido dismutasa, que bloquea la formación de radicales tóxicos del oxígeno.^{173,198} Los microorganismos son transportados a través de los ganglios linfáticos y el torrente circulatorio y son retenidos en distintas partes del sistema retículo-endotelial: sinusoides hepáticos, bazo y médula ósea.⁸⁵⁶ En estos sitios, los PMN finalmente se degeneran y liberan los microorganismos intracelulares. Por su parte, los macrófagos y los monocitos incorporan las bacterias por endocitosis. La multiplicación continúa en el interior de estas células, las cuales finalmente son destruidas y liberan los microorganismos. El patrón "ondulante" de fiebre creciente y decreciente observado en la brucelosis se asocia con la liberación periódica de bacterias y sus componentes desde las células fagocíticas. La liberación de las bacterias en la circulación periférica conduce a la siembra hematógena de otros órganos y tejidos, lo que lleva así a las manifestaciones clínicas proteiformes de la brucelosis humana. Se mantienen controladas las recaídas y recurrencias de las enfermedades en cierta medida por un equilibrio entre la virulencia del microorganismo y la presencia de una respuesta inmunitaria celular funcional intacta. Como sucede con otros patógenos intracelulares, se producen anticuerpos humorales, pero se necesitan los mecanismos de defensa de inmunidad celular del huésped para contener las bacterias intracelulares. Se sabe que las citocinas producidas por los macrófagos activados, que incluyen factor de necrosis tumoral α (TNF- α), TNF- γ , interleucina-1 (IL-1) e IL-2, influyen en la actividad antibrucelosa mediada por macrófagos durante la inducción de las respuestas inmunitarias mediadas por células.²⁸⁴ Caron y cols. han mostrado que las brucelas sintetizan y liberan un factor proteico de alto peso molecular que inhibe específicamente la expresión de TNF- α en los macrófagos activados humanos. Es probable que esta inhibición contribuya a la capacidad de

las especies de *Brucella* para evadir las defensas del huésped humano y mantener una existencia intracelular.²⁰³ Cabe destacar que se ha observado que los antígenos proteicos ribosómicos intracelulares designados L7/L12 estimulan las respuestas inmunes celulares protectoras junto con una hipersensibilidad retardada.⁹⁶⁶ En consecuencia, estas proteínas se están investigando por su potencial para utilizarse como antígenos para eventuales vacunas. El espectro clínico de la brucelosis depende de muchos factores, como el estado inmunitario del huésped, la presencia de otras enfermedades o trastornos subyacentes y las especies del microorganismo infectante. La mayor virulencia de *B. melitensis* y *B. suis* ha sido apoyada por estudios in vivo con animales infectados experimentalmente y por la investigación in vitro que examinó la fagocitosis, la supervivencia intracelular y las respuestas linfocíticas a las diferentes especies. Las enfermedades causadas por *B. abortus* y *B. canis* son insidiosas en su inicio, pero tienden a producir síntomas inespecíficos más leves y complicaciones menos graves.

Como estos microorganismos son infectantes a través de aerosoles, como lo demuestran las infecciones adquiridas en el laboratorio, las especies de *Brucella* constituyen una de varias bacterias que se consideran agentes potenciales para la guerra biológica y los atentados de bioterrorismo. Las brucelas podrían propagarse eficazmente mediante la dispersión de aerosoles y sobrevivir en el suelo y en el agua durante varias semanas, lo que proporciona así tanto un período inmediato como tardío de infecciosidad. Los Estados Unidos investigaron a *B. suis* como arma potencial durante las décadas de 1940 y 1950 y es probable que otras naciones hayan realizado intentos similares.²⁵³ Los informes de presentaciones clínicas atípicas, junto con pruebas serológicas falsas para anticuerpos contra brucelas, han conducido a investigaciones que involucran a los CDC y al FBI en relación con actividades fehacientes de bioterrorismo con especies de *Brucella*.²¹¹ No existe ninguna vacunación contra brucelas, ya que la vacuna contra *B. abortus* está autorizada sólo para uso veterinario. El tratamiento preventivo con doxiciclina y rifampicina después de la exposición ha sido eficaz para evitar la enfermedad en los individuos en riesgo.⁴³⁴

Espectro clínico de la brucelosis

Puede ser difícil diagnosticar infecciones por brucelas debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas asociadas con ellas.^{1042,1421} Luego de un período de incubación de unas 2 a 3 semanas (rango, 1 semana a 2-3 meses), el inicio de los síntomas puede ser brusco o desarrollarse en un período de varios días a más de una semana. La fiebre, el sudor nocturno, los escalofríos y el malestar general, a menudo asociados con cefalea intensa, mialgias y artralgias, son síntomas inespecíficos observados en la mayoría de los casos de brucelosis. La mayoría de los individuos con la forma bacteriémica presentan enfermedad febril sola o con fiebre y artritis.⁸⁵⁶ También se pueden presentar linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia.^{10,923} Se pueden observar manifestaciones cutáneas y complicaciones vasculares (p. ej., lesiones similares al eritema nudoso, erupciones maculopapulosis o papulonodulosas; trombosis venosa profunda) en algunos pacientes, y las lesiones mucocutáneas ulcerativas y los abscesos subcutáneos son más infrecuentes.^{54,267,854,867,958} "Fiebre ondulante" es sinónimo de brucelosis (sobre todo la causada por *B. melitensis*) debido a las fiebres periódicas que pueden ocurrir en semanas, meses o incluso años.¹⁴²¹ La fiebre suele aparecer al atardecer y por la noche, y durante el día la temperatura es normal, en un período de 2 a 3 semanas. Después, puede haber varios días en que

el paciente está afebril y se siente relativamente bien, sólo para experimentar otro ciclo de fiebre creciente y decreciente. Estos síntomas pueden ir y venir durante períodos prolongados debido a la retención de los microorganismos en granulomas en el tejido y su liberación ulterior (o de componentes de los microorganismos, como el LPS) nuevamente en la circulación. Por lo tanto, la afección se presenta en forma inespecífica y adopta las características de una enfermedad crónica y debilitante. En general, la cronicidad se debe a los focos persistentes de infección, como lesiones supuradas en las articulaciones, los huesos, el hígado o el bazo. A menudo en estos pacientes se toman punciones con el fin de determinar la etiología de la "fiebre de origen desconocido". La brucelosis aguda y la crónica pueden conducir a complicaciones que afectan varios sistemas orgánicos, como el sistema esquelético, el sistema nervioso central, el aparato respiratorio, el tracto hepatobiliar y el tubo digestivo, los aparatos cardiovasculares y genitourinario.²⁷⁴ En los huéspedes inmunodeprimidos que reciben inmunoterapia, la neutropenia febril prolongada que no responde a la cobertura antibiótica de amplio espectro es sugestiva de una infección por brucela, sobre todo en las regiones donde la infección es endémica.¹¹³⁵ En el recuadro 9-10 se ofrecen otros detalles sobre las presentaciones clínicas y la complicación de la brucelosis.

También se pueden presentar distintos tipos de discrasias hematológicas debido a la permanencia del microorganismo en el sistema reticuloendotelial, que incluyen ganglios linfáticos, médula ósea y bazo. Éstas pueden ser la formación de granulomas y abscesos directamente en estos tejidos o manifestaciones hematológicas periféricas.^{73,923} Se pueden observar pequeños granulomas no caseificados mal definidos en la médula ósea en alrededor del 70% de los casos, junto con histiocitos con una reactividad inespecífica.⁹ También se observó leucopenia, pancitopenia, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia grave en pacientes con brucelosis.^{9,334,1162,1422} En ocasiones, predominan anomalías hematológicas en la infección incipiente, lo que enmascara la etiología infecciosa de la enfermedad e imita las enfermedades hematológicas primarias.³³⁴ Estas anomalías son transitorias y se normalizan luego del tratamiento antibiótico exitoso para la infección bacteriana.

Diagnóstico serológico de la brucelosis

Las pruebas serológicas también son útiles para el diagnóstico de brucelosis y la prueba de aglutinación sérica (SAT) es la más utilizada. Esta prueba utiliza un antígeno de *B. abortus* comercial estandarizado (BD Biosciences), se realiza como una prueba de dilución en tubo y detecta aglutinógenos de las clases IgG e IgM.¹⁴²⁰ La incorporación de ditiotretol o 2-mercaptoetanol en la prueba en tubo inactiva la IgM, y proporcionan así un título de aglutininas específico de IgG. Algunos estudios han mostrado que, con la infección, se producen anticuerpos IgM durante los 7 a 10 primeros días, seguido de una declinación en IgM y un cambio a la producción de IgG después de la segunda semana. La mayoría de los pacientes con brucelosis activa presentan títulos de aglutinación sérica ≥ 160 ; estos títulos descienden con el tratamiento adecuado.⁶⁷²

Como sucede con otras muchas pruebas serológicas, se han explotado métodos menos laboriosos y subjetivos, como enzimo-inmunoanálisis (EIA) para el diagnóstico serológico de infecciones por *Brucella*. Se describió EIA para la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA contra *Brucella* que utilizan células enteras de *B. abortus*, LPS liso de *B. abortus*, extractos proteicos de *B. abortus* y LPS liso de *B. melitensis* como antígeno de fase sólida.^{52,977,1420} Ariza y cols. compararon la prueba de

aglutinación sérica con los métodos de EIA para la detección de IgG, IgM e IgA específicos de *Brucella* en 761 sueros obtenidos de 75 pacientes con brucelosis.⁵² El EIA en este estudio incorporó S-LPS de *B. abortus* como antígeno. Estos investigadores observaron que los métodos de EIA eran tan sensibles y más específicos que las pruebas serológicas estandarizadas para la brucelosis. Los títulos iniciales de IgM fueron más altos en los pacientes que consultaron al médico antes en el curso clínico, mientras que los que habían estado enfermos durante cierto tiempo antes de buscar asistencia médica tendieron a tener títulos elevados de IgG y títulos más bajos de IgM. Con la recepción de un tratamiento antibiótico suficiente, los títulos de IgG en suero disminuyeron cuatro a ocho veces en los 3 a 6 meses posteriores. Se observaron aumentos ulteriores de IgG e IgA en EIA de pacientes con enfermedad recurrente. La persistencia de concentraciones elevadas de IgG o una disminución más lenta de los títulos luego del tratamiento en los pacientes sin recaídas se asoció con la presencia de infección local.⁵² También se pueden presentar IgM e IgG antibruelas durante los períodos bacteriémicos.⁹⁷⁷ En los programas de control y erradicación de la brucelosis se utiliza también la SAT y otros métodos serológicos, como fijación del complemento y MAT (una adaptación de la SAT en microplacas).¹⁰¹ En 1993, Goldbaum y cols., en la Argentina, caracterizaron una proteína citoplasmática de 18 kDa que estaba presente en todas las especies de *Brucella* lisas y rugosas examinadas.⁴⁷³ Los sueros de pacientes que tenían infecciones activas por brucelas reaccionaron con este antígeno en un ensayo basado sobre EIA, mientras que los pacientes que no tenían brucelosis o que tenían una enfermedad inactiva fueron negativos con esta prueba. Este EIA también pudo diferenciar el ganado bovino sano vacunado del ganado vacunado infectado por una cepa de tipo silvestre, productora de enfermedad. Este antígeno ha sido purificado mediante cromatografía de afinidad y se ha clonado el gen para el antígeno en *E. coli*, con retención de la reactividad de la molécula recombinante con sueros animales y humanos que contienen anticuerpos antibrucelosos.⁴⁷⁴ Esta molécula ha sido caracterizada como una lumazina sintasa, enzima involucrada en la biosíntesis de la riboflavina.

Al-Shamahy y Wright comunicaron recientemente sobre un EIA para la detección de antígenos para brucelosis.²² La prueba utilizaba anticuerpos monoclonales contra el LPS de brucelas y se realizó en muestras de suero. Se podrían detectar tan sólo 100 microorganismos o 10^5 fg/mL de LPS. Este ensayo fue probado con 1 607 sueros de donantes de sangre al azar, 146 pacientes con brucelosis, 20 pacientes con riesgo de infección por *Brucella* y 264 sueros de pacientes con infecciones distintas de la brucelosis. La sensibilidad del ensayo fue del 100% comparada con los hemocultivos positivos; la especificidad fue del 99,5% entre los donantes de sangre al azar y del 99,2% para los pacientes. Estos datos indicaron que la detección de antígeno utilizando este ensayo era una alternativa aceptable al hemocultivo para el diagnóstico de la infección.

Aislamiento y características de los cultivos

Como las especies de *Brucella* infectan el sistema reticuloendotelial, las muestras de elección en los casos sospechosos incluyen muestras de sangre y médula ósea. En un estudio de 50 pacientes que finalmente tuvieron diagnóstico de brucelosis, los cultivos de sangre y médula ósea fueron positivos en el 70% y el 92% de los casos, respectivamente.⁴⁹⁰ La alta tasa de cultivos de médula ósea positivos es compatible con la retención de

Recuadro 9-10 Espectro clínico de la brucelosis**Infecciones osteoarticulares**

La afectación del hueso y la articulación, que incluye artritis, bursitis, sacroileítis, espondilitis y osteomielitis, es la complicación más descrita de la brucelosis y se observa más a menudo luego de la bacteriemia por *B. melitensis*.^{11,106,120} La artritis y la sacroileítis se asocian con enfermedad aguda en pacientes pediátricos, mientras que espondilitis, osteomielitis vertebral, osteítis y absceso paravertebral se observan más a menudo en infecciones crónicas en individuos mayores y en aquellos que tienen enfermedad subyacente (p. ej., infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [HIV]).^{11,94,446,120} Los pacientes con espondilitis suelen presentar fiebre, malestar general, dolor dorsal bajo y dificultad en la deambulación. Los centellogramas óseos, la tomografía computarizada y la resonancia magnética a menudo son útiles para detectar invasión ósea y complicaciones como absceso paraespinal.^{811,120} La osteomielitis brucelósica también puede afectar tanto implantes protésicos articulares como no articulares.^{813,927}

Infecciones del sistema nervioso central

La neurobrucelosis ocurre en menos del 5% de los casos e inicialmente se presenta como encefalitis, meningitis, meningoencefalitis, meningomielitis o ataxia cerebelosa.^{4,519} Los pacientes en general tienen pleocitosis de LCR, hiperproteínoorraquia y glucosa baja a normal en el LCR. Los pacientes con meningitis aguda presentan cefalea, vómitos, fiebre y rigidez de nuca, y en algunos pacientes se puede desarrollar edema de papila, síntomas visuales y parálisis de nervios craneales. La trombosis de los vasos sanguíneos puede conducir a infarto y hemorragia cerebrales, encefalitis, mielitis y neuropatía periférica.⁴ Los abscesos espinales epidurales, el empiema subdural, los abscesos paraespinales, los quistes dermoides intramedulares y los abscesos encefálicos son raros pero se observan en ocasiones.^{268,1000,1132,1173} La infección del SNC conduce a colonización de una derivación ventriculoperitoneal y el desarrollo ulterior de peritonitis por *B. melitensis* también se ha documentado.³⁰ El cultivo de brucelas del LCR es negativo en más del 75% de los casos, aunque los hemocultivos pueden ser positivos.⁵¹⁹ La enfermedad brucelósica del SNC también puede diagnosticarse mediante pruebas serológicas del LCR. En general el tratamiento comprende triple antibióticoterapia, que incluye un aminoglucósido y debe ser continuada durante 8 a 12 semanas.^{4,519}

Infecciones del aparato respiratorio

Las infecciones pulmonares por *Brucella* pueden ser resultado de diseminación hematógena y la siembra de los pulmones o por inhalación directa de los microorganismos en aerosoles.¹¹³¹ Las manifestaciones clínicas de la brucelosis pulmonar pueden incluir bronquitis, bronconeumonía, absceso pulmonar, nódulos pulmonares, linfadenopatía hilar, neumonitis intersticial, empiema y derrames pleurales.^{1,679} En general los pacientes presentan cefalea, malestar general, mialgias y tos no productiva.¹¹³¹ Sólo el 40% de los pacientes con tos tienen radiografías de tórax anormales.

Infecciones gastrointestinales y del tracto hepatobiliar

La brucelosis gastrointestinal, hepatobiliar o hepatoesplénica ocurre como manifestación de la infección sistémica aguda en más del 70% de los pacientes con brucelosis. Los síntomas son dolor abdominal, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea o estreñimiento. Las infecciones de larga data pueden conducir a una patología gastrointestinal más extensa, que incluye colitis, enterocolitis, peritonitis bacteriana espontánea, pancreatitis, colecistitis, abscesos hepatoesplénicos e infartos esplénicos.^{273,274,320,742,875,957,1115,1121} La afectación hepática puede reflejarse sólo en elevaciones de las enzimas hepáticas, pero habitualmente es más extensa, sobre todo en las infecciones por *B. melitensis* y *B. suis*. Las infecciones por estas dos especies se asocian con la formación de granulomas hepáticos caseificantes y microabscesos, mientras que *B. abortus* tiende a producir granulomas no caseificantes en el hígado. El manejo de las complicaciones supuradas de la brucelosis hepatoesplénica crónica requiere el abordaje quirúrgico y clínico combinado para obtener una respuesta clínica óptima.^{53,1416} En el año 2002, se describió una peritonitis por *B. melitensis* asociada con diálisis peritoneal ambulatoria crónica en un paciente en Turquía.¹²⁶³ El paciente, que probablemente se infectó por la ingestión de queso no pasteurizado un mes antes, sufrió una recaída luego del tratamiento con doxiciclina y rifampicina; se obtuvo la curación con el tratamiento antibiótico continuo y la extracción del catéter de Tenckhoff.

Infecciones del aparato genitourinario

Las brucelas pueden afectar el aparato genitourinario, habitualmente como consecuencia de infección sistémica, en la cual pueden producir epididimitis, prostatitis, orquitis y granulomas renales.^{724,918} Aunque la afectación renal es bastante infrecuente, se ha comunicado glomerulonefritis y pielonefritis. Las brucelas producen aborto en animales infectados por la localización en las membranas corioamnióticas de la placenta, pero existen pocas pruebas que apoyen un papel para estos microorganismos en el aborto espontáneo en los seres humanos.⁹⁷⁶ Sin embargo, rara vez los microorganismos pueden ser aislados del líquido amniótico y de tejidos placentarios de seres humanos con brucelosis.¹⁴²¹ Malone y cols. describieron la infección materna por brucelosis que condujo a trabajo de parto prematuro, corioamnionitis, desprendimiento prematuro de placenta y parto de un lactante a la edad gestacional de 25 semanas.⁸¹⁴ Se aisló *B. abortus* de la sangre materna y del líquido amniótico. La comunicación de un caso en 1998 detalla el primer relato de la transmisión sexual de *B. abortus*.¹²⁷⁰

Infecciones cardiovasculares

La brucelosis cardiovascular es una complicación rara, y se presenta en menos del 2% de los pacientes infectados.^{219,1115} Es interesante destacar que la endocarditis por brucelas es la causa principal de muerte relacionada con esta enfermedad.⁵²¹ Puede presentarse endocarditis tanto en válvulas naturales como protésicas; la afectación de la válvula aórtica es la más frecuente.^{5,58,1044} Las complicaciones de la endocarditis por *Brucella* son embolia séptica, aneurismas micóticos, miocarditis, pericarditis y la necesidad de la intervención quirúrgica para la colocación o el reemplazo de una válvula protésica.^{5,58,219,521} Se ha comunicado también la infección por *B. melitensis* de un marcapasos y de los electrodos asociados en un esquilador de ovejas de 45 años que se había sometido a 45 días de tratamiento para la brucelosis.³¹⁰ En 1999, Ying y cols. describieron un caso de endocarditis por *B. canis* confirmada serológicamente que ocurrió en un hombre de 49 años después de que regresó de Kuwait.¹⁴¹⁹

Infecciones oculares

Las infecciones oculares son complicaciones tardías y raras de la infección por brucelas e incluyen neuritis óptica, uveítis, queratitis, endoftalmitis e infección de las glándulas lagrimales.^{16,105,373} La neuritis óptica se asocia con pérdida de visión, fiebre, cefalea temporal y dolor retrobulbar. La endoftalmitis es el resultado de la diseminación hematógena y se han obtenido cultivos positivos tanto del humor acuoso como del humor vítreo.

estas bacterias en el sistema reticuloendotelial. En ocasiones, se pueden enviar otras muestras (p. ej., tejido, biopsias, LCR) para cultivo de pacientes en los cuales se sospecha una enfermedad complicada.

Debido al riesgo documentado de infecciones por especies de *Brucella* adquiridas en el laboratorio, todas las investigaciones con muestras de las que se sospecha que las albergan y todas las manipulaciones con cultivos de *Brucella* deben realizarse en un gabinete de seguridad biológica con las precauciones recomendadas para microorganismos que requieren bioseguridad de nivel 3 (p. ej., micobacterias, *Francisella tularensis*).^{265,412,502,1299,1300} Los procedimientos que pueden generar aerosoles (aspiración de líquidos con jeringas, preparados con molinillos, sopleteado energético de pipetas, etc.) deben mantenerse en un mínimo. Sin duda, para cumplir con estas pautas, es necesaria una comunicación cuidadosa entre el director del laboratorio, los técnicos y los médicos que asisten a los pacientes con presunta brucelosis. El médico debe advertir al personal del laboratorio clínico cuando considera un diagnóstico de brucelosis para que adopte las precauciones de seguridad necesarias.

Para el aislamiento de especies de *Brucella*, se inoculan muestras de sangre y médula ósea en frascos para aerobios y anaerobios. Debido al lento crecimiento de los microorganismos, los hemocultivos convencionales deben ser incubados a 35 °C durante 4 a 6 semanas realizando subcultivos a ciegas en agar chocolate y agar sangre (véase lámina en color 9-5D). Los laboratorios que utilizan instrumentos para hemocultivo radiométricos o no radiométricos con monitorización continua suelen aislar las especies de *Brucella* de los hemocultivos después de 5 a 7 días de incubación.^{361,978,1402} Yagupsky evaluó la capacidad del instrumento no radiométrico BACTEC 9240 para detectar el crecimiento de especies de *Brucella* y observó que se detectaban 21 (78,8%) de 27 cultivos positivos mediante el instrumento 9240 dentro de los 7 días; el resto se detectó mediante un subcultivo a ciegas después de 2 a 3 semanas de incubación.¹⁴⁰⁹ El BACTEC 9240 también detectó 14 de 15 cultivos positivos para *Brucella* de líquidos sinoviales inoculados en frascos de cultivo Peds Plus; los 14 cultivos positivos fueron detectados en 3 a 7 días.¹⁴⁰⁸ El microorganismo también ha crecido con éxito después de 12 días de incubación utilizando el sistema Septi-Chek, en el cual se fija el frasco de hemocultivos para aerobios con una "paleta" que contiene medios de agar chocolate y agar sangre y se realizan "subcultivos" invirtiendo el frasco de modo que el medio se lava sobre la paleta de agar.⁴⁹² Los frascos para aerobios estándares BacT/Alert, para aerobios reforzados BacT/Alert FAN y BacT/Alert sostienen el crecimiento rápido de brucelas según lo demuestran los estudios de hemocultivos simulados.¹²³⁸ También se ha logrado un rápido crecimiento de especies de *Brucella* en los hemocultivos con el método de lisis-centrifugación Isolator.¹⁴¹⁰

Identificación de especies de *Brucella*

Se puede realizar el diagnóstico presuntivo de una posible especie de *Brucella* cuando se aísla un coccobacilo diminuto, que se tiñe poco y que crece lentamente en hemocultivos o cultivos de médula ósea de un paciente "compatible", es decir, aquel que tiene antecedentes de una posible exposición ocupacional, un viaje a un lugar "exótico" o ingestión de carnes poco cocidas o de productos lácteos no pasteurizados. Las especies de *Brucella* crecen lentamente en agar sangre y agar chocolate, pero no en los medios de agar de MacConkey, EMB u otros medios "entéricos". También se obtiene buen crecimiento en

agar carbón-extracto de levadura con buffer utilizado para el aislamiento de especies de *Legionella*.¹⁰⁴¹

Todas las especies de *Brucella* son aerobias y necesitan oxígeno para el crecimiento a partir de muestras clínicas. Aunque se puede demostrar la producción de ácidos por la degradación de hidratos de carbono en ciertas condiciones, su metabolismo en gran parte es oxidativo. Las cepas de *Brucella* son tanto oxidasa como catalasa positivas; la mayoría de las brucelas reducen el nitrato a nitrito y algunas pueden reducir también el nitrito a gas. Todas las especies son indol negativas y VP negativas. La identificación de las especies de *Brucella* por métodos convencionales incluye el requerimiento de CO₂ para el crecimiento, la producción de ureasa y H₂S (utilizando tiritas de acetato de plomo) y la sensibilidad a los colorantes básicos fucsina, tionina y azul de tionina (cuadro 9-12). La sensibilidad a los colorantes no sólo se utiliza para ayudar a la identificación de las especies, sino en el caso de *B. abortus* y *B. suis*, también es útil para determinar la biovariedad del microorganismo. *B. abortus* y *B. suis* son subdivididos en biovariedades sobre la base de diferencias bioquímicas y serológicas, mientras que las biovariedades (en realidad serovariedades) de *B. melitensis* están definidas sólo sobre la base de diferencias serológicas, dado que clásicamente son resistentes a fucsina básica, tionina y azul de tionina. El reconocimiento de cepas de *B. melitensis* confirmadas serológicamente que son sensibles a la tionina sugiere que el esquema de identificación convencional debe ser modificado y que se necesitan nuevos métodos de identificación menos problemáticos.²⁸² *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* producen ureasa; con un inóculo importante, las cepas de *B. suis* habitualmente son ureasa positivas en el medio de urea de Christensen dentro de los 5 minutos. La identificación de especies de *Brucella* también se ha logrado mediante coagulación y manchado con puntos de las colonias utilizando un anticuerpo monoclonal específico de género que detecta los antígenos A o M de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*.¹³³⁴

En la actualidad, las especies de *Brucella* no están incluidas en las bases de datos de ninguno de los sistemas comerciales disponibles para la identificación de microorganismos gramnegativos y el uso inadvertido de estos sistemas puede retrasar el diagnóstico y el tratamiento. Los microorganismos *Brucella* han sido diagnosticados erróneamente como *Moraxella phenylpyruvica* mediante el sistema de identificación no entérico API 20NE, como especies de *Moraxella* por el sistema MicroScan Negative COMBO tipo 5 (Dade-MicroScan, West Sacramento, CA) y como *Haemophilus influenzae* tipo IV por el panel de identificación para *Haemophilus-Neisseria* (HNID) (Dade-MicroScan).^{91,99} En uno de los casos, el técnico que inoculó una tirita de API 20NE con una cepa de *B. melitensis* se enfermó, posteriormente, de brucelosis.⁹⁹ Algunos estudios preliminares de la identificación de especies de *Brucella* con el sistema de identificación mediante sustratos de carbono indicaron que todas las especies de *Brucella* oxidaban 3 de los 95 sustratos del panel y que *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* podían ser diferenciadas entre sí por la oxidación diferencial de otros siete sustratos.¹³⁹¹ Utilizando los resultados de siete pruebas sobre el Biotipo 100 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia), una galería de identificación de sustratos de carbono inoculada en forma manual, Lopez-Merino y cols. pudieron identificar el 85,6% de 92 cepas de *Brucella*; la especificidad varió del 97,4% al 100%, según la especie.⁷⁹⁹ Estos investigadores señalaron que el Biotipo 100 debe ser inoculado en un gabinete de seguridad biológica.

En 1994, Bricker y Halling, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, crearon una prueba de PCR

Cuadro 9-12 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Brucella*

ESPECIES	BIOTIPO	REQUERIMIENTOS DE CO ₂	H ₂ S	UREASA	CRECIMIENTO							HUÉSPED COMÚN
					FUCSINA BÁSICA	TIONINA		TIONINA AZUL	AGLUTINACIÓN SEROLÓGICA*			
					20 µg	20 µg	40 µg	2 µg/mL	A	M	R	
<i>B. melitensis</i>	1	—	—	Variable	+	+	+	+	—	+	—	Ovejas
	2	—	—	Variable	+	+	+	+	+	—	—	Ovejas
	3	—	—	Variable	+	+	+	+	+	+	—	Ovejas
<i>B. abortus</i>	1	+/-	+	1–2 h	+	—	—	+	+	—	—	Ganado vacuno
	2	+/-	+	1–2 h	—	—	—	—	+	—	—	Ganado vacuno
	3	+/-	+	1–2 h	+	+	+	+	+	—	—	Ganado vacuno
	4	+/-	+	1–2 h	+/-	—	—	+	—	+	—	Ganado vacuno
	5	—	—	1–2 h	+	—	+	+	—	+	—	Ganado vacuno
	6	—	+/-	1–2 h	+	—	+	+	+	—	—	Ganado vacuno
	7	—	+	1–2 h	+	—	+	+	—	+	—	Ganado vacuno
<i>B. suis</i>	1	—	+	0–30 min	–/v	+	+	–/v	+	—	—	Cerdos
	2	—	—	0–30 min	—	—	+	—	+	—	—	Cerdos, caballos
	3	—	—	0–30 min	+	+	+	+	+	—	—	Cerdos
	4	—	—	0–30 min	–/v	+	+	—	+	+	—	Renos
	5	—	—	0–30 min	—	+	+	ND	—	+	—	Roedores
<i>B. canis</i>		—	—	0–30 min	—	+	+	–/v	—	—	+	Perros
<i>B. ovis</i>		+	—	—	–/v	+	+	—	—	—	+	Ovejas
<i>B. neotomae</i>		—	+	0–30min	—	—	—	+	+	—	—	Rata de bosque

+: positivo; –: negativo; +/-: variable, pero la mayoría de las cepas son positivas; –/v: variable, pero la mayoría de las cepas son negativas; ND: no disponible.
*A: antisuero específico para *B. abortus*; M: antisuero monoespecífico para *B. melitensis*; R: suero antibrucelas rugosas.

que pudo identificar y diferenciar varias especies y biovariedades de *Brucella*, incluida *B. abortus* biovariedades 1, 2 y 4, las tres biovariedades de *B. melitensis*, *B. suis* biovariedad 1 y todas las biovariedades de *B. ovis*.¹⁷¹ Este ensayo explotó la existencia de una secuencia de inserción IS711 (también denominado IS6501) que es única de las especies de *Brucella* y se encuentra en las regiones específicas de especie y específicas de biovariedad del cromosoma. Las especies y las biovariedades identificadas mediante este ensayo constituyen la mayoría de las observadas en los Estados Unidos, tanto en infecciones animales como humanas. Estos investigadores aumentaron más tarde su ensayo de PCR con otros cebadores para permitir la rápida discriminación entre cepas patogénicas y las cepas de la vacuna para *B. abortus* (S19 y RB51) en ganado bovino ya vacunado.^{172,390} El ensayo se denomina AMOS PCR porque detecta *Brucella* "Abortus, Melitensis, Ovis y Suis", respectivamente. También se han creado sondas genéticas específicas de proteínas citoplasmáticas para la diferenciación de ciertas biovariedades de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. Estos enfoques moleculares son útiles para la identificación de especies y biovariedades en los laboratorios diagnósticos y para objetivos epidemiológicos, veterinarios y taxonómicos.^{26,1324}

Además del AMOS PCR, se han desarrollado otros ensayos basados sobre PCR que utilizan la misma diana u otras dianas de amplificación para la identificación y la detección directa de especies de *Brucella* en muestras clínicas. Herman y DeRidder describieron una prueba de hibridación en manchas (*dot blot*) para la identificación de especies de *Brucella* utilizando cebadores sintéticos y sondas para una secuencia de DNA específica de género e invariable.⁵⁶³ Fox y cols. analizaron los polimorfismos de amplicones luego de la amplificación con PCR de la región espaciadora de DNA ribosómico 16S-23S y observaron que, aunque los productos eran singulares del género *Brucella*, los perfiles de espacios de las cuatro especies principales eran idénticos.⁴³¹ Casanas y otros autores desarrollaron en España un ensayo de PCR que utilizó cebadores específicos para una región de 223 pares de bases de la secuencia de DNA que codifica una proteína de *B. abortus* inmunogénica de 31 kD.²⁰⁶ Este ensayo fue evaluado con sueros de 31 pacientes con brucelosis y 45 controles sanos; se detectó DNA de brucelas en 30 de 31 pacientes y tuvo una especificidad del 100%.¹⁴³² También se han desarrollado ensayos de PCR que utilizaron el rRNA 16S de *B. abortus* y el gen para una proteína de membrana externa de *B. abortus* (*omp-2*) como dianas de amplificación.⁹²⁶ Se describieron ensayos de PCR en tiempo real que utilizan cebadores derivados del sitio de inserción IS711 específico de género y secuencias características específicas de especie y de biovariedad.¹⁰⁵⁴ Estos ensayos de 30 minutos que utilizan el método de LightCycler fueron evaluados con cepas conocidas y microorganismos aislados en campo e identificaron a todas las biovariedades de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* biovariedad 1.

Tratamiento de la brucelosis

El tratamiento de la brucelosis humana es un área controversial debido al espectro de enfermedad, la posibilidad o probabilidad de una infección crónica y el desarrollo de complicaciones.¹⁰⁴² A pesar de la sensibilidad in vitro a muchos antibióticos, estos resultados no se traducen en eficacia clínica ni en resultados en los pacientes. El tratamiento exitoso requiere una antibioticoterapia prolongada, casi siempre con una combinación de agentes y, en algunos casos, la intervención quirúrgica también está indicada. La administración de agentes

que penetran y tienen actividad en las células fagocíticas es un prerrequisito para el tratamiento, dado que las brucelas son patógenos intracelulares facultativos. Tradicionalmente, el tratamiento recomendado era tetraciclina oral durante 6 semanas combinada con estreptomycin o gentamicina intramuscular diarios durante 2-3 semanas.¹⁴²¹ También se recomienda para el tratamiento doxiciclina (un derivado de la tetraciclina con mayor liposolubilidad y una vida media en suero más larga) y rifampicina administradas por vía oral por lo menos durante 6 semanas. El tratamiento de la brucelosis mediante monoterapia con alguna de las cefalosporinas más nuevas, como ceftriaxona, ha conducido a fracasos y no puede recomendarse.⁷⁴⁶ En general, las fluoroquinolonas muestran buena actividad contra las especies de *Brucella* in vitro.⁷⁰⁰ Un estudio prospectivo y aleatorizado evaluó la eficacia de ciprofloxacina contra rifampicina más doxiciclina en el tratamiento de la brucelosis aguda. Después del tratamiento durante 45 días, cinco de los seis pacientes tratados con ciprofloxacina sufrieron una recaída, a pesar de la sensibilidad in vitro y las bajas CIM de *B. Melitensis* aisladas.⁷⁴⁷ En un estudio turco, se comparó la eficacia clínica de una combinación de ofloxacina y rifampicina durante 6 semanas con la lograda con la combinación doxiciclina-rifampicina.⁶ Las fluoroquinolonas y las cefalosporinas más nuevas pueden mostrar mejor eficacia clínica cuando se utilizan combinadas con otros agentes.¹²⁹⁰

El tratamiento de la neurobrucelosis y la endocarditis requiere una terapia combinada y a menudo intervenciones quirúrgicas. En la neurobrucelosis, están contraindicados los regímenes con estreptomycin porque este fármaco no alcanza concentraciones terapéuticas en el SNC. Se recomiendan las terapéuticas combinadas con dos o tres agentes (p. ej., doxiciclina, rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol) que penetran el SNC y son activos contra la cepa infectante. El tratamiento adecuado de la endocarditis por brucelas, al igual que la causada por otros agentes bacterianos, requiere la administración de concentraciones bactericidas de antibióticos. Se ha utilizado con éxito la combinación de doxiciclina con rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol en el tratamiento de la endocarditis por brucelas. Aunque algunos de estos pacientes se han curado con quimioterapia antibiótica aislada, el mejor enfoque es la intervención quirúrgica (el reemplazo valvular) combinada con antibioticoterapia.^{521,1421}

Francisella tularensis

Epidemiología de la tularemia

La tularemia, infección causada por el cocobacilo gramnegativo con requerimientos nutricionales especiales *Francisella tularensis*, es una enfermedad de los animales que los seres humanos adquieren por contacto con ellos.³⁷² Los reservorios naturales de bacterias incluyen conejos, roedores, ardillas, ratas almizcleras, castores, ratones de campo, ciervos, lemmings (pequeños roedores del norte de Europa) y mapaches, y animales domésticos como vacas, ovejas, cerdos y caballos. Los cerdos, caballos y las vacas son bastante resistentes a la infección, mientras que las ovejas son relativamente susceptibles. El microorganismo es transmitido entre los animales por garrapatas y moscas mordedoras que pican, como los tábanos. La transmisión transovárica de *F. tularensis* también ocurre en la garrapata, lo que proporciona una fuente renovadora del microorganismo en el medioambiente. Las infecciones en los seres humanos se adquieren principalmente por las picaduras de

garrapatas, tábanos y mosquitos infectados, o por el contacto directo con sangre u órganos internos de animales infectados.¹¹⁵⁷ Entre las garrapatas, se sabe que por lo menos 13 especies diferentes tienen infecciones naturales por *F. tularensis*, y la garrapata del perro (*Dermacentor variabilis*) y la garrapata de la madera (*Dermacentor andersoni*) son las más frecuentes en América del Norte. Entre los cazadores, se han producido infecciones luego de quitar la piel, vestirse con sus pieles o ingerir animales infectados, que incluyen conejos, liebres, castores, ratas alimzcleras y ardillas. El agua contaminada también es una fuente importante del microorganismo en el medioambiente y han ocurrido infecciones en seres humanos luego de la ingestión de agua de pozos en los cuales se han hallado esqueletos de animales infectados.¹¹¹ La pesquisa epidemiológica de un brote grande de tularemia durante 1999-2000 en Kosovo condujo hasta los alimentos y el agua contaminados, y se identificó a los roedores como la fuente del microorganismo.¹⁰⁶¹ Se han producido infecciones adquiridas por transmisión aérea luego de la inhalación de polvo y heno que contenía heces y esqueletos de roedores. Las infecciones humanas también se han adquirido por la exposición o las mordeduras de gatos domésticos. En estos casos, la contaminación de la boca o las garras del gato luego de matar y alimentarse de la presa es el modo probable de adquisición del microorganismo, aunque los gatos también pueden contraer infecciones sistémicas.⁸ Se describió un caso en el cual un cirujano veterinario contrajo tularemia ulceroganglionar después de cortarse un dedo mientras realizaba una histerectomía a una gata.¹¹⁴³ *F. tularensis* es altamente contagioso: tan sólo 10 a 50 microorganismos administrados por vía intradérmica o por partículas en suspensión son suficientes para producir infección y el microorganismo puede penetrar fácilmente a través de lesiones diminutas e inaparentes de la piel.³⁷² La tularemia también se ha adquirido por accidentes de laboratorio ocurridos durante el procesamiento de muestras infectadas, el aislamiento y la identificación del microorganismo, y la manipulación de gran cantidad de microorganismos en circunstancias de investigación.

Antes de la Segunda Guerra Mundial, la tularemia era bastante frecuente, pero la incidencia declinó constantemente durante la década de 1950. Aunque la enfermedad se ha comunicado en todos los Estados Unidos, la mayoría de los casos ocurren ahora en los estados del sur y centro-sur (Missouri, Arkansas, Oklahoma y Texas); durante los meses estivales o a mediados del invierno y corresponden a picos de enfermedad asociada con vectores y enfermedad asociada con caza, respectivamente.⁶²⁴ Los varones se infectan más comúnmente que las mujeres, lo que está relacionado con la asociación de la infección con ciertas ocupaciones (p. ej., granjeros, veterinarios de grandes animales, cazadores, y esquiladores y pastores de ovejas).¹¹⁵⁷

Recientemente, se han planteado cuestiones vinculadas con el posible uso de *F. tularensis* como agente de guerra biológica y bioterrorismo.^{182,321,1077} En los Estados Unidos, fue investigado como agente de la guerra biológica en las décadas de 1950 y 1960, antes de concluir el programa de bioterrorismo ofensivo de ese país, y es probable que otros países también lo hayan investigado.²⁵³ En Fuerte Detrick, se expuso a animales y a voluntarios humanos tanto civiles como militares a aerosoles que contenían *F. tularensis* para determinar la infecciosidad del agente diseminado de esta forma y para evaluar la eficacia de las vacunas, los tratamientos profilácticos y los métodos terapéuticos.²⁵³ A causa de estas investigaciones, se consiguió una vacuna *F. tularensis* viva atenuada gracias al Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y la Organización Mundial de la

Salud como nuevo agente experimental. La cepa viva de la vacuna brinda una buena protección contra la forma neumónica de la tularemia y modifica los signos y los síntomas de la forma ulceroganglionar.¹¹⁸³ Kaufmann y cols., de los CDC, publicaron hace poco una descripción del mejor y el peor escenario que se plantearían si se liberaran microorganismos *F. tularensis* como una nube de aerosol como parte de un acto de bioterrorismo.⁶⁷⁴ Si la dosis infectante en aerosol de *F. tularensis* es de 50 a 100 microorganismos y se acepta una tasa de ataque del 82.5%, la exposición de 100 000 personas conduciría a 82 500 casos de tularemia neumónica. Con una tasa de mortalidad del 6.2%, se esperarían 6 188 muertes, con un impacto económico de entre 465 y 562 millones de dólares.

Reseña histórica y taxonomía

La tularemia fue descrita por primera vez en 1911 por McCoy como causa de una enfermedad similar a la peste en roedores durante sus investigaciones de la posible peste bubónica en la población de roedores en el área de San Francisco luego del terremoto devastador de 1906. McCoy y Chapin aislaron luego el agente causal y lo denominaron *Bacterium tularense*, por el condado de Tulare, California, el sitio de su laboratorio.³⁷² Desde 1912 hasta 1925, Edward Francis estuvo estudiando la enfermedad humana denominada “fiebre por tábanos” e hizo una correlación entre esta enfermedad y la “enfermedad similar a la peste” descrita por McCoy en los roedores. Este autor investigó los modos de transmisión, estudió el agente causal y acuñó el nombre “tularemia”. Este nombre refleja el del condado de Tulare, donde McCoy y Chapin aislaron el microorganismo y la “bacteriemia” que ocurre como una manifestación de infección. Por su trabajo pionero sobre el cultivo del microorganismo y los métodos para el diagnóstico serológico, los síndromes clínicos asociados y el reconocimiento de los reservorios y vectores principales, Francis recibió el Premio Nobel de 1959 en ciencia, y el nombre del microorganismo se cambió de *Bacterium tularense* a *Francisella tularensis* en su honor.

Al igual que otros microorganismos descritos en este capítulo, la ubicación taxonómica de *Francisella* es incierta.³⁶⁸ Con el correr de los años, ha sido clasificado provisoriamente como género “*Bacterium*” y se lo incluyó con las brucelas y las pasteurelas. Sin embargo, los análisis genético, fenotípico y de la pared celular no han demostrado ninguna relación con especies de *Brucella* o de *Pasteurella*, o con los miembros transmitidos por garrapatas del género *Yersinia* (*Y. pestis*). En consecuencia, se aceptó a *Francisella* como un género nuevo a mediados de la década de 1960. El examen de las secuencias de rRNA 16S estableció que *F. tularensis* pertenece a la γ -subdivisión de las proteobacterias y en la próxima edición del *Bergey's Manual* está incluido como único género en la familia propuesta “*Francisellaceae*” en el orden propuesto “*Triotricales*”.⁴⁵⁵

F. tularensis puede ser dividido en cuatro subespecies todas las cuales pueden producir tularemia, aunque difieren en su virulencia para seres humanos y conejos.^{450,646} *F. tularensis* subespecie *tularensis* (también denominado *F. tularensis* subespecie *nearctica* o biovariedad tipo A) predomina en los Estados Unidos, pero no es tan frecuente en Europa (aunque recientemente se reconoció esta subespecie en Eslovaquia), se asocia con garrapatas y conejos, y es virulento tanto en conejos como en seres humanos.^{512,646} Este biogrupo se caracteriza fenotípicamente por la producción de ácido a partir de glicerol y porque tiene citrulina ureidasa.^{819,1128} *F. tularensis* subespecie *holarctica* (antes denominado *F. tularensis* subespecie *palae-*

arctica o biovariedad tipo b) ha sido aislado en Europa, Asia, Japón y los Estados Unidos, produce infecciones en roedores que se transmiten a través del agua y cuyos vectores son garrapatas y mosquitos, tiene una virulencia intermedia en los seres humanos y es mínimamente virulento en los conejos.^{29,624} La enfermedad debida a la subespecie *holarctica* puede ser más frecuente en los Estados Unidos de lo que se pensaba.¹²⁹⁸ Las cepas subespecie *holarctica* son glicérol negativas y no suelen producir citrulina ureidasa. Se propusieron las denominaciones *F. tularensis* subespecie *mediaasiatica* para las cepas aisladas en el foco asiático central de la Unión Soviética y *F. tularensis* biogrupo *palaeartica japonica* para las cepas de Japón.¹¹²⁸ En un principio, los científicos soviéticos clasificaron a las cuatro como especies separadas, pero esta sugerencia no ha sido generalmente aceptada. Se demostró que las cepas de Asia Central y Japón tienen baja virulencia para los conejos (al igual que el biogrupo *holarctica/palaeartica*), pero indudablemente tienen una relación más estrecha con *F. tularensis* subespecie *tularensis* sobre la base del análisis de rRNA 16S.¹¹²⁸ Algunos datos recientes que utilizaron dos elementos de secuencia de inserción para tipar las cepas por los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción pusieron en evidencia que las cepas japonesas de *F. tularensis* subespecie *holarctica* (*palaeartica*) en realidad pueden representar otra subespecie.¹²⁷²

Una segunda especie de *Francisella*, aislada del agua en Utah en 1951 fue antes clasificada como una especie de *Pasteurella* y se le cambió el nombre por *Francisella novicida* en 1959.^{368,749} Algunos estudios genéticos determinaron posteriormente que *F. novicida* no era una especie separada, sino que constituía otra subespecie de *F. tularensis* (subespecie *novicida*), dado que el grado de similitud de rRNA 16S era del 99.6%.^{418,585} *F. tularensis* subespecie *novicida* fue aislada de agua que contenía ratas almizcleras nuevas y de seres humanos en dos ocasiones.

Una "tercera" (pero en realidad segunda) especie de *Francisella* denominada *F. philomiragia* incluye cepas bacterianas antes llamadas "bacterias filomiragias" que fueron incluidas erróneamente con las yersinias como "*Y. philomiragia*".⁵⁸⁵ Estos microorganismos muestran una relación genética y antigénica con las subespecies de *F. tularensis* y tienen componentes similares de ácidos grasos y ubiquinona en la pared celular. El análisis de rRNA 16S de estos microorganismos ha corroborado la diferenciación actual del género en dos especies: *F. tularensis* y *F. philomiragia*.^{418,419} *F. philomiragia* es mucho menos virulenta que *F. tularensis* y ha sido aislada principalmente en animales (p. ej., ratas almizcleras) y en el agua. Durante un período de 12 años, se remitieron 14 aislamientos humanos de *F. philomiragia* a la Rama de Bacteriología Especial de los CDC, cinco de los cuales provinieron de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, cinco de individuos que casi se habían ahogado en agua salada, dos de fuentes humanas desconocidas y los casos únicos eran de un paciente con enfermedad de Hodgkin y de un paciente con metaplasia mieloide.^{585,1155,1364} En 1997, Sicherer y cols. informaron sobre un decimoquinto paciente con bacteriemia por *F. philomiragia* que también tenía una enfermedad granulomatosa crónica.¹¹⁷⁵ Estos casos han definido el espectro clínico de *F. philomiragia* como agente raro de neumonía necrosante, bacteriemia y meningitis.^{585,1155,1364}

En 1997, se reconoció otra especie posible de *Francisella* como un endosimbionte en tejido ovárico de garrapatas hembras *Dermacentor andersoni*, pero no ha sido detectada en garrapatas macho.⁹²⁹ La relación de este microorganismo, designado el "simbionte de *D. andersoni*" (DAS) y las especies

de *Francisella* se basa sobre la presencia de un antígeno específico de la membrana y las secuencias de rRNA 16S que son similares a las de *F. tularensis*. La investigación de las bacterias endosimbióticas estrictas que se encuentran en *Paramecium tetraurelia* observó que uno de estos endosimbiontes, *Cae-dibacter taeniospiralis*, forma un nuevo linaje evolutivo con las γ -proteobacterias y comparte un 87% de similitud en sus secuencias de rRNA 16S con la familia *Francisellaceae*.¹⁰⁴ Se están caracterizando mejor estos endosimbiontes.

Virulencia de *F. tularensis*

Los factores responsables de la virulencia de *F. tularensis* no se conocen. El microorganismo no produce ninguna exotoxina identificable, pero tiene una cápsula poco visible que contiene hidratos de carbono, proteínas y lípidos. La cápsula funciona protegiendo al microorganismo de la lisis mediada por complemento y también puede ser antifagocítica. La extracción de la cápsula por mutación o métodos bioquímicos produce la abolición de la virulencia del microorganismo y lo torna sensible a la actividad bactericida del suero humano normal.¹¹²⁷ El LPS del microorganismo tiene una estructura singular, induce menor toxicidad celular y es menos activo en el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* para endotoxina que otras bacterias gramnegativas.^{1129,1330} En infecciones experimentales producidas en ratones, los microorganismos sólo pueden ser aisladas en tejidos del sistema reticuloendotelial y en los componentes celulares de la sangre periférica.⁴²¹ Esto puede explicar el aislamiento infrecuente de este microorganismo en los hemocultivos obtenidos mediante venopunción. La infección natural o la inmunización con cepa viva de vacuna de *F. tularensis* genera una resistencia celular y humoral duradera a la reinfección, y la respuesta inmunitaria celular es el principal mecanismo protector.¹²⁶² Se ha demostrado la persistencia de una inmunidad celular protectora con una declinación simultánea en la inmunidad humoral en individuos que sufrieron una infección natural 25 años antes.³⁸¹

Algunos estudios realizados con mutantes de la cepa viva de la vacuna sugieren que el principal factor de virulencia de *F. tularensis* es la capacidad para invadir y multiplicarse dentro de los macrófagos, hepatocitos y otras células del sistema reticuloendotelial.^{127,421,498,1262} El microorganismo es fagocitado por estas células y vive dentro de vacuolas acidificadas y ricas en hierro. Otras células asociadas con el sistema reticuloendotelial (p. ej., células natural killer [NK]) son estimuladas para producir interferón γ antes de la aparición de linfocitos T específicos de *F. tularensis*; el interferón γ estimula la producción de óxido nítrico dentro de los macrófagos lo que, a su vez, inhibe el crecimiento intracelular de *F. tularensis* y limita su propagación dentro del sistema reticuloendotelial.⁴¹ La capacidad para inducir la producción de óxido nítrico en los macrófagos en el modelo del ratón es modulada por la expresión de la variación de fase del LPS. Esta variación incluye modificaciones estructurales tanto de los antígenos somáticos (O) del LPS como de los antígenos A lipídicos centrales.

Después de la infección cutánea de un huésped sensible, el microorganismo se multiplica localmente durante 3 a 7 días y produce una úlcera local. Las bacterias se propagan hasta los ganglios linfáticos regionales y se diseminan por vía linfohematógena para afectar múltiples órganos. Sigue una respuesta inflamatoria aguda inicial, con la acumulación de neutrófilos, fibrina y macrófagos. Las células mononucleares fagocitan los microorganismos sin anticuerpos opsonizantes, mientras que las células polimorfonucleares no pueden hacerlo. Los linfoci-

tos y los macrófagos migran en los tejidos infectados, fagocitan los microorganismos y forman granulomas en múltiples sitios (ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, hígado y pulmones). Los microorganismos se mantienen viables dentro de estos macrófagos por la inhibición de la fusión fagosoma-lisoma y la utilización de hierro de las células del huésped.⁴²⁰ La inmunidad mediada por células aparece 7-10 días después de la infección y los anticuerpos aglutinantes IgM, IgG e IgA aparecen durante las 2 semanas posteriores.^{723,1262} La lisis de las células que albergan los microorganismos por parte de células inmunitarias efectoras en el hígado y otros órganos libera microorganismos de los compartimentos intracelulares, lo que les permite infectar otras células. Si no se trata, la supuración de los ganglios linfáticos que afecta a distintos tejidos conduce a otras manifestaciones de enfermedad sistémica.

Espectro clínico de la tularemia

El espectro clínico de la tularemia depende del modo de adquisición del microorganismo, la virulencia innata de la cepa infectante y el estado inmunitario del huésped. Después de la infección, existe un período de incubación de 2 días a 3 semanas, seguido por el inicio agudo de fiebre, escalofríos, malestar general, cefalea, odinofagia y a veces diarrea. La temperatura puede aumentar y disminuir pero habitualmente se mantiene elevada durante 4 a 5 semanas en ausencia de tratamiento. Durante este período, se desarrolla pérdida de peso, linfadenopatía y enfermedad crónica. Los pacientes que están infectados con cepas menos virulentas pueden tener una enfermedad leve que se resuelve espontáneamente, mientras aparecen otras infecciones multisistémicas debilitantes crónicas.

La tularemia puede dividirse en seis síndromes principales delineados por el modo de adquisición del microorganismo y, por lo tanto, el grado de afectación sistémica.¹⁰⁸⁵ La **tularemia ulceroganglionar** es la forma más frecuente (21-85% de los casos). El paciente presenta una lesión cutánea ulcerada, casi siempre en el sitio de la mordedura de una garrapata, junto con linfadenopatía regional dolorosa. En los adultos que presentan una infección asociada con la mordedura de garrapata, son más frecuentes la adenomegalias inguinales y cervicales, mientras que las adenomegalias cervicales y occipitales predominan en los niños. Las linfadenopatías asociadas con animales suelen ser cervicales, dado que a menudo la/s lesión/es inicial/es está/n en los miembros superiores. También se presentan otros síntomas (p. ej., cefalea, fiebre, escalofríos, sudoración, tos). La **tularemia ganglionar** (3-20% de los casos) se caracteriza por adenomegalias y fiebre, pero no se aprecia fácilmente una lesión cutánea. En estos casos, la lesión puede haber cicatrizado o puede ser tan inocua que pasa inadvertida. Tanto en la tularemia ulceroganglionar como en la ganglionar, los ganglios linfáticos agrandados pueden supurar y necesitan drenaje quirúrgico. La **tularemia oculoganglionar** (2-5% de los casos) es el resultado de la inoculación del microorganismo en las conjuntivas a través de la inoculación directa con las manos contaminadas o por salpicaduras o aerosoles. Esta forma clínica se caracteriza por conjuntivitis granulomatosa grave; pérdida de agudeza visual; adenomegalias preauriculares, submandibulares y cervicales; y manifestaciones sistémicas de fiebre y malestar general.¹²¹⁹ La **tularemia orofaríngea** (2-12% de los casos) es la infección cuya lesión primaria está en la orofaringe. Esta forma de la enfermedad es resultado de la ingestión de alimentos o agua contaminados. El paciente presenta cefalea intensa, amigdalitis bilateral y faringitis exudativa sugestiva de una faringitis estreptocócica grave, difteria o enfermedad de

Vincent. Aparece una linfadenitis cervical profunda, casi siempre en la forma de un ganglio linfático tumefacto persistente aislado una semana o dos después de la entrada del microorganismo.^{579,945} La **tularemia tifoidea** (5-30% de los casos) tiene un inicio súbito con fiebre, escalofríos, cefalea, odinofagia, vómitos y dolor y sensibilidad a la palpación abdominal. No se observa ninguna lesión cutánea ni linfadenopatía inicial, y es probable que la infección se adquiriera por la ingestión de agua o alimentos contaminados.⁵⁷⁹ La tularemia tifoidea es la única forma en la cual la diarrea es una parte sobresaliente de la presentación clínica. La diarrea suele ser muy líquida o acuosa y sin sangre, aunque se puede observar necrosis intestinal focal con heces sanguinolentas, sobre todo en los niños. Se desarrolla una enfermedad pleuropulmonar secundaria, con infiltrados pulmonares y derrames pleurales, en casi el 50% de los pacientes con tularemia tifoidea. En esta forma, los cultivos de sangre y esputo pueden ser positivos y la mortalidad suele ser alta. La **tularemia neumónica** (8-20% de los casos) puede ocurrir como complicación de todas las otras formas de la enfermedad debido a la siembra del aparato respiratorio durante la bacteriemia o como una entidad clínica resultante de la inhalación de los microorganismos en aerosoles en suspensión.¹⁰⁸ Los exámenes radiológicos pueden mostrar la afectación de uno o más lóbulos, con derrames pleurales, infiltrados neumónicos, formación de abscesos, nódulos pulmonares y adenomegalias hiliares.^{463,925} Los síntomas son fiebre, tos con producción mínima de esputo y dolor torácico pleurítico. Desde el punto de vista clínico, la tularemia neumónica se asemeja a la tuberculosis; a las neumonías atípicas debidas a *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii* y a la neumonía micótica.⁴⁶³ La tularemia neumónica suele ser más grave en los pacientes con trastornos subyacentes, como desnutrición, alcoholismo, enfermedad renal, enfermedad granulomatosa crónica e infección por HIV.⁸¹⁸ En estos individuos ocurren más a menudo complicaciones como hepatoesplenomegalia, insuficiencia renal y rabdomiólisis. En general, la tularemia neumónica se observa en adultos y se asocia con ciertas ocupaciones (p. ej., esquiladores de ovejas, criadores de ganado, trabajadores de laboratorio), actividades de granja (p. ej., trilla), siega del césped y corte de cerdas.¹²⁴³ Es probable que esta asociación se deba a la presencia de heces de roedores o restos animales infectados en el heno.⁵⁷⁹ La supuración de las adenomegalias puede ser una complicación tardía hasta en el 50% de los pacientes con linfadenopatía.⁶²⁴

Las manifestaciones de múltiples tipos clínicos de tularemia pueden ocurrir en pacientes individuales, y se describieron otras complicaciones de la enfermedad. Plourde y cols. comunicaron un caso de tularemia ganglionar con algunas características de enfermedad tifoidea en un niño que había sufrido la picadura de un insecto sobre el omóplato izquierdo.¹⁰¹⁸ Se observó linfadenopatía inguinal, en lugar de linfadenopatía cerca del sitio de picadura del insecto, y se desarrolló distensión abdominal y diarrea acuosa grave, ambas características de la enfermedad tifoidea. Cooper y cols. comunicaron un caso atípico de infección crónica por *F. tularensis* de una prótesis de rodilla en un hombre de 68 años con enfermedad articular degenerativa 6 meses después de la picadura de una garrapata.²⁸¹ La meningitis es una complicación rara de la infección por *F. tularensis* y sólo se han comunicado cinco casos pediátricos y siete adultos en la literatura entre 1931 y 1998.¹⁰⁷⁹ Estos pacientes pueden presentar o no enfermedad no meníngea (tularemia ganglionar o tularemia tifoidea). Los hallazgos del LCR son compatibles con meningitis bacteriana (hipoglucorraquia con hiperproteínorraquia) y muestran predominio de

linfocitos en la tinción de Gram. En 1996, Pittman y cols. describieron el primer caso de infección de una derivación ventriculoperitoneal por *F. tularensis* en un varón de 5 años con mielomeningocele.¹⁰¹⁶ Los signos y los síntomas estaban limitados al SNC y no hubo ninguna otra afectación sistémica. Dos semanas antes de la presentación, el niño había estado con unos amigos que estaban despellejando un conejo. El paciente respondió satisfactoriamente a la gentamicina intratecal con reemplazo de la derivación. LeDoux informó de un caso de una presunta enfermedad del SNC por *F. tularensis* en un hombre de 61 años cuya presentación clínica predominante fue ataxia de la marcha.⁷⁶³ En 2000, Tancik y Dillaha comunicaron el primer caso publicado de endocarditis de válvula nativa por *F. tularensis* en un hombre de 42 años proveniente de Arkansas.¹²⁵⁵ El paciente respondió satisfactoriamente al tratamiento con gentamicina durante 4 semanas. La enfermedad grave también se asocia con compromiso del estado del huésped, como lo pone en evidencia una infección rápidamente mortal en un paciente con neutropenia que había recibido un trasplante de médula ósea.¹¹³⁷

Aislamiento y características de los cultivos

Dado que este microorganismo puede penetrar a través de pequeñas lesiones en la piel, se considera peligroso manipular muestras o cultivos de *F. tularensis* en el laboratorio. Como sucede con la brucelosis, es posible que no se sospeche tularemia en el momento en que el paciente consulta al médico, de modo que puede pasar mucho tiempo en que se manipulan muestras y cultivos antes de considerar este diagnóstico. En los laboratorios que trabajan con materiales clínicos de origen humano y animal, se recomiendan prácticas, equipo de contención e instalaciones de Bioseguridad de nivel 2, mientras que se necesitan prácticas de Bioseguridad de nivel 3 y Bioseguridad Animal de nivel 3 para los que trabajan con cultivos vivos o realizan estudios experimentales en animales.^{1299,1300} En el laboratorio de microbiología clínica, todas las muestras y los cultivos deben ser procesados en un gabinete de seguridad biológica de clase II de rutina, se deben utilizar guantes durante todos los procedimientos y evitar cualquiera que pueda generar partículas de aerosoles. Con la amenaza inminente del bioterrorismo, se deben incorporar pruebas de cribado para *F. tularensis* y otros agentes de bioterrorismo en los procedimientos de bancos de laboratorio para permitir la rápida identificación presuntiva de un microorganismo aislado de modo que pueda remitirse a los laboratorios de nivel B para la identificación definitiva.¹⁰⁷⁷ Las personas que sufren una exposición confirmada en el laboratorio deben ser tratadas en forma preventiva.

F. tularensis puede aislarse de úlceras primarias, material de aspiración y biopsias ganglionares, esputo, médula ósea y biopsias titulares (p. ej., hígado, bazo). Las muestras deben mantenerse a 4-8 °C hasta su procesamiento y colocarse en un medio de transporte Amies con carbón o en medio de Stuart a temperatura ambiente. También se han aislado microorganismos de muestras de sangre periférica, habitualmente en el caso de una enfermedad subyacente preexistente. Se han observado hemocultivos positivos en pacientes con tularemia tifoidea, neumónica y orofaríngea, y en el único caso de endocarditis por *F. tularensis*.^{579,945,1033,1298,1348} En comunicaciones de casos que describieron la bacteriemia por *F. tularensis*, se observó crecimiento del microorganismo después de 3 a 7 días de incubación utilizando el sistema radiométrico BACTEC. Sin embargo, en el único caso de endocarditis, *F. tularensis* creció

después de 9 días con el sistema BACTEC.¹²⁵⁵ *F. tularensis* fue aislada después de 12 días de incubación en un frasco de hemocultivo aerobio no radiométrico BACTEC (BACTEC NR6A) que fue inoculado con un volumen de 10-20 µL del material de aspiración percutánea con aguja fina de un ganglio linfático inguinal.¹⁷⁵ Si hay sospecha clínica de tularemia, se deben incubar los hemocultivos en caldo antes de utilizar el período de incubación estándar de 5 a 7 días en muchos laboratorios.

F. tularensis es un cocobacilo gramnegativo pequeño y de tinción pálida (véase lámina en color 9-4E). Desde el punto de vista clásico, el crecimiento del microorganismo requiere cisteína, cistina u otros compuestos que contienen sulfhidrilo y el medio preferido para el aislamiento fue agar sangre glucosacisteína. Sin embargo, crece en agar chocolate disponible en el comercio y agar de Thayer-Martin modificado, dado que estos medios que contienen hemina son complementados con un enriquecedor del crecimiento (p. ej., IsoVitalax; BD Biosciences) que contiene cisteína, cistina y otros nutrientes necesarios para las bacterias con requerimientos nutricionales especiales.¹³⁴⁸ Al igual que las brucelas, es capaz de crecer en agar carbón-extrato de levadura con buffer (BCYE), el medio utilizado para el aislamiento de especies de *Legionella*.¹³⁶⁵ *F. tularensis* también ha sido aislado en una biopsia de una lesión cutánea por la técnica de centrifugación de frasco ampolla con cultivo celular (*shell vial*), utilizando fibroblastos pulmonares embrionarios humanos.⁴²⁸ Aunque no crece en subcultivo en medios bacteriológicos, su identidad se determinó mediante análisis de PCR del microorganismo que creció en el frasco ampolla con cultivo celular.

En 1994, Bernard y cols., del Laboratorio Nacional de Bacteriología de Ontario, Canadá, informaron sobre siete cepas remitidas al laboratorio de referencia canadiense como especies de *Haemophilus* o como bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales no identificadas que fueron reconocidas como *F. tularensis*.¹²² Estas cepas, que carecían del requerimiento de cisteína de las cepas clásicas de *F. tularensis*, fueron oxidasas y catalasas negativas, se aglutinaban firmemente en suero aglutinante para *Francisella* y no fueron reactivas en todas las otras pruebas fenotípicas, que incluyen las utilizadas para las determinaciones de biogrupos. El análisis de los ácidos grasos celulares de estas cepas puso en evidencia la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga (C₁₈-C₂₆) y grandes cantidades de 3-hidroxi-octadecanoato (3OH-C_{18:0}), un ácido graso que es singular de *F. tularensis*.^{368,631} Estos ácidos grasos hidroxi inusuales comprenden parte de la estructura del lípido A en el LPS del microorganismo. En consecuencia, estos microorganismos pueden ser identificados fácilmente por análisis de ácidos grasos celulares utilizando el software del Sistema de Identificación Microbiano (Microbial Identification System, MIDI) y el Sistema de Generación de Bibliotecas (Library Generation System, LGS) (MIDI, Newark, NJ). Clarridge y cols. también aislaron dos cepas de *F. tularensis* sin requerimientos nutricionales especiales del hemocultivo de pacientes con neumonía.²⁶⁰ Estas cepas crecieron tanto en agar chocolate como en agar sangre y fueron identificadas como *F. tularensis* por las características fenotípicas, secuenciación de genes rRNA 16S e hibridación de sondas de DNA. Estas cepas tampoco aglutinaron en antiseros comerciales contra *F. tularensis*. Las cepas de *F. tularensis* biogrupo *novicida* y *F. philomiragia* no demuestran un requerimiento de cisteína.

F. tularensis es aerobio estricto; el crecimiento es estimulado por el aumento del CO₂ y puede requerir 2 a 5 días de incu-

bación a 35 °C a 37 °C antes de que las colonias sean visibles en medio de agar. Las colonias en agar chocolate son grises, lisas, mantecosas y tienen alrededor de 2 mm de diámetro después de 3 días de incubación. *F. tularensis* subespecie *tularensis* crece más lentamente que las otras subespecies. Las colonias de *F. philomiragia* son más grandes, más blancas y mucoides. En el cuadro 9-13 se muestran las características de la identificación presuntiva de las especies de *Francisella*. Los biogrupos de *F. tularensis* son oxidasa negativos, débilmente catalasa positivos, crecen poco (o nada) en agar de MacConkey y son inertes desde el punto de vista bioquímico. Las cepas de *F. philomiragia* son oxidasa positivas. En general, la identificación de las especies se confirma mediante pruebas de aglutinación utilizando antisueros policlonales de conejo específicos. Los cultivos deben ser examinados en un período de 10 a 14 días.

Algunos estudios que utilizaron la inoculación en frascos de hemocultivo y ratones infectados de forma experimental inicialmente sugirieron la utilidad del PCR como método para la detección y la identificación de *F. tularensis* en muestras clínicas humanas.^{346,657,798} Estos ensayos pudieron detectar tanto la subespecie *tularensis* como *holarctica* con sensibilidades iguales a 1 UFC/μL de sangre. Con posterioridad, se desarrolló con éxito un ensayo de PCR múltiple dirigido tanto al gen de rRNA 16S como a un gen de lipoproteína de 17 kDa para la detección directa de *F. tularensis* en hisopados de lesiones de tularemia ulceroganglionar.^{642,1182} El gen de la lipoproteína se conserva entre las cepas de *F. tularensis* y no muestra similitudes de secuencias con otras secuencias procariontes conocidas publicadas en los bancos genéticos actuales.⁶⁴² La PCR realizada en muestras de heridas pudo proporcionar un diagnóstico rápido en pacientes en los que se sospechaba tularemia ulceroganglionar y tenían cultivos negativos y aún no habían sufrido seroconversión.^{642,667} En respuesta a la necesidad de herramientas epidemiológicas para investigar brotes de tularemia, también se han desarrollado técnicas de PCR para detectar infección directamente en animales de experimentación y en vectores insectos y proporcionar métodos para la tipificación y la discriminación de las cepas.^{311,398,450,568,645,1272}

Se han creado técnicas nuevas para la detección e identificación rápidas de *F. tularensis* como resultado directo de las preocupaciones acerca de su uso en bioterrorismo y guerra biológica. Grunow y cols. idearon un EIA estándar y un ensayo inmunocromatográfico manual que utiliza anticuerpos monoclonales contra el antígeno LPS como anticuerpo de captura para detectar *F. tularensis* subespecie *tularensis* y *F. tularensis* subespecie *holarctica* directamente de muestras veterinarias.⁵⁰³ También se han desarrollado EIA con captura de antígeno que utilizan fluorometría de resolución temporal para la detección de varios agentes asociados con bioterrorismo tanto en muestras clínicas como ambientales.¹⁰⁰⁴ Emanuel y cols. crearon un método basado en PCR fluorogénica para la detección de *F. tularensis* en ratones infectados. Este ensayo se podía realizar utilizando un termociclador manual diseñado para uso en el campo; los resultados estuvieron disponibles dentro de las 4 horas.³⁷⁵

Como las cepas que pertenecen a los diferentes biogrupos de *F. tularensis* son antigénicamente homogéneas, las subespecies se diferencian entre sí sobre la base de criterios fenotípicos o sondas específicas de subespecies para rRNA 16S.⁴¹⁸ Las cepas de *F. tularensis* subespecie *tularensis* producen ácido en los medios que contienen glucosa, maltosa o glicerol como fuente de carbono e hibridan con una sonda de oligonucleótidos para las secuencias de rRNA 16S específicas de la subespecie *tularensis*. Las cepas de la subespecie *holarctica* producen ácido a

partir de glucosa y maltosa, pero no de glicerol e hibridan con una sonda que es específica para las secuencias de rRNA 16S de la subespecie *holarctica*. Tanto las cepas de la subespecie *mediaasiatica* como las de la subespecie *palaeartica japonica* hibridan con la sonda específica del biogrupo *tularensis*; sin embargo, las cepas de la subespecie *mediaasiatica* producen ácido a partir de glicerol (y sacarosa), mientras que la subespecie *palaeartica japonica* acidifica los medios que contienen glucosa o glicerol (véase cuadro 9-13). Los métodos serológicos pueden distinguir entre las cepas de las subespecies *tularensis* y *novicida*, pero no entre las cepas de las subespecies *tularensis* y *holarctica*. La citrulina ureidasa, enzima que se correlaciona con la virulencia de *F. tularensis*, se encuentra en las cepas virulentas de las subespecies *tularensis*, algunas cepas de *holarctica* y cepas *mediaasiatica*.^{819,1128} La enzima no se encuentra en cepas *tularensis* atenuadas y en la mayoría de las cepas de la subespecie *holarctica* con baja virulencia. Las pruebas fenotípicas de estos microorganismos son problemáticas, dado que las reacciones a menudo son tardías o variables. Se han desarrollado cebadores específicos, sondas y métodos de PCR que pueden distinguir *F. tularensis* subespecie *tularensis* de otras subespecies, incluida *F. tularensis* subespecie *tularensis*.^{450,646}

Diagnóstico serológico de la tularemia

Como es posible que no se considere el diagnóstico de tularemia hasta avanzado el curso clínico y como el cultivo para el microorganismo a menudo fracasa, la prueba serológica es el método más frecuente para el diagnóstico de esta infección.¹²⁴ La respuesta de anticuerpos a la infección por *F. tularensis* está influida en cierta medida por la forma clínica de la enfermedad y puede afectar los resultados serológicos según el método utilizado.¹²⁴² La prueba serológica convencional es la de aglutinación en tubo (TA), que utiliza células enteras destruidas con formalina como antígeno (BD Biosciences). En general, los anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA no aparecen hasta 2 semanas después de la infección. Se presentan simultáneamente anticuerpos de todas las clases. Un único título de aglutinación en tubo ≥ 160 con una enfermedad compatible o una elevación de cuatro veces en el título entre las muestras de suero de fase aguda y de convalecencia (separadas por 14 días) constituye un diagnóstico etiológico presuntivo. Una prueba de TA positiva no es útil si existen antecedentes de infección o de vacunación, ya que los anticuerpos de la clase IgM persisten durante años. La prueba de TA ha sido adaptada a un procedimiento de microaglutinación (MA) que utiliza como antígeno microorganismos *F. tularensis* formalinizados y teñidos con safranina. Sato y cols. demostraron que la prueba de MA era más sensible que la prueba TA estándar, que detectaba anticuerpos anti-*F. tularensis* de clase IgM 9 días antes que la prueba TA.¹¹³⁸ Se han desarrollado ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos de tularemia que utilizan antígenos OMP purificados del microorganismo que parecen evocar respuestas inmunes tempranas y fuertes que son influidas mínimamente por la presentación clínica.^{124,125}

Tratamiento de la tularemia

El fármaco de elección para el tratamiento de la tularemia es el aminoglucósido estreptomycin y la gentamicina es un agente alternativo.^{379,624} Sin embargo, se ha comunicado una recaída clínica después del tratamiento con gentamicina.^{379,1074} Se han

Cuadro 9-13 Características bioquímicas para la identificación de subespecies de *Francisella tularensis* y *Francisella philomiragia*

CARACTERÍSTICA	<i>F. TULARENSIS</i> SUBESPECIE <i>TULARENSIS</i>	<i>F. TULARENSIS</i> SUBESPECIE <i>HOLARTICA</i>	<i>F. TULARENSIS</i> SUBESPECIE <i>NOVICIDA</i>	<i>F. TULARENSIS</i> SUBESPECIE <i>MEDIAASIATICA</i>	<i>F. TULARENSIS</i> SUBESPECIE <i>PALEARICA-JAPONICA</i>	<i>F. PHILO-</i> <i>MIRAGIA</i>
Oxidasa	—	—	—	—	—	+
Catalasa	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
Motilidad	—	—	—	—	v	—
Crecimiento en agar de MacConkey	v	—	v	ND	ND	v
Crecimiento, NaCl al 6.5%	—	—	v	ND	ND	v
H ₂ S en agar TSI	—	—	—	—	—	+ ^d
Ureasa	—	—	—	—	—	—
Reducción de nitrato	—	—	—	—	—	—
Ácido a partir de:						
Glucosa	+	+	+	—	+	+ ^d
Maltosa	+	+	v	—	ND	+ ^d
Sacarosa	—	—	+	+	ND	+ ^d
Glicerol	+	—	+	+	+	ND
Requerimiento de cisteína/cistina	+	+	—	—	—	—
Citrulina ureidasa	+ ⁻	— ⁺	+	+	—	ND

—: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable; +^d: reacción positiva débil; —: mayoría de cepas positivas, raras cepas negativas; —⁺: mayoría de cepas negativas, raras cepas positivas; ND: datos no disponibles; TSI: triple azúcar-hierro.

utilizado otros regímenes, como tetraciclina y cloranfenicol, pero se asocian con tasas más altas de recaídas, específicamente si se administran al comienzo de la evolución clínica. La respuesta clínica inicial al tratamiento con tetraciclinas es espectacular (los pacientes tienen una rápida y notable mejora), aunque las tasas de recaída son superiores al 12%, dos veces la observada con gentamicina.^{379,1142} También se ha utilizado con éxito el tratamiento intravenoso con eritromicina, aunque los datos in vitro sugieren que las cepas de *F. tularensis* no son previsiblemente sensibles.¹³⁶⁵ Scheel y cols. observaron que 14 de 22 cepas de Escandinavia eran resistentes a eritromicina, roxitromicina y claritromicina in vitro.¹¹⁴² También se han utilizado métodos Etest para demostrar resistencia a los macrólidos en *F. tularensis*.⁶⁴² Muchas cepas son sensibles a la rifampicina in vitro, pero se han recuperado mutantes espontáneos estables con CIM de rifampicina > 32 µg/mL dentro de las zonas de inhibición por la rifampicina de las cepas sensibles.

Aunque algunos estudios in vitro que utilizaron métodos de dilución en caldo han comunicado CIM bajas para los β-lactámicos cuando fueron evaluados contra *F. tularensis*, otros estudios que utilizaron dilución en agar han llegado a la conclusión de que el microorganismo es resistente a los esos antibióticos.^{78,1142} En un estudio de 22 cepas animales y humanas de *F. tularensis* que utilizó el método de dilución en agar con agar sangre-cisteína-glucosa, todas las cepas fueron resistentes no

sólo a penicilina y cefalotina, sino también a cefuroxima, cef-tazidima, aztreonam, imipenem y meropenem, con una CIM > 32 µg/mL para todos los agentes.¹¹⁴² Ikaheimo y cols. utilizaron tiritas de Etest en placas de agar cisteína-infusión de corazón para evaluar 20 cepas humanas y 18 de animales muertos.⁶¹⁷ Todas fueron sensibles a los agentes utilizados para el tratamiento (estreptomicinas, tetraciclina), pero resistentes a los β-lactámicos y los penémicos, incluidos ceftriaxona, ceftazidima, cefpiroma, imipenem, meropenem y piperacilina-tazobactam. La experiencia clínica con el uso de algunas cefalosporinas de tercera generación para la tularemia indica que no son eficaces. Cross y Jacobs informaron sobre ocho casos de fracasos documentados con el uso ambulatorio de ceftriaxona en el tratamiento de la tularemia.²⁹¹ Aun cuando las CIM de ceftazidima son más bajas para *F. tularensis* que las de ceftriaxona, no existe ninguna prueba como para sugerir que este fármaco sería igualmente útil.³⁷⁹

Las cepas de *F. tularensis* son sensibles a las fluoroquinolonas in vitro y muchos datos clínicos apoyan la utilidad de estos agentes para el tratamiento.^{379,647,1143,1244} Se ha demostrado in vitro sensibilidad a varias fluoroquinolonas utilizando dilución en agar y métodos Etest en medios suplementados con sangre y cisteína y enriquecidos.^{617,1142} Syrjala y cols. informaron sobre tres pacientes con tularemia neumónica y uno con tularemia ulceroganglionar que fueron tratados con éxito con ci-

profloxacin; otro paciente con tularemia ulceroganglionar respondió al tratamiento con norfloxacin.¹²⁴⁴ Scheel y cols. trataron con éxito una recaída de tularemia ulceroganglionar con ciprofloxacina después de que el paciente había completado una serie de 10 días de amoxicilina y una serie de 3 semanas de doxiciclina.¹¹⁴³ Limaye y Hooper revisaron recientemente 10 casos de tularemia, que incluían las formas ulceroganglionar, neumónica y tifoidea, que fueron tratados con ciprofloxacina o levofloxacina y observaron resultados favorables sin recaídas en todos los casos.⁷⁸⁰ Se observó que una serie de 14 días de ciprofloxacina oral era eficaz para el tratamiento de 12 pacientes pediátricos con infección ulceroganglionar; el cultivo de las lesiones fue exitoso en siete pacientes y todas las cepas tuvieron una CIM de ciprofloxacina de 0,03 µg/mL.⁶⁴³

En general, las cepas de *F. philomiragia* son sensibles a los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y la tetraciclina, y tienen una sensibilidad variable a amoxicilina-clavulanato, rifampicina y eritromicina. La mayoría producen enzimas β-lactamasas y son resistentes a la ampicilina y algunas pueden ser resistentes a cefazolina, cefotaxima y trimetoprim-sulfametoxazol.^{585,1155,1175}

Especies de Bartonella

Taxonomía y epidemiología de las especies de Bartonella

En la edición de 1984 del *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática*, el orden Rickettsiales incluyó tres familias: Rickettsiaceae, Bartonellaceae y Anaplasmataceae.¹⁰⁷⁵ Las Rickettsiaceae incluyeron tres géneros: Rickettsia, Coxiella y Rochalimaea.¹³⁵⁷ Aunque las rickettsias y las coxielas no pudieron ser cultivadas fuera de células huéspedes específicas, los miembros del género Rochalimaea tenían forma de bacilo que podían ser aislados en medios sin células. La familia Bartonellaceae incluía dos géneros: Bartonella y Grahamella.¹³⁵⁷ Los miembros del género Bartonella podían infectar a los seres humanos y característicamente proliferaban en estrecha asociación con las superficies de los eritrocitos de los vertebrados, mientras que los del género Grahamella proliferaban dentro de los eritrocitos de vertebrados no humanos. Hasta 1984 se había descrito sólo una especie de Bartonella (*B. bacilliformis*), dos especies de Grahamella (*G. talpae* y *G. peromysci*) y dos especies de Rochalimaea (*R. quintana* y *R. vinsonii*). Históricamente, *R. quintana* produce fiebre de las trincheras en seres humanos y *R. vinsonii* sólo ha sido aislado de ratones de campo que viven en Grosse Isle, Québec, Canadá.¹³⁵⁶

A comienzos de la década de 1990, se describieron varias entidades clínicas inusuales—sobre todo angiomatosis bacilar y peliosis hepática—en pacientes con infección por HIV. Los microorganismos que se teñían con la tinción argéntica de Warthin-Starry podían observarse en biopsias recortadas de estas lesiones cutáneas y viscerales atípicas, pero era extremadamente difícil aislarlos en cultivo. Por último, fueron aislados en medios de agar recién preparados o en cultivos celulares después de una incubación prolongada y caracterizados mediante técnicas moleculares y genéticas. Se observó que estas bacterias con requerimientos nutricionales especiales eran miembros del género Rochalimaea e incluían a *R. quintana*, el agente etiológico clásico de la fiebre de las trincheras, y una especie nueva que recibió el nombre *R. henselae*.^{1187,1188} En 1993, algunos estudios taxonómicos de Brenner y cols. confirmaron que las especies de Rochalimaea estaban más estrechamente relacionadas con Bartonella bacilliformis y apoyaron la unificación de Rochalimaea y Bartonella.¹⁶⁸ En conse-

cuencia, todos los miembros del género Rochalimaea fueron transferidos al género Bartonella como Bartonella quintana, Bartonella vinsonii, Bartonella henselae y Bartonella elizabethae.

En 1995, se describieron tres especies nuevas de Grahamella junto con análisis de rRNA 16S y comparaciones con las especies de Grahamella y Bartonella existentes. Sobre la base de criterios genéticos y fenotípicos, Birtles y cols., del Laboratorio de Salud Pública Central, en Londres, propusieron unificar también el género Grahamella con el género Bartonella, y este último nombre asumió precedencia en la nomenclatura.¹³⁶ Esta unificación condujo a otras cinco especies de Bartonella halladas en los roedores: *B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* y *B. doshiae*.¹³⁶ Los análisis genéticos mediante técnicas de secuenciación de rRNA 16S e hibridación de DNA confirmaron que Bartonella es el único género en la familia Bartonellaceae. Esta familia reside en el orden propuesto “Rhizobiales”, que está en el subgrupo α₂ de la clase Proteobacteria.^{455,956} Los familiares cercanos son Afilia, Brucella y Agrobacterium tumefaciens.

El descubrimiento de *B. henselae* y *B. quintana* como patógenos humanos oportunistas, la evidencia para *B. henselae* como agente causal de la enfermedad por arañazo de gato y la probabilidad de una transmisión a través de vectores de estas bacterias tanto entre animales como entre seres humanos han conducido a estudios extensos sobre la epidemiología de estos microorganismos y sus papeles como patógenos humanos y veterinarios emergentes. Utilizando los enfoques convencionales de cultivo y serológicos, y técnicas moleculares y genéticas nuevas, se han descubierto y descrito varias especies de Bartonella nuevas durante los últimos años. En 1993, se recuperó una cepa única apodada *B. elizabethae* de un paciente con endocarditis.²⁹⁹ En 1996, Drancourt y cols. identificaron un segundo genotipo entre cepas de *B. henselae* involucradas en la enfermedad del arañazo de gato y la endocarditis, y se propuso dividir a *B. henselae* en dos genogrupos y serogrupos: *B. henselae* Houston, 16 S tipo I y *B. henselae* Marsella, 16S tipo II—sobre la base de secuencias de rDNA 16S y exámenes quimi-taxonómicos de proteínas celulares mediante SDS-PAGE.^{118,353} En 1995, Clarridge y cols. publicaron en Houston una descripción de su enfoque de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad del arañazo de gato e incluyeron presentaciones de casos de dos pacientes con esta afección.²⁵⁹ Aunque se aisló *B. henselae* en ambos pacientes, se halló una especie de Bartonella diferente en un gatito que pertenecía a uno de ellos. En 1996, esta cepa recibió el nombre de *B. clarridgeiae* en honor del doctor Jill Clarridge, y en 1997 Kordick y cols. describieron el primer caso de enfermedad del arañazo de gato causado por *B. clarridgeiae*.^{717,758} Durante una encuesta para determinar la prevalencia de *B. henselae* en gatos en el área de la Bahía de San Francisco, se aisló otra especie nueva de Bartonella de dos gatos.³⁵⁷ Estas dos cepas tenían una relación entre sí del 97-100% mediante secuenciación de DNA, pero una relación de sólo 68-92% con la cepa tipo (Houston-1) y las otras cepas clínicas de *B. henselae*. Esta especie nueva fue denominada *B. koehlerae*. En el año 2000, se aisló una cuarta especie asociada con los gatos (“*B. weissii*”) de felinos en Utah e Illinois; este microorganismo era idéntico a otras especies—“*B. bovis*”—halladas en el ganado vacuno en Carolina del Norte.^{119,164}

Algunos estudios llevados a cabo en los últimos 10 a 15 años han establecido que las especies de Bartonella constituyen un grupo singular de bacterias hallado en una amplia variedad de animales salvajes y domésticos. Estos animales pueden ser

asintomáticos o desarrollar una enfermedad importante, que incluye una bacteriemia crónica. Los animales infectados sirven como reservorios y fuentes potenciales de otras infecciones animales o humanas.¹⁶² En 1995, los investigadores del College of Veterinary Medicine de la North Carolina State University describieron una especie nueva de *Bartonella* como causa de endocarditis canina. La caracterización fenotípica y genotípica de este agente confirmó esta relación con el "agente del ratón de campo", *B. vinsonii*, y este microorganismo recibió el nombre de *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii*.^{163,719} Al parecer, esta subespecie representa una causa antes no reconocida de arritmias cardíacas, endocarditis, miocarditis, síncope y muerte súbita en los perros.¹⁶¹ En el año 2000, *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* fue detectado mediante análisis de PCR de tejido valvular como causa de endocarditis humana en un hombre de 35 años, que también tenía contacto con varios animales, incluido un perro.¹¹⁰² En 1999, se aisló otra subespecie de *B. vinsonii*, designada *B. vinsonii* subespecie *arupensis*, de hemocultivos de un rancho ganadero en Wyoming que presentaba una enfermedad aguda con un componente neurológico importante.¹¹⁵⁸ Este microorganismo se encuentra estrechamente relacionado con *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* y con *B. vinsonii* subespecie *vinsonii* y con cepas de ratones con infección natural.⁸⁵

La vigilancia serológica y los estudios de hemocultivo entre mamíferos pequeños, rumiantes y otros miembros de la vida salvaje han conducido a descripciones de varias especies de *Bartonella* nuevas. Durante los controles epidemiológicos llevados a cabo para determinar los reservorios potenciales de especies de *Bartonella* en mamíferos salvajes, otra especie nueva, denominada *B. alsatica*, fue aislada en hemocultivos de conejos salvajes (*Oryctolagus cuniculus*) de la región de Alsacia de Francia cerca del río Rin.⁵⁵⁷ Las nuevas especies *B. shoenbuchii*, *B. bovis*, *B. capreoli* y *B. birtlesii* han sido aisladas en hemocultivos de corzas, de vacas lecheras, renos y mamíferos pequeños, respectivamente.^{119,120,309} El aislamiento de bartonelas de roedores y otros mamíferos salvajes ha conducido a buscar estas bacterias en las poblaciones de garrapatas. Entre los extractos de DNA de 109 garrapatas *Ixodes ricinus* recogidas de corzas en Holanda, el 70% contenía secuencias del gen de rRNA 16S para *Bartonella* o especies estrechamente relacionadas con *Bartonella*.¹¹⁵⁰ También se han detectado secuencias genéticas de *Bartonella* en extractos preparados de garrapatas *Ixodes* y *Dermacentor* recogidas de seis condados de California.^{221,222}

La infección por *Bartonella* es amplia y altamente prevalente en las poblaciones de roedores en diferentes localidades. La especie recientemente descrita *B. tribocorum* fue aislada en la sangre de dos ratas salvajes (*Rattus norvegicus*) que también fueron atrapadas en la región de Alsacia de Francia.⁵⁵⁸ En un estudio de campo de siete especies de roedores de 12 regiones geográficas en el sudeste de los Estados Unidos se observaron especies de *Bartonella* en los hemocultivos del 42,2% de 279 roedores evaluados.⁷²⁴ Estas cepas representaban 14 variantes fenotípicas que se agrupaban en siete grupos filogenéticos, cuatro de los cuales contenían las especies de *Bartonella* descritas antes. Se aislaron especies de *Bartonella* de la sangre del 19,3% de 325 *Rattus norvegicus* y del 11,8% de 92 *Rattus rattus* de 13 áreas de los Estados Unidos y Portugal.³⁷¹ Los análisis genéticos de los microorganismos aislados en ratas de Perú y en ratas (*R. norvegicus*) de Louisiana y Maryland mostraron secuencias genéticas idénticas a las de *B. elizabethae*, que ha sido aislado en cultivo en un solo caso de endocarditis humana.³⁹⁹ Ellis y cols. sugirieron que las especies de *Rattus*, y tal

vez otros roedores, constituyen el reservorio para *B. elizabethae* y que la presencia de anticuerpos contra *B. elizabethae* entre adictos a drogas intravenosas de las ciudades del interior reflejaba la infección por esta especie de *Bartonella* y otras relacionadas.^{277,371} En un estudio de 200 sueros de "personas de la calle" que utilizaban un centro clínico gratuito en el centro de Los Ángeles, la seroprevalencia de anticuerpos contra *B. elizabethae*, *B. quintana* y *B. henselae* fue del 13,6%, el 12,5% y el 9,5%, respectivamente.¹¹⁹¹

También se han aislado bartonelas en rumiantes salvajes y domésticos de vida libre y en especies de caninos salvajes y domésticos en los Estados Unidos. Chang y cols. aislaron especies de *Bartonella* del 49% de 128 reces de ganado vacuno en California y Oklahoma, del 90% de 42 ciervos mula en California y del 15% de 100 alces de California y Oregón.²²⁰ Los estudios seroepidemiológicos de la infección por *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* en 869 coyotes que habitaban tanto en las regiones costeras como interiores de toda California durante 1994 a 1998 encontraron prevalencias de anticuerpos que variaban entre el 51% en las regiones centrales del estado hasta el 34% en las regiones del sur y el 7% en las regiones del norte.²²⁴ La distribución agrupada de seropositividad también sugirió que la infección por *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* era transmitida por vectores entre estos animales. Un estudio epidemiológico reciente se llevó a cabo entre los coyotes del condado de Santa Clara, California, luego del desarrollo de una infección asociada con *Bartonella* en un niño después de haber sufrido la mordedura de un coyote. Entre 109 coyotes de la costa central de California, el 28% de los animales presentaba una bacteriemia por *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* y el 76% tenía anticuerpos específicos de especie.²²³ El análisis molecular de secuencias del gen de la citrato sintetasa, rRNA 16S y las regiones espaciadoras intergénicas 16S-23S estableció que 6 de los 31 microorganismos aislados eran idénticos a la cepa tipo de *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* aislada en un perro con endocarditis, mientras que los 25 restantes eran similares a las cepas aisladas en perros sanos. Sobre la base de estos estudios, es probable que los coyotes sean el principal reservorio salvaje de *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii*. Siete de los 31 coyotes bacteriémicos también eran seronegativos para los anticuerpos contra *Bartonella*.²²³

La participación de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en la enfermedad del arañazo de gato ha conducido a investigaciones sobre la prevalencia y la patogenicidad de estos microorganismos en gatos domésticos, el reservorio para ambos microorganismos. Algunos estudios han investigado el aislamiento y la detección de estos microorganismos en el torrente circulatorio de los felinos y la seroepidemiología. En un estudio llevado a cabo en San Francisco, Koehler y cols. observaron que el 41% de las muestras de sangre de 61 gatos vagabundos o domésticos tuvieron cultivos positivos para *B. henselae*; los cachorros tuvieron mayor probabilidad de ser bacteriémicos.⁷⁰⁵ Chomel y cols. también estudiaron 205 gatos que vivían en el norte de California y observaron que el 39,5% de ellos había sufrido una bacteriemia por *B. henselae*; el 52% de estos gatos bacteriémicos tenían más de 1 000 UFC de bacterias por mililitro de sangre cultivada.²⁴³ Entre estos animales, el 81% tuvo una prueba positiva para anticuerpos contra *B. henselae* y los gatos bacteriémicos tenían títulos de anticuerpos más altos que los no bacteriémicos. Heller y cols. efectuaron en Francia hemocultivos en 94 gatos extraviados de 10 colonias de gatos y observaron que el 53% de los animales estaban bacteriémicos con una especie de *Bartonella*.⁵⁵⁶ De las 50 cepas obtenidas, 35 eran *B. henselae* o una variante de *B. henselae*, y 15 eran *B. clarridgeiae*.

geiae. Gurfield y cols. realizaron un estudio epidemiológico en 436 gatos domésticos en Francia y observaron que 5 (1,1%) estaban infectados simultáneamente por *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, mientras que 2 (0,5%) lo estaban por dos cepas de *B. henselae* que mostraban variaciones en la secuencia del gen de rRNA 16S.⁵¹¹ En un estudio de 100 gatos de 89 casas en Freiburg, Alemania, el 13% presentaba bacteriemia por *B. henselae* o una variante de *B. henselae*.¹¹²³ En un estudio de un perro sano y ocho gatos sanos (todos con pulgas) en una única casa, se aisló *B. clarridgeiae* en un gato dos veces y *B. henselae* de un segundo gato cuatro veces en un período de 3 años.⁷¹⁵ En un período de 16 meses, se aisló *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* en el perro en 8 de 10 intentos de cultivo. El propietario de estos animales era seronegativo a pesar de su contacto frecuente con ellos.

Los estudios de seroprevalencia también han documentado una tasa alta de infección por *Bartonella* entre los gatos en distintas partes del mundo. Un examen de sueros de banco provenientes de 592 gatos en el área de Baltimore arrojó una seroprevalencia de *B. henselae* del 14,7% y un estudio de seroprevalencia en Suiza de 728 gatos observó que el 8,3% tenía anticuerpos contra *B. henselae*, sin ninguna diferencia importante en la seroprevalencia entre los animales enfermos y los sanos.^{240,469} En un estudio llevado a cabo en Dinamarca se observó que el 45,5% de 92 gatos de albergues o extraviados tenían anticuerpos contra *B. henselae*.²⁴⁴ Es interesante destacar que en un estudio seroepidemiológico similar sobre prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella* en gatos domésticos realizado en Suecia se observó que el 25% de 292 gatos tenía anticuerpos contra *B. elizabethae*, y la máxima prevalencia (46%) se halló en los que vivían en Estocolmo. Los autores señalaron que *B. elizabethae* fue el agente más frecuente hallado en los pacientes humanos de la misma región geográfica.⁵⁷⁵

También se han buscado especies de *Bartonella*, sobre todo *B. henselae*, en las pulgas de los gatos (*Ctenocephalides felis*), el presunto vector responsable de la transmisión de las bartonelas entre los gatos y posiblemente a los seres humanos. En una encuesta de 113 gatos de albergues en Holanda, el 50% era seropositivo para especies de *Bartonella*; el 22% también tenía hemocultivos positivos.¹¹⁵ Siete de 27 extractos de DNA de pulgas extraídas de estos gatos contenían DNA de *Bartonella*. Chomel y cols. detectaron DNA de *B. henselae* en el 34% de 132 pulgas extraídas de 47 gatos de residencias para estos animales, el 89% de los cuales eran bacteriémicos por *B. henselae*.²⁴⁶ Estos investigadores también demostraron que las pulgas extraídas de gatos bacteriémicos podían transmitir *B. henselae* a gatos sin patógenos específicos. Sin embargo, los gatitos sin patógenos alojados juntos con gatos bacteriémicos que no tenían pulgas no se infectaron por *B. henselae*. Este microorganismo puede multiplicarse hasta cantidades elevadas en la pulga del gato y mantenerse viable en las heces de las pulgas al menos durante 3 días.⁴⁰⁹

En los gatos, la bacteriemia por *B. henselae* o *B. clarridgeiae* suele ser asintomática y la presencia de enfermedad manifiesta parece depender de la cepa. Kordick y cols. inocularon 18 gatos libres de patógenos específicos con *B. henselae* o *B. clarridgeiae* y observaron que, a pesar de la bacteriemia persistente, los signos y los síntomas clínicos eran mínimos.⁷¹⁶ Mediante PCR se pudo detectar DNA de *Bartonella* en sangre, encéfalo, ganglios linfáticos, miocardio, hígado y riñones de los animales infectados. O'Reilly y cols. inocularon nueve gatos con una cepa de *B. henselae* virulenta y observaron que todos se volvían bacteriémicos dentro de los 14 días después de la infección; uno se mantuvo bacteriémico hasta 18 semanas

después de la infección.⁹⁷¹ Se desarrollaron anticuerpos anti-*B. henselae* en todos los animales. En otro estudio de 19 gatos pertenecientes a 14 pacientes con enfermedad del araño de gato, 17 tuvieron hemocultivos positivos y 13 mantuvieron positivos los cultivos para *Bartonella* durante los 12 meses siguientes.⁷²⁰ En un estudio de tres gatos con infección natural en un período de 2 años se observaron bacteriemias recurrentes en los tres con intervalos de 3 a 19 meses entre recaídas.⁶⁵⁸ Luego de episodios bacteriémicos, también se observaron aumentos en los títulos de anticuerpos específicos de *B. henselae*. Se demostró que los aislamientos de *B. Henselae* en muestras seriadas de sangre de los gatos bacteriémicos que se controlaron tenían diferentes polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción con el tiempo. El surgimiento de microorganismos genéticamente distintos durante picos de bacteriemia recurrente puede contribuir al establecimiento de infecciones persistentes en estos animales.

Importancia clínica de las especies de *Bartonella*

Las especies de *Bartonella* se asocian con infecciones en el huésped inmunodeprimido, sobre todo en los pacientes con infección por HIV-1. Las infecciones por *Bartonella* incluyen ahora varios trastornos bien descritos, entre ellos fiebre de las trincheras clásica y urbana, angiomatosis bacilar con afectación cutánea o sistémica, peliosis hepática, fiebre recurrente con bacteriemia, endocarditis y enfermedad del araño de gato. La especie tipo del género *Bartonella*, *B. bacilliformis* produce la fiebre de Oroya, una enfermedad febril limitada geográficamente. Los progresos epidemiológicos en relación con estos microorganismos y el aumento de publicaciones sobre distintas especies y sus asociaciones con animales, vectores insectos y enfermedades humanas se deben en gran parte a los excelentes métodos de laboratorio basados tanto en técnicas de cultivo "tradicionales" como en técnicas moleculares "de avanzada".⁷⁵⁵

FIEBRE DE OROYA Y VERRUGA PERUANA

Estas dos entidades clínicas son manifestaciones de la infección por *Bartonella bacilliformis*.^{808,809} Estas infecciones son geográficamente restringidas debido a los hábitats limitados del vector principal, la mosca *Lutzomyia verrucarum*. Se desconoce el reservorio del microorganismo, aunque los seres humanos con bacteriemia asintomática pueden serlo. Se observan infecciones en los valles de los ríos de la Cordillera de los Andes occidental, en alturas de entre 600 y 2 400 m en Perú, Ecuador y Colombia. Esta infección también se conoce como enfermedad de Carrión en honor de Daniel Carrión, un estudiante de medicina peruano en el que se desarrolló la enfermedad después de haberse autoinoculado con material proveniente de una lesión infecciosa. Luego de la mordedura de un vector hembra infectado, los síntomas de la fiebre de Oroya aparecen en 3 semanas a 3 meses, aunque también puede ocurrir una infección asintomática. El inicio de la enfermedad puede ser brusco o insidioso. El paciente puede tener anorexia, cefalea, malestar general y fiebre leve que dura 2-7 días o más. Cuando el inicio es brusco, el paciente puede tener fiebre, cefalea grave, escalofríos y alteraciones del sensorio. Se presenta anemia grave causada por la destrucción de los eritrocitos por los microorganismos. También ictericia, hepatoesplenomegalia y adenopatías generalizadas, junto con dolor muscular y articular intenso.⁷²² Se desarrollan infecciones oportunistas (p. ej., salmonelosis bacteriémica, sepsis por gramnegativos) o infeccio-

nes latentes reactivadas (p. ej., toxoplasmosis, histoplasmosis) en un 30% de los pacientes causadas por el compromiso de la inmunidad celular. Puede haber disnea, angina de pecho y neumocistosis, así como delirio y coma. Durante esta fase, se pueden aislar los microorganismos en la sangre y en realidad se los puede observar en extendidos de sangre dentro de los eritrocitos. La infección aguda durante el embarazo a menudo conduce al aborto o a la muerte materna, fetal o ambas. Sin tratamiento, la tasa de letalidad de la fiebre de Oroya puede ser de hasta un 90%, pero con tratamiento los casos fatales se reducen a menos del 10%. Este estadio "crítico" dura de 2 a 4 semanas, momento en el cual los microorganismos desaparecen de la circulación, la temperatura se normaliza y la anemia se corrige.

Después de la resolución de la fiebre de Oroya, puede persistir el dolor en los huesos, las articulaciones y los músculos hasta el estadio de desarrollo de la verruga. Esta etapa se caracteriza por la aparición de lesiones nodulares sobre las partes expuestas del cuerpo, sobre las mucosas o en los órganos internos.⁸ Estos nódulos se desarrollan en un período de 1-2 meses y pueden persistir durante meses a años. Las lesiones son de color rojo a púrpura, no son dolorosas a la palpación si no tienen una infección secundaria y pueden presentarse agrupadas. Las "verrugas" pueden ser sésiles, similares a placas, miliares, nodulares, pedunculadas o confluentes.⁴⁸ En general, el dolor articular y la fiebre ceden después de la aparición de las lesiones cutáneas y la anemia suele faltar durante esta etapa de la enfermedad. En las muestras de tejidos de lesiones de verrugas, se puede observar *B. bacilliformis* con la tinción de Warthin-Starry o de Giemsa y puede ser cultivado de las lesiones cutáneas y, en ocasiones, de la sangre y la médula ósea. La fiebre de Oroya ha sido tratada con distintos agentes, entre ellas penicilina, tetraciclina y estreptomycin, y se considera el cloranfenicol como el de elección.⁸⁰⁹ También se han obtenido buenas respuestas con ciprofloxacina. La estreptomycin era el preferido para el tratamiento de la enfermedad cutánea, pero la rifampicina y la ciprofloxacina producen buenas respuestas clínicas y se pueden administrar por boca en lugar de la inyección intramuscular.

FIEBRE DE LAS TRINCHERAS "CLÁSICA" Y "URBANA"

B. quintana es el agente de la fiebre de las trincheras, una enfermedad febril y debilitante transmitida por piojos que afectó a casi un millón de personas, incluido el personal militar alemán y aliado durante la Primera Guerra Mundial. Después de la guerra, siguió apareciendo en España, Francia, Italia, partes de Europa del Este, norte de África y China. *B. quintana* también ha sido detectada en piojos obtenidos de regiones de Perú y Sudamérica, donde no se había documentado antes la fiebre de las trincheras.¹⁰⁴⁸ Las pruebas serológicas indican la presencia del microorganismo en Bolivia y México.⁹⁶ El microorganismo es transmitido por el piojo del cuerpo humano, *Pediculus humanus*, que ha crecido en prevalencia en todo el mundo durante los últimos 10 a 15 años, sobre todo en los países en vías de desarrollo y en áreas de gran desorden social, político y económico, como la ex Unión Soviética y algunas regiones de Europa del Este. La bacteria infecta al piojo, que luego elimina heces cargadas de microorganismos que contaminan la herida por mordedura. En los seres humanos, se desarrolla fiebre, malestar general, escalofríos, sudoración profusa y dolor intenso cervical, dorsal y de las piernas después de un período de incubación de 5 a 20 días. Es característica la conjuntivitis, el dolor retroorbitario y el dolor de las tibias; se ha

observado esplenomegalia y erupción macular en algunos pacientes. La fiebre puede ceder rápidamente o puede durar 4 a 5 días. Las fiebres que duran hasta 5 días pueden aumentar y disminuir repetidas veces, o la fiebre puede persistir sin ceder durante varias semanas. En general, la enfermedad no es grave y es autolimitada. Los pacientes tienen una rápida respuesta al tratamiento con tetraciclinas, cloranfenicol o ambos.

La fiebre de las trincheras "urbana" es una entidad clínica documentada entre personas sin hogar en áreas urbanas. Esta infección se asocia con fiebre, sudores nocturnos, bacteriemia prolongada o intermitente, infestación por piojos y títulos elevados de anticuerpos contra *B. quintana*. La aparición de una infección por *B. quintana* entre individuos sin hogar en áreas urbanas ha conducido a investigaciones de fiebre de las trincheras emergente y otras enfermedades transmitidas por piojos entre personas indigentes de varias ciudades.^{180,181,427,1103,1207} El papel de los piojos del cuerpo en la transmisión de la fiebre de las trincheras urbana ha sido confirmado por varias investigaciones epidemiológicas y de laboratorio. En un estudio, se recogieron piojos de 268 personas en el Centro de Desinfección Municipal de Moscú y se sometieron a análisis por PCR para la detección de la secuencia del gen *gltA* (citrato sintasa) de *B. quintana*.¹¹¹¹ Se detectó DNA de *B. quintana* en el 12,3% de las muestras de piojos estudiadas. Este y otros estudios han confirmado el papel fundamental de *P. humanus* en la epidemiología de la fiebre reemergente del siglo XXI.⁹⁶¹

ANGIOMATOSIS BACILAR

La angiomatosis bacilar es una infección bacteriana causada por *B. henselae* y *B. quintana* que conduce a proliferación vascular difusa inusual; se observa principalmente en pacientes con enfermedad por HIV avanzada.^{61,276,456,879,1017,1133} Esta infección también ha sido comunicada en pacientes con inmunosupresión sometidos a un trasplante, en los individuos que reciben quimioterapia oncológica y en los pacientes con tratamiento prolongado con corticosteroides.^{1151,1281} También se la ha diagnosticado en adultos y niños inmunocompetentes.^{1192,1260} Los pacientes con SIDA que tienen angiomatosis bacilar suelen tener recuentos de linfocitos CD4 de menos de 200 células/ μ L cuando aparecen las lesiones. La enfermedad se distingue del sarcoma de Kaposi y otras neoplasias vasculares en que las lesiones comienzan como pápulas pequeñas que crecen gradualmente para formar nódulos rojos a púrpura violáceos redondeados que tienen un pequeño collar epitelial.²⁶⁴ Las lesiones de sarcoma de Kaposi suelen ser rosa claras a pardas o negras y son similares a placas más que nodulares, aunque sobre algunas superficies corporales, las lesiones de angiomatosis bacilar pueden desarrollarse inicialmente como placas induradas e hiperpigmentadas.²⁶⁴ La angiomatosis bacilar y el sarcoma de Kaposi pueden coexistir en el mismo paciente.¹²¹⁴ Las lesiones de la angiomatosis bacilar se desarrollan como lesiones separadas que crecen y coalescen para formar nódulos más grandes. Inicialmente lisas, luego pueden ulcerarse y cubrirse de costras. Algunas se localizan más profundamente en los tejidos subcutáneos (p. ej., hígado, bazo), pueden afectar hueso y médula ósea y formar grandes lesiones osteolíticas.⁷⁰⁷ La afectación del hueso por la angiomatosis bacilar es casi siempre dolorosa, suele afectar el radio, el peroné y la tibia, y se asocia fundamentalmente con infección por *B. quintana*.⁷⁰⁸ Se puede observar una lesión similar a una placa celulítica eritematosa en la piel que cubre y rodea a las lesiones óseas. La afectación visceral puede ocurrir como lesiones vasculares diseminadas o como una peliosis hepática bacilar cuando el

hígado está afectado. Se han documentado lesiones de angiomatosis bacilar extracutánea en las superficies mucosas de los aparatos respiratorio y gastrointestinal superior e inferior, las conjuntivas y la órbita, el corazón, el diafragma, las vías biliares, los músculos, el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el aparato genital y el sistema nervioso central.^{611,614,704,908,1185,1209,1292} Las lesiones de la angiomatosis bacilar interna pueden volverse lo suficientemente grandes como para producir compresión u obstrucción de órganos internos, con signos y síntomas constitucionales que incluyen fiebre, anorexia, vómitos y pérdida de peso. El diagnóstico histopatológico requiere la obtención de biopsias en sacabocados o escisionales para las lesiones cutáneas y subcutáneas, mientras se suele utilizar la escisión para las lesiones de asiento profundo. Además de la histopatología, también se pueden enviar biopsias para cultivo y análisis por microscopia electrónica y métodos moleculares.

Desde el punto de vista histológico, las lesiones de la angiomatosis bacilar están compuestas por células endoteliales cuboideas y grandes que revisten los vasos sanguíneos. Estas células se extienden en la luz vascular y se asocian con agregados de material granuloso purpúrico que representan agrupamientos de bacterias.¹²⁰⁸ También existe un infiltrado inflamatorio denso de neutrófilos. Las lesiones de la angiomatosis bacilar pueden ser diferenciadas histológicamente del sarcoma de Kaposi en que no existe ningún vaso sanguíneo dentado extraño como se observa en este trastorno y el infiltrado inflamatorio consiste en linfocitos, histiocitos y neutrófilos por oposición a las células plasmáticas.¹³⁹³ Cuando se tiñen cortes de tejido biopsiado con la tinción argéntica de Warthin-Starry, se observan grumos y masas enmarañadas de bacterias intersticiales. Se ha aislado *B. henselae* y, en algunos casos, *B. quintana* de la sangre, las lesiones cutáneas, el hueso, los órganos viscerales y el encéfalo de pacientes con angiomatosis bacilar.^{707,762,1065,1066,1188,1361} En un estudio de casos y controles de 1997 de 49 pacientes con angiomatosis bacilar en San Francisco, el 53% estaba infectado por *B. henselae* y el 47% por *B. quintana*.⁷⁰⁸ La infección por *B. henselae* se conectó desde el punto de vista epidemiológico con la exposición a gatos y pulgas de gatos, mientras que la infección por *B. quintana* se asoció con bajos ingresos, falta de hogar y exposición a piojos. Algunos investigadores y médicos piensan que la angiomatosis bacilar puede ser una manifestación de la enfermedad del arañazo de gato peculiar del huésped inmunodeprimido.^{676,706,866} Algunos estudios in vitro de *Bartonella* han establecido que estos microorganismos pueden estimular la angiogénesis, el proceso fisiológico que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos y afectar la migración y la proliferación de las células endoteliales.^{449,703}

En general, la angiomatosis bacilar cutánea responde al tratamiento con eritromicina, utilizando una dosis de 500 mg cuatro veces por día.¹³⁹³ El tratamiento antibiótico se debe continuar por lo menos durante 6 semanas; pueden ser necesarias series más largas dado que las lesiones a menudo recurren después de suspenderlo el tratamiento. El tratamiento parenteral puede ser necesario para tratar las recaídas de la infección cutánea y las infecciones diseminadas. Si las lesiones de angiomatosis bacilar están limitadas a la piel, pueden escindirse mediante cirugía. También se han comunicado buenas respuestas clínicas a otros antibióticos, como rifampicina, tetraciclinas (doxiciclina, minociclina, tetraciclina), otros macrólidos (azitromicina, claritromicina), cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina, norfloxacina y ciprofloxacina con gentamicina, pero la recaída es frecuente luego de suspendido el tratamiento. Los fármacos que inhiben la biosíntesis de la

pared celular (p. ej., penicilinas y cefalosporinas) no son útiles para el tratamiento de esta afección.

PELIOSIS

Antes de la aparición de la epidemia de SIDA, la peliosis de los órganos viscerales internos era rara y sólo había sido descrita en pacientes con carcinoma o tuberculosis o en personas tratadas con esteroides anabólicos. La peliosis hepática se caracteriza por la presencia de lesiones quísticas llenas de sangre dispersas en la totalidad del parénquima del hígado.¹³⁹³ Se ha comunicado una cantidad creciente de casos de peliosis que afectan el hígado y el bazo (peliosis esplénica) en asociación con la infección por HIV.^{708,1002} La mayoría de los pacientes con peliosis hepática o esplénica también tienen angiomatosis bacilar y, dentro de los quistes hemáticos del hígado y el bazo, contienen bacterias similares a las que se ven en las biopsias de angiomatosis bacilar con la tinción de Warthin-Starry. La mayoría de los pacientes con peliosis hepática bacilar presentan pérdida de peso, dolor abdominal, náuseas intratables, anemia, diarrea, fiebre, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía. También se ha comunicado un sangrado intraperitoneal grave con shock hipovolémico como manifestación inusual de la peliosis parenquimatosa bacilar.⁸⁰⁰ En general, las enzimas hepáticas están elevadas, con concentraciones de fosfatasa alcalina de hasta 5 a 10 veces el valor normal.¹⁰⁰² Se ha comunicado también peliosis bacilar parenquimatosa de otros órganos internos (corazón, laringe, pulmones, glándulas suprarrenales, cuello uterino, ovarios, glándula pineal y plexo coroideo). La peliosis hepática parece estar asociada exclusivamente con la infección por *B. henselae* y algunos autores piensan que es otra manifestación de la angiomatosis bacilar.⁸²⁶

FIEBRE Y BACTERIEMIA

Se describió bacteriemia por *B. henselae* en pacientes con HIV, pacientes con SIDA, receptores de trasplantes alogénicos inmunosuprimidos farmacológicamente y huéspedes inmunocompetentes sin factores de riesgo conocidos para enfermedades inmunosupresoras.^{1057,1187,1361} En los pacientes con SIDA, se detectó bacteriemia por *B. henselae* en aquellos con angiomatosis bacilar focal o peliosis y en los que no las tienen. Los pacientes inmunodeprimidos presentan fiebres recurrentes, pérdida de peso, malestar general y fatiga; la recaída luego del tratamiento es frecuente. En los pacientes infectados por HIV, *B. henselae* también puede producir una enfermedad inflamatoria generalizada del sistema reticuloendotelial: se pueden detectar microorganismos histopatológicamente o mediante técnicas moleculares en lesiones inflamatorias y necróticas del bazo, hígado, corazón, médula ósea y ganglios linfáticos.¹¹⁸⁶ En individuos inmunocompetentes y negativos para el HIV, la bacteriemia por *B. henselae* presenta un inicio brusco con fiebre y dolor articular y muscular asociado; algunos pacientes pueden manifestar signos y síntomas de afectación del SNC (cefalea, fotofobia y meningismo). Se ha documentado serológicamente a *B. henselae* como causa de "fiebre de origen desconocido" tanto en niños como en adultos.^{625,1293} Estos pacientes presentan fiebre, anorexia, cefalea y otros síntomas inespecíficos.

La bacteriemia persistente por *B. quintana* era un síntoma reconocido de la fiebre de las trincheras clásica y es una manifestación frecuente de "fiebre de las trincheras" reemergente entre los que no tienen hogar y los residentes alcohólicos de entornos urbanos. La fiebre y la bacteriemia producidas por *B. quintana* fueron documentadas por primera vez en 10 pacien-

tes sin hogar que residían en Seattle y eran negativos para anticuerpos contra el HIV pero tenían alcoholismo crónico como enfermedad subyacente.¹²⁰⁷ Todos estos individuos se presentaron con fiebre, dos tenían esplenomegalia, dos comunicaron el arañazo reciente de un gato y se desarrolló una endocarditis en uno (véase más adelante).¹²⁰⁶ Brouqui y cols. documentaron bacteriemia por *B. quintana* en 10 (14%) de 71 pacientes sin hogar en Francia.¹⁸¹ Cinco de ellos tenían bacteriemia crónica, como lo demostraron los hemocultivos positivos durante varias semanas y 8 pacientes con bacteriemia estaban afebriles. Además, el 30% de los pacientes tenían títulos elevados de anticuerpos anti-*B. quintana* y se detectaron infecciones recientes (bacteriemia o seroconversión) en 17 pacientes (24%). En este estudio, fue más probable que los pacientes que no tenían hogar y presentaron una bacteriemia por *B. quintana* hubieran tenido exposición a piojos, y que presentaran cefaleas, dolor de piernas y recuentos más bajos de plaquetas que aquellos que no tenían bacteriemia ni eran seronegativos para anticuerpos contra *B. quintana*.^{180,181} Cabe señalar que se detectó DNA de *B. quintana* mediante PCR en piojos de 3 de 15 pacientes de los que se había recogido. De estos tres pacientes, dos eran bacteriémicos y uno era seropositivo pero no bacteriémico. Los estudios serológicos también demostraron una alta prevalencia de infecciones por *Bartonella* entre adictos a drogas intravenosas que viven en la ciudad. Comer y cols. comunicaron que el 37,5% de las muestras de suero recogidas de 630 adictos a drogas intravenosas en Baltimore reaccionaron al menos con un antígeno de *Bartonella* (*B. henselae*, *B. quintana* o *B. elizabethae*) mediante ensayo de inmunofluorescencia.²⁷⁷

En general, los pacientes inmunocompetentes tienen una respuesta rápida a una serie corta (10 días o menos) de tratamiento y no sufren recaídas; en algunos casos, las infecciones se resuelven sin antibioticoterapia.⁶²⁵ Sin embargo, Lucey y cols. informaron sobre dos pacientes inmunocompetentes que presentaron una enfermedad con recaídas y hemocultivos positivos para *B. henselae*.⁸⁰² Ambos habían sido picados por garrapatas antes de enfermarse. Estos dos casos fueron los primeros en los cuales se sugirió una transmisión epidemiológica de *B. henselae* por insectos. Drancourt, Raoult y otros autores comunicaron dos pacientes con bacteriemia y adenopatía mediastínica crónica de los que se recuperó *B. quintana* de los cultivos de sangre y médula ósea.^{355,1049} Se trataba de mujeres de edad media seronegativas para anticuerpos contra HIV, que tenían enfermedades subyacentes (tratamiento con corticosteroides, insuficiencia renal crónica que requería hemodiálisis), tuvieron exposición a gatos, gatitos y pulgas de gatos y fueron tratadas con éxito con aminoglucósidos parenterales.^{355,1049} Es interesante que ninguna de las pacientes tuvo una respuesta serológica detectable contra *B. quintana*.

ENDOCARDITIS

Las especies de *Bartonella* y *B. quintana* en particular, han sido aisladas en varios casos de endocarditis con "cultivo negativo".^{429,518,627,1206} Se comunicó por primera vez una endocarditis por *B. quintana* en 1993 en un varón homosexual de 50 años infectado por HIV que tenía sudores nocturnos, pérdida de peso y fatiga.¹²⁰⁵ En el examen físico, se observó insuficiencia renal leve, esplenomegalia, anemia y un soplo cardíaco holosistólico y el ecocardiograma puso en evidencia vegetaciones en las válvulas mitral y aórtica. Con posterioridad, se documentó *B. quintana* como causa de bacteriemia en 10 pacientes alcohólicos febriles y sin hogar en Seattle; en uno de ellos se

desarrolló una endocarditis de la válvula aórtica.¹²⁰⁶ Aun después de 21 días de tratamiento, se siguió detectando *B. quintana* en los tejidos mediante PCR. También se aisló el microorganismo como causa de endocarditis en tres hombres alcohólicos sin hogar de Francia.³⁵⁴ Todos estos pacientes necesitaron el reemplazo de la válvula aórtica mitral. También se ha comunicado endocarditis por *B. quintana* en un adulto inmunodeprimido.¹⁸⁴ En 1993, Hadfield y cols. describieron el primer caso de endocarditis causado por *B. henselae* en un hombre HIV negativo de 59 años con antecedentes de alcoholismo y otro caso fue comunicado en 1995 en un hombre de 41 años antes sano.^{520,588} Ambos pacientes requirieron cirugía de reemplazo valvular. Desde entonces, se ha identificado a *B. henselae* como causa tanto de endocarditis de válvula natural como de válvula protésica en varios pacientes inmunocompetentes.^{312,378,696} *B. elizabethae* fue reconocido por primera vez como causa de endocarditis en un hombre de 31 años inmunocompetente.²⁹⁹ Esta infección se resolvió con el reemplazo valvular y el tratamiento con vancomicina e imipenem. En 1996, Raoult y cols. informaron acerca de 21 casos nuevos de endocarditis por *Bartonella* en pacientes franceses diagnosticados mediante técnicas serológicas, de cultivo y moleculares.¹⁰⁵⁰ De los 22 pacientes, 11 eran alcohólicos, 9 no tenían hogar, 13 presentaban lesiones valvulares preexistentes y 4 tenían antecedentes de exposición a gatos. La mayoría de los pacientes presentaban vegetaciones en las válvulas aórticas y se desarrollaron complicaciones embólicas en muchos de ellos y todos excepto un paciente requirieron cirugía valvular. Los microorganismos implicados fueron *B. quintana* (5 pacientes), *B. henselae* (4) y una especie de *Bartonella* indeterminada (13). Los últimos 13 pacientes fueron diagnosticados mediante pruebas serológicas que no pudieron distinguir entre *B. quintana* y *B. henselae*. En este estudio, la endocarditis por *B. quintana* se asoció con pacientes sin hogar con alcoholismo crónico, sin daño valvular previo, mientras que la endocarditis por *B. henselae* ocurrió principalmente en pacientes con patología valvular preexistente y antecedentes de contacto con gatos. La endocarditis por *Bartonella* ha sido tratada con éxito con combinaciones de amoxicilina y gentamicina parenteral, vancomicina parenteral con ofloxacina y netilmicina seguidos de ofloxacina, rifampicina y pristinomicina oral, y con ceftriaxona parenteral seguida de una serie prolongada de eritromicina oral.^{354,1050,1207}

Las especies de *Bartonella* también causan endocarditis y otras enfermedades cardíacas en perros. Breitschwerdt y cols. describieron en Carolina del Norte un caso de endocarditis que afectaba las válvulas aórtica y mitral en una perra Labrador retriever de 3 años a la que se le habían extirpado los ovarios.¹⁶³ Se aisló un bacilo gramnegativo con requerimientos nutricionales especiales de la sangre del perro utilizando el método de lisis-centrifugación, y el DNA extraído de las válvulas cardíacas afectadas fue amplificado mediante técnica de PCR y comparado con otras especies de *Bartonella*. La hibridación de DNA, la secuenciación de rRNA 16S, el análisis de ácidos grasos celulares y las pruebas de fenotipificación del microorganismo aislado lo caracterizaron como una nueva especie de *Bartonella* que se asemejaba más estrechamente a *B. vinsonii*. Se propuso el nombre *B. vinsonii* subespecie *berkhoffii* para este nuevo microorganismo.⁷¹⁹ Este agente representa un nuevo patógeno veterinario que produce arritmias cardíacas, miocarditis y endocarditis en perros y recientemente ha sido comunicado como agente de endocarditis asintomática en un ser humano.^{161,1102} En la actualidad, *B. henselae*, *B. elizabethae* y *B. clarridgeiae* han sido detectados mediante técnicas moleculares en muestras de sangre de perros y recientemente se ha

recuperado *B. clarridgeiae* como causa de endocarditis en un boxer macho castrado que tenía un soplo cardíaco sistólico y estenosis grave de la válvula aórtica.^{247,862} Los cánidos salvajes y domésticos pueden ser reservorios de todos estos agentes.⁸⁶²

ENFERMEDAD POR ARAÑAZO DE GATO

La enfermedad por arañazo de gato es una causa frecuente de linfadenopatía, sobre todo en niños y adolescentes. Se presenta en todo el mundo; la mayoría de los casos ocurren entre septiembre y marzo; en los climas cálidos, las frecuencias pico pueden ocurrir en julio y agosto. Alrededor del 90% de los pacientes tienen antecedentes de exposición a gatos y habrá ocurrido el arañazo o la mordedura de un gato en alrededor del 75-80% de estas personas.⁹⁷ Los gatos pequeños parecen estar implicados más a menudo que los gatos adultos y la transmisión parece ser por contacto directo, dado que la enfermedad generalmente sigue a la mordedura, el arañazo o la lamida de un gato joven. Alrededor de 3 a 10 días después de que ocurre el arañazo o la mordedura, se forma una pápula eritematosa o pústula primaria. Estas lesiones persisten aproximadamente durante 2 a 3 semanas. Durante este período, se puede presentar fiebre leve en un tercio de los pacientes y se observa malestar general y fiebre aproximadamente en el 25% de los casos.⁹⁷ Alrededor del 25% presenta cefaleas y dolores musculares con odinofagia y se puede observar también una erupción débil que dura 1 a 2 semanas. Se desarrolla linfadenopatía regional en más del 90% de los pacientes cuya localización depende del sitio de la mordedura o el arañazo del gato. Como la mayoría de las lesiones se encuentran en los miembros superiores, la adenopatía suele aparecer en la región axilar, cervical o submandibular. En alrededor del 50% de los pacientes se afectan ganglios aislados. Es frecuente una linfadenopatía no contigua o generalizada y la hepatoesplenomegalia, pero puede confundirse con un proceso maligno (linfoma) cuando se presenta.^{461,677} Los ganglios linfáticos afectados suelen mostrar granulomas estables, microabscesos estrellados e hiperplasia folicular. A menudo se observan grupos de microorganismos bacilares en cortes de biopsias de ganglios linfáticos que se tiñen con la tinción de impregnación argéntica de Warthin-Starry. En general, los ganglios linfáticos agrandados sufren una regresión espontánea en varios meses, aunque hasta el 20% de los pacientes pueden mostrar linfadenopatía durante 12 a 24 meses.

Si bien es infrecuente, la enfermedad por arañazo de gato puede tener presentaciones y complicaciones atípicas. Estas manifestaciones incluyen el síndrome oculoganglionar de Parinaud, que se presenta como un granuloma ocular o conjuntivitis con linfadenopatía preauricular, osteomielitis, una masa epitroclear que imita un rhabdomyosarcoma, y microabscesos y granulomas hepáticos y esplénicos.^{51,494,612,1323} En general, el síndrome oculoganglionar es el resultado del arañazo, la lamida o la mordida de un gato sobre el párpado o en las conjuntivas, aunque también puede ocurrir la autoinoculación desde la lesión primaria en el ojo. La encefalopatía y la meningitis aséptica por enfermedad por arañazo de gato son complicaciones raras que pueden ocurrir 1 a 6 semanas después de que aparece la linfadenopatía regional y se caracterizan por encefalitis, convulsiones, mielitis y neuropatía.^{460,941,1392} El paciente puede tener cefalea, alteraciones de su estado mental, convulsiones, conductas agresivas, entrar en coma. También se ha comunicado retinitis asociada con la enfermedad por arañazo de gato, incluido un caso de bacteriemia por *B. henselae* que condujo a una pérdida visual aguda.^{797,1392} La enfermedad también puede producir osteomielitis multifocal en sitios que están alejados

del arañazo o la mordedura inicial.^{728,878} Las manifestaciones pulmonares son excepcionales.⁸²¹

En general, es una enfermedad autolimitada que no suele responder al tratamiento antibiótico dirigido. A pesar de la sensibilidad in vitro de *B. henselae* a muchos agentes, su uso para el tratamiento de la enfermedad por arañazo de gato no ha conducido a beneficios claros para el paciente. Sólo los aminoglucósidos y la gentamicina en particular han resultado eficaces en el tratamiento de las complicaciones supuradas de esta enfermedad.^{97,917} Chia y cols. informaron sobre cuatro pacientes que fueron tratados con éxito con una serie de 5 a 10 días de azitromicina, incluido un paciente en el cual el tratamiento con doxiciclina y cefazolina había fracasado.²³⁹ El tratamiento exitoso con azitromicina puede estar relacionado no sólo con la sensibilidad in vitro de las especies de *Bartonella* a este agente, sino también con la penetración y la acumulación intracelular de azitromicina dentro de los neutrófilos y los macrófagos, que conduce a una relación de 40:1 entre la concentración intracelular y la extracelular del fármaco.^{239,846} La ciprofloxacina también ha sido utilizada con éxito, otra vez presumiblemente debido a su acumulación intracelular.⁵⁸⁴

Algunos estudios microbiológicos y serológicos llevados a cabo en los últimos años han establecido que *B. henselae* es el agente bacteriano responsable de la enfermedad por arañazo de gato. En 1988, English y cols., del Instituto de Anatomía Patológica de las Fuerzas Armadas (Armed Forces Institute of Pathology, AFIP) aislaron un microorganismo gramnegativo de los ganglios linfáticos de 10 pacientes con enfermedad del arañazo de gato.³⁸⁰ Una de estas cepas más otras tres aisladas en los ganglios linfáticos de niños con la enfermedad fueron caracterizadas mejor en los CDC y se propusieron como el género nuevo *Afipia* (nombre por AFIP), y el nombre de la especie *felis* reflejaba su asociación con esta enfermedad. Sobre la base de estos estudios, se postuló que *A. felis* era el agente causal de la afección. Al mismo tiempo, varios investigadores estaban examinando la etiología de la angiomasosis bacilar, la peliosis y la bacteriemia en pacientes infectados por HIV con nuevos y poderosos métodos moleculares. Utilizando cebadores de oligonucleótidos altamente conservados de los genes 16 rRNA bacterianos, Relman y cols. pudieron demostrar y amplificar las secuencias de DNA bacteriano en tejidos de angiomasosis bacilar de pacientes con SIDA y mostraron que estas secuencias estaban genotípicamente relacionadas con especies de *Rochalimaea*, específicamente *R. (B.) quintana*.¹⁰⁶⁵ Slater y cols. también recuperaron un microorganismo similar a *Rochalimaea* de hemocultivos de adultos inmunodeprimidos febriles que tenían secuencias genéticas rRNA 16S que eran similares a las descritas por el grupo de Relman.¹¹⁸⁷ Esta investigación y otra establecieron que la especie de *Rochalimaea* recién descrita, *R. (B.) henselae*, y el antiguo agente de la fiebre de las trincheras, *R. (B.) quintana*, eran las causas de angiomasosis bacilar, peliosis y bacteriemia en los pacientes con SIDA.^{1057,1188}

En 1992, Regnery y cols. aislaron *R. (B.) henselae* en la sangre de un gato asintomático en dos ocasiones, y utilizando técnicas de anticuerpos inmunofluorescentes, el mismo grupo de investigación demostró que el 88% de los pacientes con enfermedad por arañazo de gato tenía títulos elevados de anticuerpos contra los antígenos de *R. (B.) henselae* y no contra antígenos de *A. felis*.^{1058,1059} Con posterioridad, varios grupos de investigación utilizaron PCR y técnicas similares para demostrar la presencia de DNA de *B. henselae* y la ausencia de DNA de *B. quintana* y *A. felis* en material purulento de los ganglios linfáticos supurados de pacientes con enfermedad por arañazo

de gato.^{33,34,489} Utilizando las técnicas de inmunofluorescencia, Zangwill y cols. observaron que el 84% de 45 pacientes tenían anticuerpos anti-*R. (B.) henselae*, comparado con el 3% de 112 pacientes controles. Además, el 81% de los gatos pertenecientes a pacientes con la enfermedad también eran seropositivos, comparado con el 38% de 29 animales controles.¹⁴²⁷ Este estudio comunicó asimismo que el riesgo era mayor para los individuos que tenían gatos pequeños que para los propietarios de gatos adultos, que los individuos que sufrían mordeduras o arañazos de gatos cachorros tenían mayor riesgo de la enfermedad que aquellos con heridas por gatos adultos y que el riesgo era mayor si el gato pequeño tenía pulgas.¹⁴²⁷ También en 1993, Dolan y cols. aislaron *B. henselae* de los ganglios linfáticos de dos pacientes inmunocompetentes con enfermedad por arañazo de gato.³⁴⁵ Los bacilos observados en las biopsias de ganglios linfáticos supurados también fueron identificados como *B. henselae* mediante tinción inmunocitoquímica con anticuerpos anti *B. henselae*. Otros estudios han confirmado los citados antes y, aunque no se ha caracterizado totalmente el papel de *A. felis* en la enfermedad, es muy probable que *B. henselae* sea la causa predominante.^{116,462} En 1999, *A. felis* fue aislado en el sistema de suministro de agua de un hospital francés en asociación con especies de amebas de vida libre, lo que llevó a los autores a sugerir que los aislamientos anteriores de *A. felis* en ganglios linfáticos de pacientes afectados por la enfermedad por arañazo de gato en dos ocasiones podían haberse debido a contaminación con agua y a procedimientos de esterilización ineficaces.⁷³⁹ El papel etiológico de *B. henselae* en la enfermedad por arañazo de gato ha sido reforzado también por la gran cantidad de estudios epidemiológicos sobre infección con *B. henselae* en gatos domésticos (véase la sección sobre "Epidemiología", antes).

En 1997, también se describió una segunda especie de *Bartonella*, *B. clarridgeiae*, en asociación con un caso de enfermedad del arañazo de gato.⁷¹⁷ En este caso, la enfermedad se desarrolló en un veterinario después de que fuera mordido por un gato de 6 semanas de vida. Los hemocultivos recogidos del paciente y las pruebas serológicas (IFA) para anticuerpos contra *B. henselae*, *B. quintana* y *B. elizabethae* fueron negativos. Sin embargo, el suero del paciente mostró reactividad en una prueba de inmunofluorescencia con una cepa de *Bartonella* aislada en hemocultivos obtenidos del gato. También se obtuvo evidencia serológica de una infección por *B. clarridgeiae* en un paciente con enfermedad por arañazo de gato que tenía síntomas inespecíficos, antecedente de exposición a gatos y arañazos de gatos, y un gran absceso de la pared cardíaca.⁸²¹ Aunque los cultivos del paciente se mantuvieron negativos, *B. clarridgeiae* fue aislado en la sangre de uno de los gatos de su propiedad.

OTRAS INFECCIONES

Desde el descubrimiento de la asociación de especies de *Bartonella* con enfermedad por arañazo de gato, angiomasosis hepática y peliosis hepática, se han comunicado otras distintas manifestaciones de infección por *B. henselae* tanto en huéspedes inmunodeprimidos como inmunocompetentes. En la mayoría de estas infecciones, se documentó una asociación con gatos pequeños, lo que condujo a una mayor creencia de la posibilidad de que las manifestaciones clínicas infrecuentes de la infección por *B. henselae* representan parte de una serie continua en la presentación clínica de la enfermedad. Estas manifestaciones incluyeron neurorretinitis sin el síndrome oculo-ganglionar de Parinaud, linfadenitis unilateral y difusa aisladas,

miocarditis grave y enfermedad neurológica asociada con demencia rápidamente progresiva.^{844,1153,1392} Meininger y cols. describieron el caso de un hombre sano en el cual se desarrolló miocarditis activa crónica debida a *B. henselae* que condujo a insuficiencia cardíaca y a la necesidad de un trasplante cardíaco.⁸⁵¹ La asociación de *Bartonella* con demencia por SIDA fue dilucidada por un estudio serológico llevado a cabo en Los Ángeles por Schwartzman y cols. en el cual se halló que tanto poseer un gato como padecer deterioro neuropsicológico y demencia se asociaban significativamente con la presencia de anticuerpos IgM contra *B. henselae*.¹¹⁵² Caniza y cols. describieron un caso de una infección pulmonar oportunista debida a *B. henselae* en una mujer de 19 años receptora de un trasplante renal.¹⁹⁷ El tejido de los nódulos pulmonares de esta paciente fue negativo en el cultivo pero contenía rRNA 16S específico para *R. henselae* por PCR. Los ocho gatos domésticos que vivían con ella tenían hemocultivos positivos para *B. henselae*; el análisis de PCR estableció que las cepas aisladas en felinos eran idénticas a las halladas en el tejido pulmonar de la paciente. La infección por *B. henselae* también ha sido responsable de inflamación intraocular y retiniana, y del edema de papila que conduce a pérdida sustancial de la agudeza visual.¹³³⁷ Golnick y cols. informaron de cuatro pacientes que presentaron pérdida de visión como resultado de una inflamación intraocular, tumefacción del nervio óptico y desprendimiento de retina.⁴⁸² Los pacientes tenían títulos elevados contra *B. henselae* y respondieron al tratamiento con mejorías resultantes en la visión. También se diagnosticó neurorretinitis en un paciente con pruebas serológicas de infección por *B. elizabethae*.⁹⁶⁰ En un caso inusual, se diagnosticó neurorretinitis bilateral acompañada por cefalea intensa y cambios conductuales en una mujer de 55 años con diabetes mellitus insulino dependiente e hipotiroidismo. El análisis mediante PCR del DNA extraído del líquido intraocular puso en evidencia la presencia de una secuencia genética de rRNA 16S que mostraba una homología del 100% con *B. grahamii*, una especie que se encuentra normalmente en roedores de Europa y América del Norte.⁶⁸⁰ La paciente, que era propietaria de un perro pero no tenía antecedentes de exposición a gatos, roedores u otros animales, también tenía pruebas serológicas de infección por *B. henselae* por EIA, que probablemente se debió a una reactividad cruzada con *B. grahamii*. La paciente respondió al tratamiento con doxiciclina y rifampicina oral diarias durante 4 semanas. También se han diagnosticado infecciones infraorbitarias y retinianas por *B. henselae* mediante la detección de DNA en muestras intraculares.^{482,1350}

Detección, aislamiento e identificación de especies de *Bartonella* TIPOS DE MUESTRAS

Las muestras que pueden ser remitidas para el aislamiento de especies de *Bartonella* incluyen sangre, biopsias de lesiones sospechosas de angiomasosis bacilar cutánea o sistémica, biopsias de ganglios linfáticos y material obtenido por aspiración. Las muestras recogidas al comienzo del cuadro clínico son preferibles, sobre todo las de biopsias de ganglios linfáticos de pacientes con sospecha de enfermedad por arañazo de gato. Es posible que los ganglios linfáticos supurados en estadio tardío no arrojen microorganismos debido a la intensa respuesta inmunitaria celular local.⁶⁰ Las muestras titulares deben ser homogeneizadas y sembradas en medios de cultivo. Se ha comunicado que los métodos de lisis-centrifugación aumentan la recuperación de estas bacterias con requerimientos nutricionales especiales de las muestras de sangre. También se puede remitir la sangre en tubos estériles con litio y

heparina. Con las muestras de sangre heparinizadas, el congelamiento de la sangre y luego su descongelamiento a temperatura ambiente antes de la siembra directa también puede aumentar el aislamiento. Como los microorganismos producen poco o ningún CO_2 durante el crecimiento, la detección de especies de *Bartonella* en sistemas de hemocultivo automáticos (p. ej., BACTEC; Bacti/Alert) puede ser problemática. Se ha aislado el microorganismo en frascos PLUS 26 de resina aerobia y alto volumen BACTEC, aunque los microorganismos no registraron índices de crecimiento por encima del umbral positivo.⁸⁰² Por lo tanto, se ha recomendado la tinción de los extendidos preparados de los frascos inoculados con la tinción fluorescente de naranja de acridina después de 8 días de incubación.^{349,748}

CULTIVO

Se pueden aislar especies de *Bartonella* sembrando en medios de agar apropiados o mediante el cocultivo en cultivo celular. Los métodos de cultivo celular se realizan con frascos para centrifugación que contienen una monocapa de células endoteliales humanas (p. ej., línea celular ECV 304) u otros tipos celulares (p. ej., células Vero, células HeLa, células L292).^{354,707,1049,1428} Las muestras procesadas con esta técnica han incluido biopsias de lesiones cutáneas y óseas de angiomatosis bacilar y sangre heparinizada. Koehler y cols. utilizaron una línea de células endoteliales bovinas (células CPA, línea celular ATTC #207) para aislar tanto *B. henselae* como *B. quintana* de biopsias de tejidos triturados de lesiones de angiomatosis bacilar.⁷⁰⁷ Después de 9 a 36 días de incubación, los sobrenadantes turbios del cultivo fueron subcultivados en medios de agar para su crecimiento e identificación ulteriores. Drancourt y cols. utilizaron células ECV 304 (una línea de células endoteliales humanas continuas) para recuperar *B. quintana* de muestras de sangre de pacientes sin hogar que presentaban endocarditis.³⁵⁴ Con esta técnica, se pueden detectar los microorganismos en el frasco con cubierta mediante inmunofluorescencia y se los puede identificar por PCR u otras técnicas moleculares. También se ha realizado una recuperación con enriquecimiento en caldo de especies de *Bartonella* con un medio definido que contiene RPMI 1640 (un medio líquido tipo cultivo tisular) suplementado con hemina, aminoácidos y piruvato.¹³⁸⁸ Este medio fue utilizado para recuperar con éxito *B. henselae* de sangre humana y de gatos y de las biopsias de ganglios linfáticos de pacientes con enfermedad por arañazo de gato.

Los métodos de cultivo basados sobre agar incluyen el cultivo en agar infusión de corazón que contiene sangre de caballo o de conejo al 5%. Los agares BHI suplementados con sangre, tripticasa de soja y Columbia y el agar chocolate enriquecido también pueden favorecer el crecimiento. Los medios recién preparados son esenciales para un desarrollo óptimo. No existen medios selectivos y no se deben utilizar medios que contienen antibióticos. Las placas inoculadas se incuban en una atmósfera húmeda a 35 °C a 37 °C como mínimo durante 21 días, aunque algunas cepas de *Bartonella* pueden requerir hasta 45 días antes de que se aprecie la proliferación.⁷⁵⁵ Los subcultivos obtenidos de cultivos primarios de crecimiento lento pueden requerir 15 a 20 días antes de obtener un buen aislamiento. La mayoría de las bartonelas no crecen en condiciones anaerobias, a temperaturas de 25 °C o 42 °C o en ausencia de hemina y CO_2 . *B. bacilliformis* es excepcional, ya que esta especie se desarrolla mejor con temperaturas más bajas (25-28 °C) y no requiere suplemento de CO_2 para el aislamiento.

TINCIÓN DE GRAM Y MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS

En aislamiento primario, las especies de *Bartonella* aparecen inicialmente como pequeñas colonias adherentes blancas que varían en tamaño y forma. Algunas cepas de *B. henselae*, *B. quintana* y *B. elizabethae* pueden deprimir la superficie de agar durante su crecimiento. En forma característica, las colonias de *B. henselae* son blancas, secas, adherentes, "similares a una coliflor", están introducidas en el agar y son morfológicamente heterogéneas. Con múltiples pasajes, las colonias se tornan menos secas, menos adherentes, más grandes y tienden a proliferar más rápido. Las colonias de *B. elizabethae* se asemejan a *B. henselae* excepto en que se puede observar una hemólisis débil o parcial alrededor de las colonias que crecen en agar infusión de corazón con sangre de conejo al 5%.²⁹⁹ Las colonias de *B. bacilliformis* difieren de las otras especies en que son inicialmente pequeñas, lisas y translúcidas y se mantienen así en un subcultivo seriado. En la tinción de Gram, los microorganismos *Bartonella* aparecen como pequeños bacilos gramnegativos pleomorfos y ligeramente curvos que miden aproximadamente 1-2,5 por 0,5-0,6 μm y muestran una motilidad con "contracciones" cuando se realiza un montaje en solución salina.

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

En general, las especies de *Bartonella* son bioquímicamente inertes y no reactivas en las pruebas de identificación de rutina, entre ellas, las pruebas de oxidasa, catalasa, indol, ureasa, descarboxilasa y reducción de nitrato. Existen varios métodos presuntivos y definitivos para la identificación de especies de *Bartonella*, entre ellos, métodos fenotípicos, métodos quimiotaxonómicos que utilizan análisis de ácidos grasos y técnicas moleculares (p. ej., PCR, secuenciación de ácidos nucleicos). Se han evaluado anticuerpos monoclonales específicos de especies para la identificación rápida de *B. quintana*.⁷⁷⁶

La identificación presuntiva de especies de *Bartonella*, como *B. henselae*, *B. quintana* y *B. vinsonii*, puede determinarse con sistemas de identificación comerciales que utilizan sustratos enzimáticos cromogénicos para detectar enzimas bacterianas preformadas (p. ej., Microscan Rapid Anaerobe Panel, tarjeta de identificación para *Neisseria-Haemophilus* Vitek, panel IDS RapID ANA II, panel API AnIDENT, panel Microscan HNID).¹³⁶⁰ Estos sistemas produjeron patrones singulares de reacciones bioquímicas dentro de sus propias bases de datos, pero sólo las reacciones en el Microscan Rapid Anaerobe Panel pudieron diferenciar las especies *B. henselae* y *B. quintana*. Este panel distinguió todas las especies evaluadas y generó códigos de biotipos singulares para cada una (cuadro 9-14).

Las especies de *Bartonella* pueden identificarse mediante análisis de cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares (véase cuadro 9-14).¹³⁶¹ Todas las especies de *Bartonella* contienen más de 50% de isoácidos $\text{C}_{18:1}$, 16-25% de $\text{C}_{18:0}$ y 16-22% de $\text{C}_{16:0}$ con cantidades menores de ácidos grasos $\text{C}_{13:1}$ y $\text{C}_{17:0}$. Las cepas de *B. henselae* carecen de ácidos grasos $\text{C}_{15:0}$ y $\text{C}_{12:0}$, que están presentes en cepas de *B. vinsonii* y *B. bacilliformis*, respectivamente. *B. quintana* pudo ser diferenciada de la mayoría de las cepas de *B. henselae* por la presencia de menos del 20% de $\text{C}_{18:0}$ en *B. quintana* y más del 20% de $\text{C}_{18:0}$ en *B. henselae*. La composición de los ácidos grasos celulares de *B. elizabethae* es muy similar a la de *B. vinsonii* e incluye $\text{C}_{15:0}$ (no hallado en *B. henselae* o *B. quintana*) y cantidades más grandes (21%) de $\text{C}_{17:0}$ que *B. henselae* (3%), *B. quintana* (1%) y *B. vinsonii* (9%). *B. elizabethae* también contiene cantidades más pequeñas del ácido graso celular $\text{C}_{16:0}$ (13%) que la otra

Cuadro 9-14 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Bartonella*

CARACTERÍSTICA	<i>B.</i> <i>BACILLIFORMIS</i>	<i>B.</i> <i>QUINTANA</i>	<i>B.</i> <i>HENSELAE</i>	<i>B.</i> <i>ELIZABETHAE</i>	<i>B.</i> <i>CLARIDGEIAE</i>	<i>B.</i> <i>GRAHAMII</i>	<i>B. VINSONII</i> SUBESPECIE <i>VINSONII</i>	<i>B. VINSONII</i> SUBESPECIE <i>BERKHOFFII</i>	<i>B. VINSONII</i> SUBESPECIE <i>ARUPENSIS</i>
Temperatura óptima de crecimiento	25-30 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C	35-37 °C
Hemólisis	—	—	—	+ ^u	—	—	—	—	—
Oxidasa	—	v	—	—	—	—	v	—	—
Catalasa	+	v	—	—	—	—	v	v	—
Reducción de nitrato	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ureasa	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetoína	—	—	—	—	—	+	—	ND	ND
Glucosa O/F ^a	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Flagelos	+	—	—	—	+	—	—	—	—
Motilidad en contracciones	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Principales ácidos grasos celulares	C _{18:1ω7C} , C _{16:0} , C _{16:1ω7C} , C _{12:0}	C _{18:1ω7C} , C _{16:0} , C _{18:0}	C _{18:1ω7C} , C _{18:0} , C _{16:0}	C _{18:1ω7C} , C _{17:0} , C _{16:0}	C _{18:1ω7C} , C _{16:0} , C _{18:0}	ND	C _{18:1ω7C} , C _{18:0} , C _{17:0} , C _{16:0} , C _{15:0}	C _{18:1ω7C} , C _{18:0} , C _{16:0} , C _{15:0}	C _{18:1ω7C} , C _{16:0} , C _{17:0} , C _{18:0}
<i>Bis-p</i> -nitrofenil-fosfato	+	v	+	+	ND	ND	+	+	+
L-arginina-β-naftilamidasa	+	+	+	+	+	ND	+	+	+
Glicina-β-naftilamidasa	+	+	+	+	+	ND	+	+	+
Glicilglicina-β-naftilamidasa	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+
L-leucina-β-naftilamidasa	+	+	+	+	ND	+	+	+	+
L-licina-β-naftilamidasa (ácida)	+	—	+	+ ^u	ND	ND	—	+	—
L-licina-β-naftilamidasa (básica)	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+
DL-metionina-β-naftilamidasa	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+ ^u
L-prolina-β-naftilamidasa	—	+	+	—	+	v	v	+	—
L-pirrolidonil-β-naftilamidasa	—	—	—	—	ND	—	—	—	—
L-triptófano-β-naftilamidasa	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+

^aOxidación/fermentación de glucosa.+/: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable; +^u: reacción positiva débil; ND: datos no disponibles.

especie, que contiene desde 17% hasta 20% de ácidos grasos celulares C_{16:0}.²⁹⁹

La identificación definitiva de las especies de *Bartonella* se logra mejor mediante los métodos moleculares de amplificación. Se ha utilizado con éxito para este objetivo la amplificación mediante PCR de distintos genes (p. ej., citrato sintasa, proteínas de choque térmico, genes de síntesis de riboflavina, genes de la división celular) o el análisis de las regiones espaciadoras intergénicas de rRNA 16S-23S y el análisis de las endonucleasas de restricción de los amplicones.^{69,641,823,1431} Matar y cols. utilizaron PCR junto con cebadores en los genes de rRNA 16S y 23S para amplificar la región espaciadora entre el gen de rRNA 16S y una parte del gen de rRNA 23S, seguido por escisión de las enzimas de restricción *AluI* y *HaeIII*.⁸³⁰ Este enfoque condujo a perfiles de restricción característicos para *B. bacilliformis*, *B. vinsonii* y *B. quintana*, y dos perfiles para *B. henselae*, lo que sugiere que puede ser un método útil tanto para la identificación de especies de *Bartonella* como para la subtipificación de cepas de *B. henselae*. La amplificación de parte del gen de citrato sintasa (*glbA*) seguida de la digestión y el análisis de enzimas de restricción se ha utilizado para identificar tanto especies de *Bartonella* como de *Rickettsia* pertenecientes a los grupos del tifus y la fiebre manchada.^{641,946,1057} Utilizando este método, Joblet y cols. observaron que la amplificación del gen *glbA* seguida de la digestión con enzimas de restricción *TaqI* y *AciI* permitía la diferenciación de las distintas especies de *Bartonella*.⁶⁴¹ Birtles y Raoult determinaron la secuencia de un fragmento de 940 pares de bases del gen que codifica la citrato sintasa (*glbA*) y observaron que estas secuencias también eran útiles para construir árboles filogenéticos para determinar las relaciones entre especies de *Bartonella* descritas en forma válida y cepas de *Bartonella* no caracterizadas.³⁷ Se han delineado análisis filogenéticos similares por análisis de secuencia del gen de la proteína de choque térmico de 60 kDa, *groEL*.⁸²³ También se designaron oligonucleótidos cebadores sobre la base de diferencias localizadas en la secuencia dentro de la región de DNA *ribC* (genes de síntesis de riboflavina). Luego se utilizaron estas secuencias para desarrollar ensayos de PCR específicos de especies para la identificación de *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae*.¹¹² Jensen y cols. crearon un método de identificación que utilizaba PCR para amplificar la región espaciadora intergénica de rRNA 16S-23S.⁶³⁷ Este procedimiento condujo a productos de tamaño singular para cada especie de *Bartonella*, lo que permitió la diferenciación de las especies sin necesidad del análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o la secuenciación de amplicones. Rodríguez-Barradas y cols. idearon un método similar de identificación mediante PCR de "elementos repetitivos" utilizando cebadores derivados de secuencias de consenso extragénicas o intergénicas repetitivas.¹⁰⁸⁰ Como estas secuencias ya existen en múltiples copias discontinuas que conducían a múltiples amplicones discontinuos luego de la amplificación, el tratamiento posterior con endonucleasas de restricción antes de PAGE no fue necesario. Utilizando DNA extraído de microorganismos cultivados, este método pudo identificar diferentes especies de *Bartonella* y también pudo utilizarse para la subtipificación de cepas de *B. henselae*.¹⁰⁸⁰ Handley y Regnery, en los CDC, comunicaron un método de identificación dependiente de la PCR basado sobre la amplificación de segmentos escindidos con endonucleasas de restricción.⁵³⁵ Las enzimas utilizadas en este procedimiento condujeron a fragmentos grandes que pudieron ser templados con cebadores correspondientes a secuencias de bases adyacentes a los sitios de restric-

ción de las endonucleasas para la PCR y la resolución posterior mediante PAGE. También se describieron varios métodos de identificación mediante PCR que explotan variaciones de las secuencias de base específicas de especie en el operón rDNA 16S.^{135,302,837,956,1065,1124}

Además de la confirmación mediante cultivo, se han desarrollado enfoques moleculares para la detección directa de especies de *Bartonella* en muestras clínicas. Matar y cols. informaron de un método de PCR-RFLP para la detección e identificación simultáneas de bartonelas directamente de muestras clínicas, que incluían biopsias y material de aspiración de ganglios linfáticos, piel, nódulos subcutáneos y otros tejidos.⁸²⁹ Este método involucró el uso de cebadores de PCR de regiones conservadas del gen de rDNA 16S, seguidas de la digestión con endonucleasas de restricción *DdeI* y *MseI* y el análisis de los amplicones. Sander y Penno utilizaron PCR para generar amplicones biotinilados de la región del gen de rRNA 16S e inmovilizaron los amplicones en celdas de microtítulos revestidas con estreptavidina. La hibridación de los amplicones con sondas de oligonucleótidos de rDNA 16S marcadas con digoxigenina específica de especie y el agregado ulterior de peroxidasa antidigoxigenina en un formato de EIA modificado proporcionó la rápida identificación tanto de *B. henselae* como de *B. quintana*.¹¹²⁴ Este método pudo detectar y cuantificar ambas especies directamente en muestras clínicas en concentraciones de tan solo 10³ UFC/mL. Avidor y cols., evaluaron la amplificación de genes de rRNA 16S mediada por PCR seguida de la hibridación con sonda de *B. henselae* con la amplificación basada sobre PCR de *glbA* (citrato sintasa) o *htrA* (genes de las proteínas de choque térmico) y del análisis de RFLP de amplicones para la detección directa de *B. henselae* en muestras clínicas.⁶⁹ Se detectó DNA de *B. henselae* en el 100% de 32 muestras de pus y ganglio linfático por el método de identificación de PCR de rRNA 16S/sonda y en el 94% y 69% por los métodos de *glbA*/RFLP y *htrA*/RFLP, respectivamente. Estos investigadores sugirieron que las pruebas directas por *glbA*/RFLP eran preferibles y más fáciles, ya que no era necesaria la hibridación especie-especie (a través de la sonda) con este método.⁶⁹

Diagnóstico serológico de las infecciones por *Bartonella*

Como es difícil aislar las especies de *Bartonella* en cultivo, se han utilizado métodos serológicos para documentar infección por estos microorganismos. Regnery y cols. desarrollaron en los CDC un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para *B. henselae* y observaron que el 88% de los pacientes con enfermedad por arañazo de gato tenían títulos de anticuerpos anti-*B. henselae* de 64 o mayores.¹⁰⁵⁹ En 1995, Dalton y cols., también en los CDC, cultivaron simultáneamente *B. henselae*, *B. quintana* y *B. elizabethae* en monocapas de células Vero y utilizaron estos microorganismos para preparar portaobjetos para las pruebas de inmunofluorescencia.²⁹⁸ De 91 pacientes cuya enfermedad cubría una definición clínica estricta de enfermedad por arañazo de gato, el 95% tenía títulos de inmunofluorescencia de 64 o mayores contra *B. henselae* o *B. quintana*. Como *B. quintana* no había sido asociado con la enfermedad por arañazo de gato, se creyó que los títulos positivos contra *B. quintana* representaban reacciones cruzadas serológicas entre las dos especies. Sólo se observaron reacciones cruzadas entre *B. elizabethae* y las otras dos especies de *Bartonella* con muestras que tenían títulos extremadamente altos contra *B. henselae* o *B. quintana*. Los microorganismos *B. bacilliformis* cultivados simultáneamente con células Vero tam-

bién se utilizaron para desarrollar una prueba de inmunofluorescencia para el diagnóstico de bartonelosis en regiones endémicas de Sudamérica. Se observó que la prueba tenía una sensibilidad del 82% para detectar anticuerpos en sueros de fase aguda de 106 pacientes con bartonelosis positiva en portaobjetos (microorganismos observados en eritrocitos en el extendido fijo teñido con Giemsa), positiva por PCR o confirmada por cultivo.¹¹⁶ Sobre la base de la prevalencia puntual elevada del 45% observada antes del período de estudio y, durante su transcurso, la prueba de inmunofluorescencia tuvo un valor predictivo positivo del 89%.

Bergmans y otros autores en Holanda evaluaron la detección de IgM e IgG anti-*B. henselae* utilizando IFI y EIA como herramientas para el diagnóstico de enfermedad por arañazo de gato y observaron una variabilidad importante dependiente de la fuente de los antígenos bacterianos para la preparación de los portaobjetos con inmunofluorescencia.¹¹⁷ En este estudio, se examinaron los sueros de 21 pacientes con "posible enfermedad por arañazo de gato" (pacientes que cumplían sólo uno de cuatro criterios clínicos) y 22 con enfermedad "probable" (pacientes que cumplían dos de cuatro criterios clínicos). Cuando se utilizaron como antígeno para la prueba de inmunofluorescencia células de *B. henselae* cocultivadas en células Vero, la sensibilidad de la detección de IgG fue sólo del 31,8% para los sueros de pacientes con "enfermedad probable" y del 33,3% para los pacientes con "enfermedad posible". Cuando se utilizó *B. henselae* aislado en medios de agar como antígeno de inmunofluorescencia, las sensibilidades correspondientes del ensayo para los dos grupos de pacientes fueron del 40,9% y el 14,3%, respectivamente. También se observaron sensibilidades de menos del 50% para las determinaciones de IgM que se realizan por inmunofluorescencia en ambos grupos de pacientes, independientemente de que se utilicen como antígenos microorganismos *B. henselae* aislados en agar o cocultivados. Se evaluaron las especificidades de los ensayos de IgG e IgM utilizando sueros de donantes de sangre sanos y variaron entre el 95% y el 100%. Estos investigadores arribaron a la conclusión de que se necesitan otros estudios antes de poder utilizar confiablemente inmunofluorescencia como método para el serodiagnóstico de enfermedad por arañazo de gato. En su comunicación de endocarditis por *B. quintana* en tres hombres sin fumar, Drancourt y cols. observaron que los tres tuvieron títulos altos de IgG contra *B. quintana* por una técnica de inmunofluorescencia.³⁵⁴ Los títulos fueron más altos cuando las células de *B. quintana* utilizadas para el procedimiento eran cocultivadas en la línea de células endoteliales ECV (títulos de 6 400-12 800) que cuando provinieron de cultivos que crecieron en agar sangre de carnero al 5% (títulos de 400-800).

Se dispone de diversos portaobjetos comerciales para inmunofluorescencia preparados con *B. henselae* derivados de agar sangre o asociados con células. Zbinden y cols. estudiaron dos sistemas comerciales de IFI que utilizan microorganismos derivados de agar sangre (MRL-BA, MRL Diagnostics, Cypress, CA; Virion Institut, Virion, Suiza) y microorganismos asociados con células (portaobjetos MRL Vero/ *Bartonella* IgG Substrate, MRL Diagnostics; portaobjetos para *B. henselae* Bion, Bios, Alemania).¹⁴²⁹ Estos portaobjetos comerciales fueron comparados con la inmunofluorescencia del laboratorio que utilizaba *B. henselae* cocultivada con células Vero como antígeno. En general, los sistemas que utilizaron antígeno de *B. henselae* aislado en agar mostraron títulos más altos (menos especificidad) que los que utilizaron microorganismos asociados con células. Se comparó luego el sistema *B. henselae* MRL-Vero aislado con el sistema del laboratorio. Utilizando

un título de corte de 256 y sueros de 26 pacientes con enfermedad por arañazo de gato y 240 controles, el sistema MRL-Vero IFA mostró una sensibilidad del 84,5% y una especificidad del 93,4%.¹⁴²⁹ Se observaron resultados similares en una segunda evaluación de la prueba MRL IFA.⁸³⁶

También se ha evaluado EIA como método serológico para el diagnóstico de enfermedad por arañazo de gato. Barka y cols., en Speciality Laboratories (Santa Monica, CA), desarrollaron un EIA para la detección de IgG, IgM e IgA específicos utilizando células de *B. henselae* aisladas en agar como antígeno de fase sólida.⁹² De las muestras de suero de 40 casos confirmados de enfermedad del arañazo de gato (por historia clínica, cultivo o histopatología), 38 (95%) tenían concentraciones elevadas de anticuerpos contra *B. henselae*. Aunque ninguno de los 40 pacientes de este estudio tuvo IgM o IgA específicos contra *B. henselae* en ausencia de IgG, los autores afirmaron que habían observado IgM específica contra *B. henselae* como el único marcador en algunos pacientes y que ocurre seroconversión de IgG en presencia de IgM en un período de 2 a 3 semanas.⁹² No se observaron resultados positivos de EIA en ninguno de las 92 muestras de pacientes con títulos altos documentados de anticuerpos contra otros agentes, que incluyen *Afpia felis*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia rickettsii*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia pestis*, *Chlamydia trachomatis*, virus de la rubéola y citomegalovirus.

Varios factores influyen sobre la capacidad de las pruebas serológicas para proporcionar un diagnóstico de infecciones por *Bartonella* y no todos están claros en la actualidad. En los pacientes con infección por HIV y manifestaciones de infecciones por *Bartonella*, es posible que no se observe una respuesta importante de anticuerpos debido a la inmunosupresión relacionada con el HIV. La falta de una respuesta de anticuerpos también se ha observado en pacientes inmunocompetentes, como lo demuestra la ausencia de una respuesta de anticuerpos en un huésped con linfadenopatía crónica y hemocultivos positivos para *B. quintana*.¹⁰⁴⁹ La falta de detección de anticuerpos también puede deberse a la heterogeneidad antigénica de los propios microorganismos. Se han aislado cepas antigénicamente diferentes de *B. henselae* en pacientes con endocarditis y en gatos; estas cepas no sólo eran serológicamente distintos, también eran diferentes por los perfiles proteicos y las secuencias de rDNA 16S.^{118,353} Sander y cols. investigaron hace poco la antigenicidad de la flagelina (FlaA) de *B. clarridgeiae*, la única especie de *Bartonella* que tiene flagelos.¹¹²⁶ Se detectaron anticuerpos contra FlaA en el 3,9% de 724 muestras de suero de pacientes con enfermedad por arañazo de gato, linfadenopatía o ambas y en ninguna de 100 muestras de suero de controles sanos. Con el reconocimiento de *B. clarridgeiae* como posible agente de la enfermedad por arañazo de gato, la detección de anticuerpos contra FlaA puede ser útil para el diagnóstico de la enfermedad causada por esta especie. Utilizando la tecnología del DNA recombinante, se ha aislado una proteína de 17 kDa de *B. henselae* que es específicamente reactiva con sueros de pacientes con enfermedad por arañazo de gato y puede tener valor como reactivo serológico diagnóstico.³³ También se puede demostrar una respuesta inmunitaria celular proliferativa específica de *B. henselae* de pacientes con enfermedad por arañazo de gato que tienen antígenos de *B. henselae*.⁶⁰ Este ensayo puede ser útil para el diagnóstico de los casos en los cuales los resultados serológicos son ambiguos.

También se han observado reacciones cruzadas serológicas entre las especies de *Bartonella* y otros microorganismos, que incluyen *Coxiella burnetii* (el agente causal de la fiebre Q) y especies de *Chlamydia*.^{354,754,832} En los pacientes con endocar-

ditis por *B. quintana*, se observaron títulos mayores de 256 contra *C. pneumoniae* y títulos de 64 contra *C. psittaci* y *C. trachomatis*.³⁵⁴ Aunque la adsorción de muestras de suero con *C. pneumoniae* no redujo los títulos contra *B. quintana*, la adsorción de esta última negativizó satisfactoriamente la reactividad contra *C. pneumoniae*. En otro estudio, más del 50% de los pacientes con fiebre Q crónica tenían títulos importantes de anticuerpos contra *B. henselae*. Los estudios de adsorción cruzada e inmunoprecipitación (immunoblot) establecieron que la reactividad con *B. henselae* era el resultado de reacciones cruzadas con anticuerpos contra *C. burnetii*: la adsorción de suero con *C. burnetii* eliminó la reactividad con antígenos de *B. henselae*, mientras que la adsorción con *B. henselae* sólo eliminó la reactividad contra *B. henselae*.⁷⁵⁴ La adsorción de sueros con *C. pneumoniae* o *B. quintana* eliminó los anticuerpos contra *C. pneumoniae*, mientras que la adsorción con *C. pneumoniae* no cambió los títulos contra *B. quintana*.⁸³² En el caso de la endocarditis por *Bartonella*, los títulos específicos pueden ser altos y los títulos contra otros agentes son significativamente más bajos, lo que sugiere que no ocurren diagnósticos erróneos siempre que se busquen simultáneamente anticuerpos contra todos estos agentes. Como ya se mencionó, el suero con títulos altos contra *B. henselae* también puede reaccionar en forma cruzada con otras especies de *Bartonella*.

Se han realizado estudios de seroprevalencia para especies de *Bartonella* en varias poblaciones humanas. En un estudio llevado a cabo en Suecia, Holmberg y cols. examinaron 126 muestras de suero que habían sido remitidas para serología de *Bartonella* y 100 muestras de suero de donantes de sangre sanos (controles) utilizando un método de inmunofluorescencia (título positivo ≥ 64).⁵⁸⁷ Entre estas muestras, el 4% de los 100 controles y el 8,3% de las 126 muestras de pacientes fueron positivas. Entre las muestras de donantes, tres fueron positivas para anticuerpos contra *B. elizabethae* y una fue positiva tanto para *B. henselae* como para *B. elizabethae*. En el grupo de pacientes, 14 muestras provenientes de 9 pacientes fueron reactivas; tres pacientes mostraron aumentos de cuatro veces en el título en las muestras secuenciales. Estos tres pacientes tenían evidencia de enfermedad asociada con *Bartonella* (p. ej., linfadenopatía recurrente y supurada; lesiones viscerales que muestran inflamación granulomatosa crónica) y antecedentes de exposición a gatos y roedores. Todos los sueros también mostraron reacciones positivas débiles a la prueba de inmunofluorescencia para *Chlamydia pneumoniae*, lo cual puede reflejar la reactividad cruzada descrita antes. Noah y cols. realizaron pruebas de inmunofluorescencia para especies de *Bartonella* en sueros recogidos de 351 veterinarios que asistieron a una conferencia en Ohio.⁹⁴² Entre ellos, el 7,1% tenía un título positivo para *B. henselae* o *B. quintana*.

Existen diversos sistemas comerciales para el serodiagnóstico de la infección por *Bartonella* (véase antes). Algunas pruebas serológicas también pueden distinguir los anticuerpos dirigidos contra diferentes especies de *Bartonella* (*B. henselae* y *B. quintana*).^{1125,1184} Las pruebas séricas de inmunofluorescencia para las especies de *Bartonella* se encuentran disponibles en laboratorios comerciales, como Associated Regional University Pathologists (ARUP, Salt Lake City UT), Speciality Laboratories (Santa Monica, CA) y Microbiology Referent Laboratory (MRL Diagnostics).

Sensibilidad a los antibióticos in vitro

Utilizando el método de dilución en agar, Maurin y Raoult evaluaron la sensibilidad in vitro de *B. henselae*, *B. quintana* y

B. vinsonii a distintos antibióticos.⁸³⁵ Estos microorganismos eran sensibles a ampicilina, cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona), tetraciclinas (doxiciclina, minociclina), macrólidos, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos (gentamicina, amikacina). Las CIM para oxacilina, cefalotina, clindamicina, cloranfenicol y fluoroquinolonas (ciprofloxacina, perfloxacina, ofloxacina) estaban cerca de las concentraciones máximas de fármaco disponible en el suero. Un estudio ulterior del mismo grupo de investigación utilizó un procedimiento de dilución con agar de Columbia y suplemento de sangre para determinar la sensibilidad in vitro de nueve cepas de *B. quintana*, tres de *B. henselae* y cepas únicas de *B. elizabethae* y *B. bacilliformis*.⁸³³ Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% antes de su interpretación. Todas las cepas eran sensibles a los β -lactámicos (penicilina G, amoxicilina, ticarcilina, cefotetán, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem), macrólidos (eritromicina, azitromicina, claritromicina, roxitromicina), doxiciclina, aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina) y rifampicina. Las cepas parecían menos sensibles a las penicilinas semisintéticas (oxacilina), a las cefalosporinas de primera generación (cefalotina) y a la clindamicina. La sensibilidad de estas 14 cepas a las fluoroquinolonas (perfloxacina, ciprofloxacina y esparfloxacina) fue variable. Sobraques y cols. evaluaron cuatro cepas de *B. bacilliformis* utilizando un procedimiento de dilución en agar y observaron que todas eran ampliamente sensibles a los antibióticos, que incluían β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, rifampicina, macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas.¹¹⁹⁸

Otros estudios de sensibilidad in vitro sobre especies de *Bartonella* se han centrado en la capacidad de los antibióticos para inhibir la proliferación de los microorganismos en medios con cultivos celulares. Ives y cols. estudiaron la sensibilidad de las especies de *Bartonella* a varios antibióticos macrólidos utilizando un método de cocultivo en monocapa de células Vero.^{621,622} La inhibición del crecimiento de los microorganismos con diferentes concentraciones de antibióticos fue evaluada mediante el recuento visual de microorganismos según se determina por inmunofluorescencia específica en comparación con cultivos sin antibióticos después de 5 días de incubación. Utilizando este método, las cepas individuales de *B. henselae*, *B. quintana* y *B. elizabethae* eran sensibles a eritromicina, claritromicina, azitromicina, diritromicina y roxitromicina.^{621,622} Estos investigadores también señalaron que tanto la eritromicina como la doxiciclina se concentran en las células fagocíticas y alcanzan niveles intracelulares que exceden las concentraciones séricas habituales. Aunque es probable que la proliferación de los microorganismos fagocitados por los neutrófilos y macrófagos se inhibiera debido a las altas concentraciones del fármaco en estas células, las distintas especies o cepas de *Bartonella* pueden comportarse de modo diferente dentro de las células endoteliales u otros tipos de células. Kordick y cols. observaron que todas las cepas de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* aisladas en gatos bacteriémicos con infección natural y experimental eran sensibles a doxiciclina, enrofloxacin y ciprofloxacina.⁷¹⁸ Sin embargo, sólo un tratamiento fue exitoso (definido como tal por la falta de detección de bacteriemia por cultivo o por PCR) sólo en 9 de 14 gatos que recibieron enrofloxacin y en 2 de 8 gatos tratados con doxiciclina. Estos investigadores arribaron a la conclusión de que las pruebas convencionales de sensibilidad por dilución en agar de especies de *Bartonella* no proporcionan ninguna información clara sobre la eficacia terapéutica de los agentes, dado que existen muy pocos datos sobre los tropismos celulares de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en

gatos. Kordick y cols. propusieron que las células de los felinos infectadas por *Bartonella* pueden estar deterioradas funcionalmente hasta el grado en que los antibióticos no son captados o son acumulados lejos de los propios microorganismos.⁷¹⁸

También se han examinado las actividades bactericidas de estos agentes contra *B. henselae* con medio de Schaedler con suplemento de sangre, hemina y vitamina K y con técnicas de cultivo simultáneo utilizando una línea de células endoteliales humanas o una línea de macrófagos murinos.⁹¹⁷ Se demostró que amoxicilina, cefotaxima, ceftriaxona, doxiciclina, eritromicina, rifampicina y ciprofloxacina eran bacteriostáticas para las especies de *Bartonella*, pero sólo los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina) eran bactericidas.⁹¹⁷

Especies de *Afipia*

Taxonomía e importancia clínica

Los microorganismos asignados ulteriormente al género *Afipia* fueron aislados por primera vez en muestras obtenidas por punción y aspiración de ganglios linfáticos en pacientes con enfermedad por arañazo de gato utilizando un método de cultivo celular.³⁸⁰ Más tarde, Brenner y cols. propusieron que eran el agente causal probable de esa enfermedad y denominaron a la cepa tipo *Afipia felis*, por el Armed Forces Institute of Pathology, donde se aisló originariamente el microorganismo.¹⁶⁶ Se obtuvo un segundo microorganismo similar en una biopsia de tibia de un hombre de 69 años en la Cleveland Clinic y un tercero fue hallado en esputo, médula ósea y un absceso de la muñeca. Los dos últimos microorganismos aislados fueron asignados al género *Afipia* como *A. clevalandensis* y *A. broomeae*, respectivamente.¹⁶⁶ También se describieron en ese momento tres genoespecies de *Afipia* sin nombre: *Afipia* genoespecies 1, 2 y 3, aisladas en una muestra de líquido pleural humano, una muestra de lavado bronquial y agua, respectivamente.¹⁶⁶ Con el descubrimiento de *B. henselae* como agente primario de la enfermedad por arañazo de gato y el aislamiento de *A. felis* del suministro de agua de un hospital francés en 1999, en la actualidad se piensa que las especies de *Afipia* son bacterias con requerimientos nutricionales especiales asociadas con el agua capaces de tener existencia intracelular en amebas de vida libre.^{750,756} En 2002, se aislaron otras cepas denominadas *A. birgiae*, *A. massiliensis* y *Afipia felis* genoespecie A en el sistema de suministro de agua del Timone Hospital Centre en Marsella, Francia.⁷⁵² En este medio, estos microorganismos pueden desempeñar un papel en las infecciones hospitalarias, como lo indica su aislamiento en muestras de agua recogidas en las unidades de cuidados intensivos y la presencia de anticuerpos específicos en 11 de 85 pacientes internados en unidades de cuidados intensivos con neumonía hospitalaria.⁷⁵³ Las especies de *Afipia* se clasifican en el subgrupo α_2 de las Proteobacterias dentro de la familia *Bradyrhizobiaceae*.^{455,752,1376}

Aislamiento e identificación

Las especies de *Afipia* son bacilos gramnegativos, oxidasa positivos y débilmente catalasa positivos que son móviles porque tienen un único flagelo polar, subpolar o lateral. Crecen en agar carbón extracto de levadura (BCYE), en agar chocolate y agar sangre y en caldo con nutrientes, pero no en presencia de NaCl al 6,5% en caldo y pocas veces crecen en agar de MacConkey. Se obtiene un buen crecimiento después de la incubación a 25 °C a 30 °C durante 3-4 días, un crecimiento

escaso después de la incubación a 35 °C y ningún crecimiento a 42 °C. Después de 72 horas de crecimiento en agar sangre, las colonias de las especies de *Afipia* son blanco grisáceas, brillantes, no hemolíticas, convexas y opacas con un borde entero. Todas las especies y las genoespecies son oxidasa y ureasa positivas, y son negativas en las reacciones para hemólisis, producción de gas a partir de nitrato, producción de indol, producción de H₂S (método de agar triple azúcar-hierro [TSI]), hidrólisis de gelatina e hidrólisis de esculina. No se produce ácido de forma oxidativa ni fermentativa a partir de glucosa, lactosa, sacarosa o maltosa. En el cuadro 9-15 se muestran las características para la identificación de las especies de *Afipia*.

También se las puede identificar mediante el análisis de ácidos grasos de la pared celular. Los miembros del género contienen *cis*-octadeca-11-enoico (C_{18:1(7C)}), 11-metilooctadeca-12-enoico (C_{Br19:1}) y habitualmente 9,10-metilenehexadecanoato y 11,12-metileneoctadecanoato. La presencia de C_{Br19:1} como principal ácido graso de la pared celular es una característica clave de las especies de *Afipia*, porque este ácido graso se encuentra sólo en cantidades mínimas en algunas especies de *Pseudomonas* y *Brucella*.^{166,752}

Sensibilidad a los antibióticos

A. felis es resistente a ampicilina, cefazolina, cefamandol, cefoperazona, cefalotina, clindamicina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina.^{166,834} Se ha comunicado una sensibilidad intermedia a piperacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ticarcilina y vancomicina.^{166,834} *A. felis* es sensible a cefoxitina, cefotaxima, mezlocilina, aminoglucósidos, imipenem y rifampicina. Aunque *Afipia* genoespecie 3 tiene las CIM más bajas entre las especies, todas las otras especies mostraron CIM a la mayoría de los agentes, como cefalosporinas (de todas las generaciones), ampicilina, penicilinas de amplio espectro, combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de las β -lactamasas, tetraciclinas y aminoglucósidos. El imipenem mostró las CIM más bajas para todas las especies evaluadas.^{166,834}

Especies de *Bordetella*

Antecedentes y taxonomía de las especies de *Bordetella*

El género *Bordetella* contiene siete especies: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* y *B. trematum*.^{681,1015,1303,1304,1369} Algunos estudios genéticos han mostrado que estos microorganismos están muy estrechamente relacionados entre sí. De hecho, las técnicas de hibridación de DNA indican que pueden no ser lo suficientemente diferentes como para justificar la asignación de especies individuales, aunque existen entre ellos diferencias genéticas, fenotípicas e inmunológicas.⁶⁸² En el pasado, las bordetelas fueron clasificadas con otras especies de bacterias, que incluyen *Haemophilus*, *Brucella* y *Alcaligenes*. En la edición de 1984 del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, se incluyeron tanto especies de *Bordetella* como de *Brucella* entre los géneros de afiliación incierta.¹⁰¹⁵ Después de una hibridación de DNA-rRNA extensa y análisis fenotípicos. De Ley y cols. propusieron que la familia *Alcaligenaceae* abarcara especies de *Alcaligenes* y *Bordetella*.³¹⁴ La relación genética de las especies de *Bordetella* con el género *Alcaligenes* también es apoyada por el hallazgo de que *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* producen un sideróforo denominado **alcaligina** que es casi idéntico al producido por *Alcaligenes denitrificans*.⁸⁹¹ Los miembros del género *Bordetella* son cocobacilos gramnegati-

Cuadro 9-15 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Afipia*

CARACTERÍSTICA	<i>A. FELIS</i>	<i>A. FELIS</i> GENOESPECIE A	<i>A.</i> <i>CLEVELAN-</i> <i>DENSIS</i>	<i>A.</i> <i>BROOMEAE</i>	<i>A.</i> <i>BIRGIAE</i>	<i>A.</i> <i>MASSILIENSIS</i>	<i>AFIPIA</i> GENOESPECIE 1	<i>AFIPIA</i> GENOESPECIE 2	<i>AFIPIA</i> GENO- ESPECIE 3	RELACIONADAS CON <i>AFIPIA</i> GENOESPECIE 3
Hemólisis, SBA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
Motilidad	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar BCYE, 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar BCYE, 35 °C	+	+	+ ^d	+	—	—	+	+	+	—
Crecimiento en agar BCYE, 37 °C	+	+	—	+	—	—	+	+	+	—
Crecimiento en agar BCYE, 42 °C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reducción de nitrato	+	+	—	—	+	+	—	—	—	+
Citrato	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginina dihidrolasa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hidrólisis de ONPG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Producción de H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Producción de ácido a partir de:										—
Glucosa	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
Maltosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fructosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacarosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Manitol	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
Manosa	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
Arabinosa	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
N-acetil-glucosamina	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—

+: reacción positiva; —: reacción negativa; +^d: reacción positiva débil.

son pequeños en aislamiento primario. En subcultivo, tienden a volverse más pleomorfos. Son aerobios estrictos, crecen en condiciones óptimas a 35 °C a 37 °C, no utilizan hidratos de carbono y son inactivos en la mayoría de las pruebas bioquímicas. *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* son inmóviles, mientras que *B. bronchiseptica*, *B. avium* y *B. hinzii* son móviles y su desplazamiento se logra por medio de flagelos peritricos. Estos microorganismos no requieren hemina ni NAD. Sin embargo, el aislamiento primario de *B. pertussis*, en particular, requiere el agregado de carbón, resinas de intercambio iónico o sangre al 15-20% para neutralizar los efectos inhibidores del crecimiento de sustancias como ácidos grasos insaturados, sulfuros, peróxidos y metales pesados.⁶⁰² *B. parapertussis* es algo menos exigente en sus requerimientos de crecimiento, pero el aislamiento necesita aún el uso de los mismos medios especiales utilizados para *B. pertussis*. Las especies restantes tienen menos requerimientos nutricionales especiales y crecen en los medios de agar habituales, como agar sangre, agar chocolate y agar de MacConkey. Los análisis de secuencia del rRNA 16S de las especies de *Bordetella* descritas han confirmado la filogenia común con el género *Alcaligenes* y el género *Bordetella* reside ahora en la subdivisión β_2 de las proteobacterias en la familia *Alcaligenaceae* junto con los géneros *Achromobacter*, *Pelistega*, *Sutterella* y *Taylorella*.⁴⁵⁵

El género *Bordetella* incluye especies aisladas de seres humanos y otros animales. El hombre constituye el único huésped reconocido de *B. pertussis* y también se creía que *B. parapertussis* se encontraba sólo en los seres humanos. Sin embargo, en 1994 se recuperó en Escocia y Nueva Zelanda una cepa similar a *B. parapertussis* del aparato respiratorio de corderos sanos y corderos con neumonía.¹⁰²⁰ *B. parapertussis* puede causar una enfermedad similar a la tos ferina en seres humanos. *B. bronchiseptica* se encuentra en distintos animales (p. ej., primates, perros, gatos, conejos, caballos, pavos, cerdos, zorros, zarigüeyas) y, en ocasiones, en seres humanos, fundamentalmente como agente oportunista. Como su nombre lo sugiere, *B. avium* se encuentra en aves y produce rinitis y rinitis en pavos.⁶⁸¹ *B. hinzii* fue denominado antes "bacteria similar a *B. avium*", bacteria de la coriza del pavo tipo II, *Alcaligenes faecalis* tipo II y especie de *Alcaligenes* cepa C2T2; este microorganismo fue asignado formalmente al género *Bordetella* en 1995.¹³⁰⁴ *B. holmesii* era llamado antes grupo no oxidante 2 de los CDC (NO-2). La caracterización de estas cepas mediante hibridación de DNA-DNA, secuenciación de rRNA 16S y análisis de ácidos grasos celulares/ubiquinona estableció su relación con el género *Bordetella*.¹³⁶⁹ Desde 1995, se describió a *Bordetella gregatum* como una especie nueva que se encuentra en heridas e infecciones óticas humanas, y se han aislado las nuevas cepas "similares a *Bordetella holmesii*" de pacientes con bacteriemia, endocarditis e infecciones respiratorias.^{1257,1303,1418}

Epidemiología de la tos ferina

La tos ferina sigue siendo una enfermedad endémica de importancia mundial a la cual se le atribuyen más de 350 000 muertes por año. Los seres humanos son el único huésped conocido de *B. pertussis* y la transmisión ocurre por contacto directo con microgotas en suspensión provenientes de individuos infectados que tosen. La tasa de ataque es muy alta y más del 90% de los individuos sensibles se infectan después de exposiciones importantes.¹⁴¹ Por razones desconocidas, la enfermedad entre los niños ocurre más a menudo en las mujeres y tiende a seguir en ciclos epidémicos de 3 a 5 años. Antes

de la disponibilidad de vacuna de células enteras muertas, la mayoría de los casos de tos ferina ocurrían entre los niños de 1 a 5 años. Después de 1947, cuando se autorizó la vacuna contra difteria-tos ferina-tétanos (DPT) que fue recomendada por la American Academy of Pediatrics, la incidencia más alta de la enfermedad se desplazó a los niños menores de 1 año. En los Estados Unidos a comienzos de la década de 1990, entre el 40% y el 50% de los casos de tos ferina comunicados ocurría en niños que tenían menos de 1 año de edad.^{207,208} Se han informado tasas de incidencia similares en otros países que han mantenido protocolos de vacunación. Por ejemplo, durante el período de 15 meses desde julio de 1993 hasta octubre de 1994, el 65% de los casos índices de tos ferina en un centro médico francés ocurrieron en niños menores de 1 año.⁹³ Actualmente, aquellos con riesgo máximo de sufrir tos ferina son los lactantes de 6 meses de edad y menores que no han recibido la serie completa de vacunación de tres dosis y los niños de edad preescolar que no han recibido todas las vacunaciones. La máxima cantidad de mortalidad relacionada con la tos ferina también ocurre fundamentalmente entre los lactantes; los datos de vigilancia recogidos desde 1992 hasta 1993 mostraron que los lactantes de menos de 1 año representaban el 42% de los casos y el 87% de las muertes comunicadas.^{141,208} En los países donde la vacunación no es una práctica común, el grupo de 1 a 5 años de edad sigue estando en máximo riesgo.

En 1993, se comunicaron más de 6 300 casos de tos ferina a los CDC, lo que representa un incremento del 82% sobre los casos del año anterior y la máxima incidencia de enfermedad desde 1967.⁹⁸ El factor principal que contribuye al resurgimiento en la tos ferina es el crecimiento de una población grande de adultos sensibles; este resurgimiento se refleja en la cantidad creciente de casos de tos ferina que ocurren en pacientes mayores de 10 años.⁹⁸ Debido a la presentación atípica de la tos ferina en los individuos mayores, la enfermedad a menudo no es reconocida y el tratamiento no se administra, se retarda o es incompleto. Sin embargo, estos individuos infectados constituyen una fuente importante para la transmisión de *B. pertussis* a otros, sobre todo a los lactantes y los niños pequeños que no están inmunizados en forma adecuada.

Importancia clínica de *Bordetella pertussis*

B. pertussis produce el síndrome denominado tos quintosa o "tos ferina". El microorganismo se transmite a través de microgotas infectantes y es sumamente contagioso, con una tasa de ataque mayor del 90% en las personas no inmunizadas. La inmunización parcial de los niños contra la tos ferina puede alterar la presentación clínica clásica. Además, la presentación y el diagnóstico de tos ferina en los niños pequeños (menores de 1 año) puede verse complicada por las infecciones virales simultáneas del aparato respiratorio, como virus influenza y sincicial respiratorio, en particular.⁹⁰⁰ Clásicamente, la tos ferina clínica en los niños no vacunados puede dividirse en tres estadios. El **estadio prodrómico o catarral** comienza 5 a 10 días después de la adquisición del microorganismo y se caracteriza por síntomas inespecíficos de "resfriado" o "gripe". La enfermedad es altamente transmisible en este estadio, ya que hay gran cantidad de microorganismos en las vías respiratorias altas. Los cultivos recogidos en este momento tienen la máxima probabilidad de ser positivos. Una tos aparece más tarde en este estadio y aumenta en persistencia, gravedad y frecuencia. Esto evoluciona al **estadio paroxístico o espasmódico** después de 7 a 14 días.²³⁶ Este estadio se caracteriza por la "tos en staccato" con el "silbido" inspiratorio prolongado que se escucha

al final de la crisis de tos. Durante este estadio, no hay fiebre ni otros signos ni síntomas sistémicos. Los esfuerzos inspiratorios son inútiles durante el paroxismo de tos y el "silbido" es causado por la inspiración de aire a través de la glotis tumefacta y estrechada. La crisis de tos se asocia a menudo con cianosis y vómitos. Este estadio puede ser tan grave que es necesaria la asistencia ventilatoria intermitente. Las complicaciones que pueden ocurrir durante el curso de la enfermedad son infecciones bacterianas secundarias; otitis media; síntomas del SNC, como convulsiones y fiebre alta, sobre todo con la presencia de infecciones secundarias interpuestas; encefalopatía; ataxia cerebelosa, hernia inguinal y prolapso rectal asociados con la tos intensa.^{447,1160} La causa de la encefalopatía asociada con la tos ferina complicada no se conoce debido a la falta de un modelo animal apropiado, pero los mecanismos sugeridos incluyen la anoxia secundaria a los paroxismos de tos, hipoglucemia secundaria a los efectos tóxicos de la toxina pertussis (PT) y hemorragia intracerebral. El **estadio de convalecencia** comienza por lo general dentro de las 4 semanas del inicio y, durante este período, existe una disminución de la frecuencia y la gravedad de las crisis de tos. (Véase recuadro 9-11.)

La tos ferina atípica observada en los adultos se atribuye al hecho de que la mayoría fueron inmunizados cuando eran niños y que la memoria inmunitaria decreciente conduce a una enfermedad menos grave y modificada.¹⁴⁰¹ Como ya se mencionó, los adultos que tienen tos ferina sintomática pero no reconocida a menudo constituyen la fuente de contagio del microorganismo a los casos pediátricos.^{134,236,972} Algunos estudios de tos ferina en adultos se han focalizado en individuos con tos persistente y han utilizado métodos de cultivo, moleculares o serológicos, para demostrar la presencia de los microorganismos o aumentos importantes en los títulos contra antígenos singulares de *B. pertussis*, respectivamente. En un estudio de 130 estudiantes universitarios que se comunicaron al servicio de salud para estudiantes con una tos de 6 días de duración o mayor, el 26% tenía evidencia serológica de infección reciente por *B. pertussis*.⁸⁷¹ En un estudio posterior con esta población de estudiantes se observó que el 15% de 319 estudiantes con tos de una duración ≥ 5 días tenía evidencia serológica de infección por *B. pertussis*; 17 de estos estudiantes tenían también evidencia serológica de infecciones virales, por *Chlamydia pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* coexistentes.⁶²³ En un estudio llevado a cabo entre entrenados del Cuerpo de Marines de los Estados Unidos que comunicaron 7 días o más de tos, el 17% tenía infección aguda por *B. pertussis*.⁶³² En otro estudio, se evaluó anualmente a 51 trabajadores de asistencia de la salud durante un período de 5 años (1984-1989) para detectar elevaciones en los títulos de anticuerpos contra cuatro antígenos específicos de la tos ferina (PT, FHA, pertactina y fimbrias).³²⁷ De estos individuos, el 90% mostró una elevación importante en el título de anticuerpos contra uno o más de los antígenos entre dos años consecutivos durante el período de cinco años del estudio. En un estudio realizado con 246 adultos alemanes con una enfermedad con tos de más de 14 días de duración, se observaron pruebas de infección por *B. pertussis* en 64 (26%); 5 tenían cultivos nasofaríngeos positivos y 59 tuvieron un diagnóstico sobre la base de las pruebas serológicas, la PCR o ambas.¹¹⁴⁸ En un estudio danés efectuado en 201 pacientes con tos que persistió durante una media de 6.5 semanas se encontró que 4 (2%) tenían cultivos positivos para *B. pertussis* y 11 (5.5%) eran positivos por PCR (incluidos los 4 pacientes con cultivos positivos).¹³⁴ También se demostró evidencia serológica de infección por tos ferina en 100 adultos ≥ 65 años estudiados en un período de 3 años. Entre el 3.3% y

el 8% de esta población tuvieron infecciones por tos ferina y entre el 37.5% y el 50% estaban sintomáticos como resultado de la infección.⁵⁷⁸

Se describió el espectro clínico de la tos ferina en adultos en varios estudios. En un estudio llevado a cabo en UCLA, los dos diagnósticos clínicos principales que tuvieron los individuos en los que se descubrió tos ferina fueron infección inespecífica de las vías respiratorias altas (39%) y bronquitis (48%).⁸⁷¹ En un estudio efectuado en Alemania en 64 adultos con infección documentada por *B. pertussis*, desde el punto de vista clínico sólo se pensó que el 39% tenía tos ferina y que el 14% no la tenía; otros diagnósticos fueron infecciones de las vías respiratorias altas, nasofaringitis, faringitis, adenoiditis y sinusitis. Sin embargo, de los 64 pacientes, el 70% tenía tos paroxística; el 38%, silbido inspiratorio y en el 17% la tos era seguida por vómitos.¹¹⁴⁸ En otro estudio alemán de 84 adultos con tos ferina se observó tos persistente (> 21 días) en el 81%, tos espasmódica en el 65% y ahogos en el 56%.¹⁰²³ Dieciocho pacientes tuvieron complicaciones que incluyeron otitis media, neumonía, incontinencia urinaria, linfadenopatía cervical, pérdida auditiva aguda, fracturas costales y hernia inguinal. También se documentó una encefalopatía asociada con tos ferina en adultos con esta enfermedad.⁵³⁰ Si bien son infrecuentes, se describieron infecciones agudas por *B. pertussis* en adultos; en un caso, se diagnosticó tos ferina aguda en un hombre de 53 años que adquirió el microorganismo de su hijo, que había sido inmunizado y tenía tos ferina leve.¹¹⁹³

También se ha aislado *B. pertussis* de adultos con enfermedad subyacente como infección por HIV. Ng y cols. aislaron *B. pertussis* de las muestras de lavado broncoalveolar y biopsia transbronquial de tres pacientes con SIDA.^{936,937} Estos microorganismos crecieron en medios para aislamiento de *Legionella*. Doebbeling y cols. informaron el aislamiento de *B. pertussis* de las vías respiratorias altas de un paciente HIV positivo de 25 años con una historia de 4 meses de tos paroxística; también se comunicó un caso similar en un paciente de 60 años con SIDA en Bélgica.^{269,340} A pesar de estas comunicaciones, se cree que la tos ferina es relativamente rara en los pacientes infectados por el HIV y se estima una prevalencia de portación nasofaríngea de menos de 6.5 casos por 10 000 pacientes.²⁶⁶ En un caso muy atípico, se aisló *B. pertussis* en un hemocultivo de un hombre de 31 años con granulomatosis de Wegener, un trastorno asociado con neumonía crónica y el desarrollo de nódulos pulmonares y lesiones pulmonares cavitarias.⁶³⁰ También se lo halló en muestras respiratorias de lactantes con otros problemas subyacentes, como enterocolitis necrosante, enfermedad pulmonar crónica y neumonía por adenovirus.^{493,1161}

Vacunas contra la tos ferina

La vacuna original de células enteras contra la tos ferina fue administrada junto con los toxoides diftérico y tetánico y adyuvantes con aluminio (DwPT). Después de su autorización, el uso difundido de la vacuna de células enteras condujo a la declinación de la enfermedad en los países con inmunización obligatoria y otras pruebas de eficacia se acumularon como resultado de la atenuación de los programas de inmunización en algunos países. Por ejemplo, algunos años después de la introducción de preparados para la vacuna que utilizaban cantidades más pequeñas de antígeno se informó un aumento de la cantidad de casos de tos ferina en Dinamarca. Debido a que la aceptación popular de la inmunización en Gran Bretaña se redujo a partir de mediados de la década de 1970 la tos ferina alcanzó proporciones epidémicas entre los niños menores de 5

Recuadro 9-11 Factores de virulencia de *Bordetella pertussis***Toxina pertussis**

La toxina pertusis (PT) es un factor de virulencia importante de *B. pertussis*. PT es una proteína única de peso molecular 105-117 kDa que tiene un amplio espectro de productividad biológica y es producida sólo por *B. pertussis*. PT es sintetizada con una secuencia señal N-terminal que media la secreción de la toxina en el espacio periplasmático. En el periplasma, el péptido señal es extraído y las subunidades se pliegan y reúnen en la toxina completa.³⁹⁹ PT es un hexámero que consiste en una porción tóxica enzimática (protómero A) y una porción heteropentamérica atóxica (oligómero B). El oligómero B es responsable de unir la toxina a las células sensibles y de transportar el protómero A a través de la membrana de las células eucariontes.²⁸⁹ La subunidad B está compuesta por dos dímeros –los polipéptidos S2 y S4 y los polipéptidos S3 y S4– reunidos por otro polipéptido denominado S5. PT también funciona como adhesina en su capacidad para unirse a las células ciliadas y a los macrófagos. La subunidad A contiene un único polipéptido, designado S1, que tiene actividad de adenosindifosfato ribosiltransferasa.⁶⁷⁰ Esta enzima transfiere grupos ADP ribosa del NAD a las proteínas reguladoras Gi (inhibidoras) que normalmente funcionan en la transducción de señales celulares. Se cree que la actividad de PT es responsable de muchos de los signos y los síntomas clínicos de la tos ferina, aunque no ha sido demostrado inequívocamente, y no existen datos relativos a la diana o dianas afectadas por PT en el tejido. Los efectos biológicos de PT incluyen la sensibilización de ratones a la histamina, la producción de linfocitosis, la activación de células de los islotes pancreáticos y la estimulación de las respuestas inmunitarias.^{564,565} Los anticuerpos dirigidos contra PT son protectores para los ratones cuando son sometidos a inoculación intracerebral o del aparato respiratorio. Los genes para los péptidos de PT están dispuestos como un operón. Este operón está presente en *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, pero los genes no son transcritos ni traducidos en las últimas dos especies.^{50,1216} Los anticuerpos dirigidos contra PT también son protectores en modelos animales de tos ferina. PT es la única molécula que está representada en todas las vacunas acelulares contra la tos ferina formuladas hasta ahora.

Hemaglutinina filamentosa

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una adhesina de la superficie celular de peso molecular 220 kDa que tiene actividad hemaglutinante y, junto con PT, media la adhesión de *B. pertussis* a las células eucariontes in vitro y a las células ciliadas de las vías respiratorias altas.^{1064,1306} FHA tiene múltiples actividades fijadoras que permiten a *B. pertussis* adherirse a diferentes tipos celulares y en algunos casos a invadirlos, incluidos los macrófagos, en diferentes estadios de infección y junto con otras adhesinas.⁸⁸⁹ La fijación de FHA a los macrófagos conduce a fagocitosis de los microorganismos sin el estallido oxidativo asociado con la fagocitosis de otros microorganismos. Esta circunstancia inusual puede ser fundamental para la supervivencia intracelular de *B. pertussis*. Los anticuerpos contra FHA proporcionan cierta inmunidad contra la exposición respiratoria pero no intracerebral en animales, presumiblemente al inhibir la fijación de los microorganismos.

Pertactina

La pertactina describe varias proteínas de la membrana celular asociadas con la superficie halladas en tres especies de *Bordetella*. La pertactina P.69 de *B. pertussis* tiene un peso molecular de 69 kDa, y proteínas homólogas de pesos moleculares ligeramente diferentes se encuentran en *B. parapertussis* (pertactina P.70) y en *B. bronchiseptica* (pertactina P.68). Las pertactinas son modificadas y producidas como proteínas ligeramente más grandes que son escindidas proteolíticamente para arrojar las moléculas maduras. La pertactina de *B. pertussis* fue denominada originariamente P69 o proteína 69K. Se ha determinado que el verdadero peso molecular es de alrededor de 60.5 kDa después de que se encontró que la pertactina derivaba del procesamiento postraduccional de una proteína precursora más grande. La pertactina de *B. pertussis* funciona junto con FHA para mediar la fijación de la bacteria a las células de cultivo in vitro ayudando a la molécula de FHA a lograr una conformación que aumenta al máximo la fijación de la célula bacteriana.⁴⁹ Los anticuerpos contra la pertactina P.69 protegen a los ratones contra la infección por *B. pertussis* administrada por la vía del aerosol, pero la protección contra la carga intracerebral requiere anticuerpos tanto contra P.69 como contra FHA.

Adenilato ciclasa-hemolisina

B. pertussis produce un adenilato ciclasa-hemolisina (AC-H), una proteína bifuncional de 177 kDa que es secretada en el medio y tiene tanto actividad de adenilato ciclasa como hemolítica.⁶⁸³ La proteína es capaz de unirse a las células sensibles y es translocada en la célula intacta. En el interior de la célula diana, la molécula se escinde proteolíticamente. La activación de la actividad de adenilato ciclasa por la proteína eucarionte calmodulina conduce a la acumulación intracelular de cAMP. Esta acumulación puede suprimir la expresión de la respuesta inmunitaria local al inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis de los neutrófilos.⁵⁶⁵

Citotoxina traqueal

La citotoxina traqueal (TCT) es una molécula pequeña de alrededor de 921 Da compuesta por un tetrapéptido disacárido derivado del peptidoglucano de la pared celular. La molécula contiene glucosamina, ácido murámico, alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico en una relación 1:1:2:1:1 y es liberada en el sobrenadante del cultivo durante la fase de crecimiento logarítmico.²⁷⁹ La TCT daña y destruye específicamente las células epiteliales ciliadas que revisten las vías aéreas donde el microorganismo se fija y puede contribuir a la tos característica de la tos ferina clínica. Se ha demostrado que la TCT afecta adversamente las funciones de las células polimorfonucleares en bajas concentraciones y es tóxica para estas células en concentraciones más altas.²⁹³ También conduce a la producción de interleucina-1 e induce óxido nítrico sintasa, que se cree que media el daño del epitelio del aparato respiratorio.⁵⁵⁵ La TCT y otros péptidos muramílicos similares tienen otras varias actividades biológicas, que incluyen pirogenicidad y adyuvancia.

(Continúa)

Recuadro 9-11 Factores de virulencia de *Bordetella pertussis* (cont.)**Toxina termolábil (toxina dermonecrosante)**

B. pertussis también produce una toxina termolábil (HLT o toxina dermonecrosante) que es un polipéptido único de unos 140 kDa. Las HLT producidas por *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son similares en sus propiedades biológicas y son indistinguibles desde el punto de vista fisicoquímico y serológico, mientras que la HLT producida por *B. avium* es ligeramente diferente en esos aspectos. HLT induce la contracción de los vasos sanguíneos debido a efectos constrictores específicos sobre el tejido del músculo liso vascular y produce necrosis hemorrágica en ratones y en cobayos. Aunque su papel en la patogenia de la tos ferina, si existe alguno, se desconoce, los efectos constrictores de la HLT sobre los tejidos altamente vascularizados del aparato respiratorio podrían conducir a inflamación local y pueden explicar algo de la patología respiratoria asociada con la tos ferina.

Lipooligosacárido

Al igual que otras bacterias gramnegativas, *B. pertussis* tiene lipopolisacárido (LPS, o endotoxina) en la membrana externa de su pared celular. Como sucede con algunos otros patógenos bacterianos, la endotoxina de *B. pertussis* es en realidad un lipooligosacárido (LOS). Este LOS contiene lípido A y un centro de oligosacáridos con ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico, pero carece de los antígenos "O" de polisacáridos de cadena larga hallados en las moléculas de LPS. El papel de LOS en la patogenia de la tos ferina se desconoce, aunque tiene las propiedades habituales asociadas con el LOS de muchos microorganismos, que incluyen pirogenicidad, adyuvancia, inducción de producción de interferón y mitogenicidad y activación policlonal de las células B. La LOS de *B. pertussis* puede ser al menos parcialmente responsable de la reactividad asociada con la vacuna de las células enteras contra la tos ferina.

Aglutinógenos "O" termolábiles

Las especies de *Bordetella* también tienen antígenos denominados aglutinógenos "O" sobre la superficie de la célula bacteriana. Se describieron catorce aglutinógenos (AGG) termolábiles para estas especies, los cuales se asocian con fimbrias y al parecer también participan en la mediación de la fijación a las células diana. Los AGG 1 a 6 se encuentran en *B. pertussis*; AGG 1 es común a todas las cepas de *B. pertussis*, y los AGG 2 a 6 están presentes en estas combinaciones en las diferentes cepas.

años al finalizar esa década. Aunque la experiencia ha sugerido una eficacia clínica del 80% o mayor, las amplias variaciones en el rendimiento de diferentes preparados de vacunas de células enteras sólo se evidenciaron durante los estudios de eficacia clínica prospectiva llevados a cabo con vacunas acelulares potenciales contra la tos ferina. Además, la publicidad que rodea los informes de encefalopatía y secuelas neurológicas permanentes que se relacionaron temporalmente con la recepción de una vacuna DwPT aceleraron los intentos de crear vacunas acelulares o de "subunidades". La caracterización de los componentes subcelulares de *B. pertussis* permitió la elaboración de varias vacunas acelulares consistentes en uno o más antígenos y, comenzando a principios de la década de 1990, se llevaron a cabo al menos siete ensayos sobre eficacia de diferentes vacunas acelulares, entre ellas PT destoxificada junto con uno o más de los otros componentes inmunógenos, como FHA, fimbrias o pertactina P.69. Se logró una eficacia variable entre el 71% y el 97% tanto con las vacunas acelulares como de células enteras. En general, la vacuna acelular de uno y dos componentes tuvo menos éxito que las vacunas con tres a cinco antígenos, y las vacunas de células enteras tuvieron el mismo rendimiento o mayor que los productos acelulares, aunque las vacunas acelulares se asociaron con tasas mucho más bajas de reactividad.^{365,515,778,965,1012,1147,1261,1288} En 1999 se autorizó en los Estados Unidos el uso de cuatro vacunas acelulares contra *B. pertussis*:

1. ACCEL-IMMUNE® (Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics): vacuna tetravalente que contiene PT, FHA, fimbrias y pertactina.
2. TriPedia® (Connaught Laboratories, Inc.): contiene PT y FHA.
3. Infanrix® (SmithKline Beecham Biologicals): contenía PT, FHA y pertactina.
4. Certiva® (North American Vaccines): contiene sólo PT.

En la actualidad, se administran tanto vacunas de células enteras como acelulares junto con los toxoides diftérico y tetánico como DwPT (con la vacuna de células enteras) o como DaPT (con las vacunas acelulares contra tos ferina). El esquema de inmunización consiste en tres dosis de DwPT o DaPT mediante inyección intramuscular a intervalos de 4 a 8 semanas, típicamente a los 2 meses, 4 meses y 6 meses de edad, con una cuarta dosis 6 a 12 meses más tarde.²⁰⁹ Se recomienda una quinta dosis a los 4 a 6 años de edad. La respuesta inmunitaria del huésped luego de recibir vacunas acelulares contra la tos ferina está dirigida contra los antígenos definidos contenidos en la vacuna individual, mientras que la respuesta que sigue a la recepción de la vacuna de células enteras está dirigida predominantemente contra antígenos de la membrana externa y las fimbrias. En general, algunos estudios han mostrado que las vacunas de múltiples componentes que contienen pertactina y antígenos de las fimbrias además de PT y FHA producen una respuesta inmunitaria más viva que las que contienen sólo PT y FHA.^{209,965} Estas vacunas también parecen ser altamente inmunogénicas cuando se administran junto con otras inmunizaciones infantiles. Halperin y cols. investigaron las respuestas inmunitarias de 180 lactantes inmunizados con una vacuna acelular de tres componentes contra tos ferina, toxoides diftérico y tetánico, vacuna contra poliovirus inactivados y vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b-toxoide tetánico. La vacuna contra *H. influenzae* tipo b se administró en la misma jeringa que las otras vacunas o en otra separada. En este estudio se observó que todas las vacunas, incluida la vacuna contra *B. pertussis*, eran inocuas, bien toleradas e inmunogénicas independientemente de la cantidad de vacunas incluidas en la inyección.⁵²⁹

Otras cuestiones relacionadas con el uso de vacunas de subunidades de *pertussis* incluyen su eficacia en adultos y lactantes pequeños con riesgo de tos ferina. Aunque *B. pertussis* no es una causa importante de enfermedad respiratoria en la mayoría

de los adultos, algunos estudios epidemiológicos han implicado repetidas veces a los adultos infectados como fuente y transmisores del microorganismo a los niños.^{235,236,237} Además, han ocurrido brotes en cuidadores adultos expuestos a niños con tos ferina en guarderías. Como la reactividad contra la vacuna de células enteras puede ser más grave en los adultos, también se realizan investigaciones sobre vacunas de componentes acelulares acerca de su inmunogenicidad en adultos que ya fueron vacunados o que están mal vacunados. Varios estudios en poblaciones adultas han mostrado que las vacunas acelulares contra la tos ferina, cuando se administran solas o cuando se combinan con toxoide diftérico y tetánico, producen efectos adversos mínimos y generan respuestas vivas de anticuerpos contra PT, FHA, pertactina y antígenos de las fimbrias presentes en la vacuna sin ninguna interferencia en las respuestas inmunitarias a los toxoides tetánico o diftérico.^{364,675,972,1101} Se están confeccionando pautas para la inmunización de los adultos con riesgo de tos ferina. También se puede observar tos ferina en lactantes pequeños debido a concentraciones subóptimas de anticuerpos transplacentarios de madres sensibles a la enfermedad. Un estudio de una vacuna acelular en lactantes pequeños mostró que la vacuna no prevenía la infección en estos niños, pero mejoró sustancialmente la aparición de los síntomas graves.⁴²

Debido a la autorización relativamente reciente de las vacunas acelulares contra la tos ferina, existen pocos datos sobre la duración de la protección que brindan. Sin embargo, los datos publicados indican que los niveles de anticuerpos luego de la inmunización con vacunas acelulares se mantienen altos durante varios años. Okada y cols. examinaron las concentraciones de anticuerpos contra la tos ferina en tres grupos de niños de 5 a 7 años después de la última inoculación.⁹⁶⁴ Los niños de estos cuatro grupos incluyeron a aquellos que habían recibido cuatro dosis de DwPT (75 niños), tres dosis de DwPT y un refuerzo con DaPT (90) o cuatro dosis de DaPT (131). En este estudio se observó que los títulos de anticuerpos después de la vacunación con DaPT eran equivalentes a los que recibieron DwPT o mejores.⁹⁶⁴ En un estudio de seguimiento de 10 años de duración de 207 niños japoneses que habían recibido una vacuna acelular de dos componentes contra la tos ferina (FHA y PT) o la vacuna de células enteras contra la tos ferina se observó que el 77% de los vacunados tenían aún anticuerpos medibles, independientemente del tipo de vacuna que habían recibido.¹²⁷⁶

Antes de pasar a una explicación sobre las técnicas de aislamiento y los métodos de identificación para *B. pertussis* y otras especies de *Bordetella*, trataremos las capacidades patogénicas de *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. holmesii* y *B. trematum*.

Importancia clínica de otras especies de *Bordetella*

BORDETELLA PARAPERTUSSIS

B. parapertussis también se asocia con una enfermedad similar a la tos ferina en los seres humanos, pero su presentación clínica suele ser menos grave.^{114,595,828} Los niños con infección por *B. parapertussis* tuvieron una duración más breve de la tos, el broncoespasmo, los silbidos, los vómitos, la apnea y la cianosis.^{595,828} Sin embargo, se han comunicado brotes de *B. parapertussis* en los cuales la enfermedad ha sido muy grave y condujo a la muerte, sobre todo en niños muy pequeños. Wirsing von König y Finger compararon la gravedad de la enfermedad en 33 niños con infección por *P. parapertussis* con 331 pacientes con infección por *B. pertussis* y observaron que la frecuen-

cia de la tos paroxística, silbidos y vómitos era casi idéntica en los dos grupos.¹³⁸⁵ Heininger y cols. también compararon la infección por *B. pertussis* en 76 pacientes con la infección por *B. parapertussis* en 38 pacientes apareados por edad y sexo.⁵⁵³ Estos autores observaron que la enfermedad causada por *B. parapertussis* era como la típica de tos ferina pero mucho menos grave y que, al contrario de la tos ferina, la linfocitosis no era una característica de la infección, presumiblemente debido a la ausencia de actividad promotora de la linfocitosis de PT. La menor patogenicidad en *B. parapertussis* puede deberse en efecto a la falta de expresión de PT y otros factores de virulencia. Es interesante señalar que cuando se transfieren genes que codifican ciertos factores de virulencia de *pertussis* (p. ej., PT y FHA) en *B. parapertussis* mediante técnicas genéticas, el microorganismo se torna capaz de producir características similares a *B. pertussis* in vitro (p. ej., anafilaxia, sensibilidad a la histamina y leucocitosis), lo que sugiere que la presencia de genes de virulencia y su regulación pueden constituir la diferencia primaria entre estas especies genéticamente "idénticas".

BORDETELLA BRONCHISEPTICA

B. bronchiseptica causa infecciones del aparato respiratorio en distintas especies animales (p. ej., traqueobronquitis infecciosa o "tos de las perreras" en canes, neumonía en gatos, rinitis atrófica y bronconeumonía en cerdos y lechones, neumonía, otitis media en conejos y cobayos) y puede ser aislado como comensal de las vías respiratorias altas de los seres humanos. Éstos a menudo adquieren el microorganismo de animales domesticados y también puede ocurrir la transmisión hospitalaria de un paciente a otro.^{507,1223} *B. bronchiseptica* es una causa inusual de infecciones fundamentalmente en huéspedes inmunodeprimidos.¹³⁹⁵ Se ha comunicado sepsis, meningitis que sigue a un traumatismo de cráneo, peritonitis, bronquitis y neumonía causadas por *B. bronchiseptica* en pacientes con enfermedad hepática subyacente, alcoholismo, asplenia, enfermedades hematológicas malignas, insuficiencia renal crónica, asma crónica, lupus eritematoso sistémico e hipertensión grave.^{193,225,483,1007,1395} Bauwens y cols. describieron un caso de bacteriemia y neumonía en una mujer de 20 años luego del trasplante de médula ósea por leucemia mieloide aguda.¹⁰² Choy y cols. también describieron un caso de neumonía por *B. bronchiseptica* en un varón de 7 años 28 días después del trasplante de médula ósea por un síndrome de hipergammaglobulinemia IgM ligada al cromosoma X.²⁴⁸ Reina y cols. informaron de un caso de neumonía debida a *B. bronchiseptica* en un paciente de 37 años que había sufrido un traumatismo de tórax grave en un accidente automovilístico y requirió intubación.¹⁰⁶⁰ Dentro de las 72 horas aparecieron infiltrados en la radiografía de tórax y el cultivo del material de aspiración endotraqueal dio el microorganismo en cultivo puro. En ocasiones, *B. bronchiseptica* causa infecciones graves, como neumonía con shock, en pacientes inmunocompetentes.¹²⁵³ Desde 1991, se han comunicado varios casos de neumonía por *B. bronchiseptica* en pacientes con SIDA.^{362,452,861} También se han publicado casos raros de endocarditis causada por *B. bronchiseptica*. En uno de estos casos, el paciente presentó fiebre y una dermatitis alrededor de una incisión quirúrgica reciente. Se supo después que el perro del paciente a menudo mordisqueaba y lamía el área de dermatitis que rodeaba la incisión, lo que sugirió un origen canino para el microorganismo.¹¹⁸⁰ De hecho, se lo solía llamar *B. bronchicanis* debido a su presencia en las vías respiratorias altas de los perros.

BORDETELLA HINZII

Se propuso *B. hinzii* como especie nueva en 1995, aunque el microorganismo había sido descrito informalmente cuando fue aislado en el esputo y en múltiples hemocultivos de un paciente de 42 años con SIDA que no tenía síntomas respiratorios.^{280,1304} Este microorganismo similar a *B. avium* ha sido aislado del aparato respiratorio de pollos y pavos, además en muestras respiratorias de seres humanos.¹³⁰⁴ Se aislaron cepas de *B. hinzii* en ocho ocasiones en un período de 3 años de un paciente adulto con fibrosis quística en asociación con exacerbaciones agudas de su enfermedad pulmonar crónica; el microorganismo no pudo ser erradicado del aparato respiratorio del paciente a pesar del tratamiento antibiótico adecuado.⁴⁴³ En el año 2000, se comunicó una bacteriemia mortal por *B. hinzii* en un hombre de 69 años con colestasis y se aisló *B. hinzii* junto con microorganismos del complejo *Nocardia asteroides* del líquido de lavado broncoalveolar de un paciente con SIDA.^{445,671} Aunque la exposición aviaria del aparato respiratorio se puede descartar en el paciente con SIDA, la posible adquisición de la exposición aviar o la colonización gastrointestinal seguida de colangitis ascendente fueron sugeridos como posibles modos de patogenia en el paciente bacteriémico. Otro microorganismo “similar a *B. avium*” hasta ahora sin nombre fue aislado en un cultivo mixto de un paciente con otitis media crónica. Esta bacteria era distinta de *B. avium* en su patrón de resistencia a los antibióticos, la composición de proteínas y ácidos grasos y las hibridaciones de DNA-DNA y DNA-rRNA.³⁴⁸ *B. avium* no ha sido aislado de muestras humanas o infecciones.

BORDETELLA HOLMESII

B. holmesii, descrito originariamente como un microorganismo no oxidante del grupo 2 de los CDC (NO-2), ha sido aislado en hemocultivos de pacientes con enfermedades febriles agudas, endocarditis, anemia drepanocítica complicada por artritis, diabetes, esplenectomías previas, enfermedad de Hodgkin e insuficiencia respiratoria.¹³⁶⁹ De los 15 casos descritos en esta comunicación, se presentó una enfermedad subyacente en siete, tres ocurrieron en pacientes asplénicos y un paciente había sido mordido por un perro. Las cepas descritas habían sido aisladas en Suiza, Arabia Saudita y los Estados Unidos. En 1996, Lindquist y cols. aislaron *B. holmesii* en múltiples hemocultivos en un varón de 12 años con fiebre, cefalea y un antecedente importante de esplenectomía 4 años antes.⁷⁸⁴ Aunque se desconoce el hábitat normal de *B. holmesii*, el paciente tenía contacto frecuente y prolongado con perros de caza y había sufrido recientemente una lesión en el dedo pulgar con un anzuelo. Tang y otros autores en la Mayo Clinic comunicaron el aislamiento de un microorganismo similar a *B. holmesii* de tres pacientes con septicemia, endocarditis e insuficiencia respiratoria.¹²⁵⁷ Los factores de riesgo fueron asplenia subyacente, enfermedad de Hodgkin y miocardiopatía grave, respectivamente. *B. holmesii* también fue aislado en un lactante de 10 meses que llegó a la sala de emergencias con fiebre e irritabilidad.⁸⁹⁸ Con un diagnóstico original de síndrome viral, creció *B. holmesii* en el único hemocultivo para aerobios dentro de las 36 horas. Durante el seguimiento, el lactante estuvo afebril y asintomático. También se ha aislado *B. holmesii* en múltiples hemocultivos en un varón de 24 años con tos seca y fiebre y una anamnesis compatible con anemia drepanocítica manifiesta desde el período neonatal, hepatitis C, osteomielitis tibial a los 6 años de edad y crisis abdominales frecuentes que requirieron múltiples transfusiones hasta los 8 años de edad.⁹⁴⁰

Recientemente, se han aislado cepas de *B. holmesii* en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de padecer tos ferina.^{841,1418} De 10 996 muestras remitidas desde enero de 1995 hasta diciembre de 1998 al Massachusetts State Laboratory Institute en Boston para el cultivo de especies de *Bordetella*, 32 dieron *B. holmesii*, mientras que 740 y 96 muestras fueron positivas para *B. pertussis* y *B. parapertussis*, respectivamente.⁸⁴¹

BORDETELLA TREMATUM

B. trematum, otra especie recién descrita, ha sido aislada en muestras de heridas humanas y en casos de otitis media crónica.¹³⁰³ Se observó que esta especie estaba más estrechamente relacionada desde el punto de vista genético y quimiotaxonómico con la cepa tipo del género *Bordetella* (*B. pertussis*) que con la cepa tipo del género *Alcaligenes* (*A. faecalis*).

**Aislamiento e identificación de las especies de *Bordetella*
MUESTRAS Y MEDIOS DE CULTIVO**

Como *B. pertussis* se fija preferencialmente al epitelio ciliado en las vías respiratorias altas, la muestra de elección se obtiene por aspiración nasofaríngea con un tubo de alimentación para lactantes conectado a un frasco de aspiración de moco. Se introduce la punta del tubo en una narina a lo largo del piso de la nasofaringe hasta que alcance la faringe posterior. Una vez que el tubo está colocado, se aplica aspiración suave. Luego de la aspiración, se introduce solución salina (1 mL) a través de la tubuladura en el frasco.⁵²⁵ Para obtener las muestras de hisopadas, se pasa un hisopo nasofaríngeo pequeño a través de cada narina hasta que la punta del hisopo alcance la nasofaringe posterior. Se dejan colocados los hisopos y se los rota suavemente durante 30 segundos a 1 minuto de modo que absorban los microorganismos. Los hisopos para cultivo o diagnóstico molecular deben estar compuestos de Dacrón con vainas de plástico. No se deben utilizar hisopos con punta de algodón porque algunas fibras ese material inhiben el cultivo. El alginato de calcio y el aluminio lixiviado para vainas de hisopo metálicas también son inhibidores para los ensayos basados sobre PCR para la detección de *B. pertussis*.¹³³⁹ El máximo rendimiento de cultivos positivos se logra con los hisopos nasofaríngeos recogidos junto con el material de aspiración. Los cultivos habituales de fauces no son apropiados para el aislamiento de *B. pertussis*. Las muestras para bordetelas también requieren medios de transporte especiales para el crecimiento óptimo del microorganismo. Se puede utilizar el medio de transporte de Regan-Lowe para el material de aspiración las muestras de hisopados, que tienen la ventaja de servir como agente estabilizador. Aunque la base de agar BG “caseara” es superior, existe un medio basal deshidratado comercial (Remel Laboratories; BD Biosciences). La base se prepara con anticipación y se almacena refrigerada. Si se sospecha *B. pertussis*, se debe notificar al laboratorio antes de que reciba la muestra, dado que el medio final debe prepararse en fresco. Para preparar el medio para el uso, se funde la base de agar con

Se necesitan medios especiales para el aislamiento de *B. pertussis*. El medio clásico es agar de Bordet-Gengou (BG), el cual se prepara con patatas para incorporarle un alto contenido de almidón. El almidón neutraliza los materiales tóxicos que puede haber en el agar o en la muestra propiamente dicha. Se omiten las peptonas en el medio, dado que estas proteínas también son inhibidoras. El agar BG también contiene glicerol como agente estabilizador. Aunque la base de agar BG “caseara” es superior, existe un medio basal deshidratado comercial (Remel Laboratories; BD Biosciences). La base se prepara con anticipación y se almacena refrigerada. Si se sospecha *B. pertussis*, se debe notificar al laboratorio antes de que reciba la muestra, dado que el medio final debe prepararse en fresco. Para preparar el medio para el uso, se funde la base de agar con

patatas/glicerol y se agregan 30 mL de sangre desfibrinada de carnero por 100 mL de medio base de agar (aproximadamente 23% de sangre peso/volumen). En las fórmulas más antiguas, se agregaba cefalexina (concentración final, 40 µg/mL) a los medios para inhibir los microorganismos grampositivos contaminantes. Se puede sustituir por metilicina (2,5 µg/mL) u oxacilina (0,625 µg/mL). Se inoculan tanto medios no selectivos como selectivos, ya que algunas cepas de *B. pertussis* pueden ser ligeramente inhibidas por la cefalexina.

En 1977, Regan y Lowe describieron un medio que contenía carbón y sangre de caballo que resultó superior al agar BG en varios estudios.¹⁰⁵⁶ Aunque se lo describió originariamente como medio de transporte/enriquecimiento, las fórmulas de agar de Regan-Lowe se encuentran disponibles como medio de transporte/enriquecimiento semisólido y como medio sólido para el aislamiento del microorganismo. Las fórmulas para el medio de Regan-Lowe (RL) se muestran en el recuadro 9-12.

El medio de transporte/enriquecimiento semisólido es idéntico en fórmula al medio de aislamiento que mostramos antes, salvo en que se presenta agar carbón con la mitad de concentración (es decir, 25,5 g/L) y se expende en tubos con tapa a rosca estériles y no en placas de Petri de 100 mm. También se recomienda preparar algo del medio sin cefalexina de modo de contar con el medio selectivo y con el no selectivo para el crecimiento de los microorganismos.

En condiciones óptimas, los medios deben ser inoculados directamente en el momento de la recolección de muestras tanto en medios selectivos (con cefalexina, metilicina u oxacilina, véase antes) como en medios no selectivos (véase lámina en color 9-5G). Si se utiliza un medio de transporte, el medio semisólido de Regan-Lowe (RL) es óptimo, dado que las fórmulas de los medios de transporte de Stuart y de Amies no son adecuadas para mantener la viabilidad de *B. pertussis*. Las muestras transportadas en medio semisólido RL pueden ser subcultivadas al recibirlas en el medio RL para aislamiento o en medio BG con cefalexina y sin ella (u oxacilina/metilicina). El medio de transporte se incuba luego junto con las placas primarias y se subcultiva en agar RL después de 48 horas de enriquecimiento a 35 °C en aire humidificado ambiente.⁶⁰¹ Al contrario de las ideas y las prácticas sostenidas ampliamente, el aire ambiente es superior al medio de incubación enriquecido con CO₂. Las placas deben incubarse por lo menos durante 7-10 días. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en Canadá, crecieron 7 (16%) de 44 aislamientos de *B. pertussis* y 2 (50%) de 4 aislamientos de *B. parapertussis* después de sólo 12 días de incubación.⁶⁷³

Se han publicado otras fórmulas de medios para el aislamiento de *B. pertussis*.^{44,601,602,741} Muchas de ellas fueron modificaciones de la fórmula de Regan-Lowe, es decir, una base de agar carbón con suplemento de sangre desfibrinada más anti-

bióticos como lincomicina. Hoppe y Schlagenhauf observaron que la sangre de caballo estimulaba una proliferación abundante y más rápida de *B. pertussis* que la sangre de carnero, y que ambas eran claramente superiores a la sangre humana.⁶⁰¹ El microorganismo también crece en agar carbón-extracto de levadura (BCYE), el medio utilizado para el aislamiento de especies de *Legionella*. Ng y cols. aislaron inesperadamente *B. pertussis* de muestras de lavado broncoalveolar y biopsia transbronquial de tres pacientes con SIDA en agar BCYE en su búsqueda de microorganismos *Legionella* en estos pacientes.⁸³⁷ También se describió un medio sin sangre denominado medio sólido de ciclodextrina (CSM),⁴⁴ que contiene un compuesto llamado heptaquis (2,6-*O*)-dimetil-β-ciclodextrina en una base de caldo sintética compuesta por glutamato, prolina, sales balanceadas, buffer TRIS, ácidos de Casamino y L-cisteína. Se observó que heptaquis-ciclodextrina estimulaba el crecimiento de *B. pertussis* y suprimía el crecimiento de la flora orofaríngea normal. Este medio también se puede volver selectivo mediante la inclusión de cefalexina (concentración final, 5 µg/mL). En un estudio de 40 muestras de 29 pacientes con tos ferina clínica, desarrolló *B. pertussis* en el 100% de las muestras cultivadas en medio CSM selectivo, pero sólo en el 65% de las muestras cultivadas en agar BG selectivo.⁴⁴ También se demostró que el medio CSM tenía un período de validez refrigerado más prolongado que el agar BG.

PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Además del cultivo, las pruebas de inmunofluorescencia directa (IFD) también se utilizan para detectar *B. pertussis* directamente en extendidos preparados de muestras nasofaríngeas. Aunque estas pruebas proporcionan resultados rápidos, es bien aceptado que el cultivo en medios apropiados es más sensible la prueba de IFD.^{528,1233,1423} Según cuándo se recogen las muestras en el curso clínico, es posible que la prueba de IFD no detecte pequeñas cantidades de microorganismos que serán recogidos en el cultivo. Algunos investigadores observaron que esta prueba es inaceptablemente poco sensible e inespecífica, sobre todo cuando se utilizan antisueros policlonales comerciales. Halperin y cols. notaron que sólo 6 de 20 casos positivos por cultivo tenían IFD positivas, y que en sólo 4 de los 12 casos de IFD positiva se confirmaron cultivos negativos mediante pruebas serológicas de muestras de suero de fase aguda y de convalecencia.⁵²⁸ A esto se agregan las dificultades intrínsecas con la interpretación y la subjetividad de las técnicas de fluorescencia. Además, se demostró que los anticuerpos policlonales contra *Legionella* también reaccionan con algunas cepas de *B. pertussis* y *B. Bronchiseptica* en las pruebas de IFD contra los primeros, lo que conduce a resultados falsos positivos de inmunofluorescencia para especies de *Legionella*.^{110,640,936} La prueba de IFD para la detección de *B. pertussis* debe utilizarse junto con el cultivo, no en sustitución de él.

Las pruebas de IFD pueden realizarse utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos monoclonales (Accu-Mab, Alta-Chem Pharma, Edmonton, Alberta, Canadá) están dirigidas contra un epítipo de lipooligosacárido y es un reactivo fluorocromo doble para la detección de *B. pertussis* y *B. parapertussis* en la misma muestra. Para realizar la prueba IFD, se colocan muestras de hisopados nasofaríngeos o material de aspiración nasofaríngea en un tubo estéril que contiene una pequeña cantidad (0,5 mL) de caldo de ácidos Casamino. Después de una mezcla enérgica, se preparan cuatro a seis extendidos. La formación de capas con las gotas de material y la posterior desecación antes de las aplicaciones de gotas pro-

Recuadro 9-12 Medio de Regan-Lowe para el aislamiento de *Bordetella pertussis* (por litro de agua destilada)

Agar carbón (Oxoid CM 119)	51 g
Sangre de caballo, desfibrinada	100 mL
Cefalexina (omitir para agar no selectivo)	0,04 g
Anfotericina B (opcional)	0,05 g

duce un frotis con una película visible de material sobre él. Después de la desecación y la fijación con calor, se pueden teñir los portaobjetos. Se deben utilizar conjugados de *B. pertussis* y *B. parapertussis* correctamente titulados; debido a la alta especificidad de los conjugados, uno se puede utilizar como control negativo de tinción inespecífica del otro en el procedimiento de tinción. Los conjugados policlonales provienen de BD Biosciences. Los frotis de control positivos y negativos se preparan con suspensiones PBS/solución salina (igual a un McFarland #1) de cultivos de referencia en medio BG o RL sin antibióticos. Con estas suspensiones se logran frotis con 10 a 100 microorganismos por campo de inmersión en aceite. En la prueba de IFD, los microorganismos se presentan como cocobacilos pequeños con una fluorescencia periférica de color verde manzana brillante (véase lámina en color 9-5E). Pueden aparecer aislados, de a pares o en grupos. En los frotis preparados con muestras altamente viscosas, los microorganismos pueden mostrar adherencia a las bandas mucosas. Los extendidos de muestras se examinan con 400 ×; las áreas sospechosas se examinan con objetivo de inmersión en aceite para su confirmación. Las tinciones de Gram de extendidos preparados simultáneamente también pueden ayudar a confirmar la morfología de los microorganismos que fluorescen con los anticuerpos.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN

En cultivo, las colonias de *B. pertussis* pueden observarse después de 2 a 4 días. El crecimiento suele ser evidente antes en medios sin antibióticos, pero no siempre es así. Las placas se examinan en el microscopio con un objetivo de campo (10 ×) y una luz incidente oblicua para determinar las características de las colonias. Las cepas clínicas frescas de *B. pertussis* en agar BG aparecen como pequeñas colonias brillantes y muy acuminadas en el perfil. Clásicamente, se describe que se asemejan a pequeñas gotitas de mercurio (véase lámina en color 9-4G). Las colonias en BG pueden ser ligeramente β-hemolíticas,

sobre todo en las áreas más confluentes de crecimiento o después de una incubación prolongada. En medio de agar RL, las colonias son pequeñas, con cúpula y brillantes, con una opalescencia en madreperla blanca (véase lámina en color 9-5G y H). Las colonias de *B. parapertussis* crecen más rápidamente, son más β-hemolíticas en agar BG y tienen un color gris o ligeramente pardo. Las colonias de *B. bronchiseptica* se observan dentro de las 24 horas, son grandes, más planas y tienen aspecto mate más que brillante. Las últimas especies se asemejan a un bacilo gramnegativo no fermentativo (al igual que una especie de *Alcaligenes*) en el aspecto de sus colonias y la producción de un olor característico a "no fermentadores". También difiere la morfología de la tinción de Gram de estos microorganismos. *B. pertussis* aparece como cocobacilos pequeños y de tinción pálida, mientras que *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* tienen definitivamente más forma de bacilos. Debido a la tinción pálida de los microorganismos, se debe dejar sobre el portaobjetos una contratinción de safranina al menos durante 2 minutos (véase lámina en color 9-5F).

Una vez aislado, *B. pertussis* suele identificarse por la prueba de inmunofluorescencia, dado que es muy inerte en las pruebas de identificación bioquímica (cuadro 9-16).⁵²⁴ Los métodos serológicos también pueden utilizarse para identificar *B. parapertussis*, pero los métodos bioquímicos pueden proporcionar una identificación presuntiva. *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* y *B. avium* son oxidasa positivos con el reactivo de oxidasa de Kovac, mientras que *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. trematum* son oxidasa negativos. *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* y *B. holmesii* son catalasa positivos, mientras que *B. pertussis* es variable para la producción de catalasa. Tanto *B. parapertussis* como *B. bronchiseptica* son ureasa positivos, y las últimas especies producen una prueba positiva en 4 horas o menos. *B. hinzii* es variable para la producción de ureasa, mientras que *B. pertussis*, *B. holmesii*, *B. avium* y *B. trematum* son ureasa negativos. Tanto *B. parapertussis* como *B. holmesii* producen un pigmento pardo soluble en medios de

Cuadro 9-16 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Bordetella*

CARACTERÍSTICA	<i>B. PERTUSSIS</i>	<i>B. PARAPERTUSSIS</i>	<i>B. BRONCHISEPTICA</i>	<i>B. AVIUM</i>	<i>B. HINZII</i>	<i>B. HOLMESII</i>	<i>B. TREMATUM</i>
Oxidasa	+	—	+	+	+	—	—
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	—	—	+	+	+	—	+
Reducción de nitrato	—	—	+	—	—	—	v
Ureasa	—	+ (24 horas)	+ (4 horas)	—	v	—	—
Citrato	—	+	+	+	+	ND	ND
Pigmento marrón en agar infusión de corazón con L-tirosina (1 g/L)	—	+	—	—	—	+	ND
Crecimiento en:							
Agar de Bordet-Gengou	2–6 días	1–3 días	1–2 días	2 días	2 días	2 días	2 días
Agar de Regan-Lowe	3–6 días	2–3 días	1–2 días	1–2 días	2 días	2 días	2 días
Agar sangre	Sin crecimiento	1–3 días	1–2 días	2 días	2 días	2 días	2 días
Agar chocolate	Sin crecimiento	1–3 días	+	2 días	2 días	2 días	2 días
Agar de MacConkey	Sin crecimiento	v	+	+	+	3–7 días	2 días

+: reacción positiva; —: reacción negativa; v: reacción variable.

^aReacción débil/retardada.

agar, mientras que *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. trematum* y *B. avium* no lo hacen. En el cuadro 9-16 se muestran otras características para la identificación de las especies de *Bordetella*.

Nuevas técnicas para la detección y la identificación de *Bordetella pertussis*

También se han aplicado varias técnicas más nuevas a la identificación y la detección directa de *B. pertussis* en muestras clínicas.⁹⁰⁶ Se han utilizado anticuerpos monoclonales desarrollados contra LPS y FHA de *B. pertussis* en formatos de ensayos "de manchas" (*dot blot*) e inmunsorbente enzimático para la identificación de *B. pertussis* a partir de las colonias aisladas.^{513,514,1122} También se describieron varios métodos rápidos para la detección directa de antígenos y factores de virulencia de *B. pertussis* en muestras nasofaríngeas. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales preparados contra PT, FHA y LPS de *B. pertussis* que han sido evaluados en formatos de inmunanálisis enzimáticos como pruebas de "captura de antígeno" para la detección directa de estos factores de virulencia específicos de *B. pertussis* en muestras clínicas.^{439,513,514} Las pruebas de cultivo tisular *in vitro*, como la prueba de citotoxicidad de células ováricas de hámster chino realizada directamente en muestras de las vías respiratorias altas, también se describieron como rápidas, sensibles y específicas para el diagnóstico de tos ferina.⁵²⁷ Se ha explotado PT purificada, FHA y otras proteínas como antígenos para uso en las pruebas de detección de anticuerpos como herramientas diagnósticas y para vigilancias del estado inmunitario (véase sección en "Pruebas serológicas para el diagnóstico de tos ferina", más adelante).

Con la caracterización genética de *B. pertussis* y sus factores de virulencia y la clonación de los genes para estas proteínas, se han desarrollado genes, cebadores de PCR específicos de especie o ambos y sondas tanto para la detección directa de microorganismos en muestras nasofaríngeas como para la identificación de microorganismos aislados en cultivo. De hecho, las pruebas basadas sobre PCR se convierten en las de elección para el diagnóstico de tos ferina debido a su exquisita sensibilidad y especificidad. Se han identificado las secuencias diana de ácidos nucleicos específicas de *B. pertussis* y se han desarrollado cebadores y sondas para su detección mediante PCR. Las secuencias diana de PCR incluyen la secuencia de inserción repetida IS481 específica de *B. pertussis*, la región promotora del gen de la toxina de *B. pertussis*, el gen de la adenilatociclase y los genes estructurales para las proteínas porinas de *B. pertussis*.^{187,350,467,783,849,931,1063,1275,1307,1340}

El uso de una combinación de cebadores y enzimas de restricción puede permitir la detección simultánea de *B. pertussis* y *B. parapertussis* y la discriminación entre ellos. Algunas secuencias diana utilizadas para PCR, como la secuencia de inserción IS481 de *B. pertussis*, también se han detectado en otras especies de *Bordetella*, como *B. holmesii*.⁷⁹⁴ La técnica de PCR anidada (*nested*) utiliza una secuencia de 239 pares de bases de la región promotora PT como diana.¹⁰⁶³ Esta secuencia se encuentra en *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* y es amplificada durante el ciclado térmico. La identificación de las especies se completa mediante la escisión de amplicones con endonucleasas de restricción y el análisis en electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio.⁹⁵¹ Cada especie produce un patrón de fragmentos de restricción característico. También se ha modificado la detección de amplicones luego de la amplificación con PCR con el uso de técnicas de captura de productos específicos de sondas.^{187,931} En un forma-

to, los amplicones son desnaturalizados y colocados en microceldas que contienen una sonda de captura monocatenaria. Después del lavado, se agrega una sonda detectora conjugada con fosfatasa alcalina en fase de solución que reacciona con una porción del amplicón desnaturalizado y capturado.⁹³¹ También se pueden utilizar los métodos que se valen de la PCR para identificar microorganismos en casos en los cuales las pruebas bioquímicas, serológicas o ambas dan resultados no concluyentes.¹²¹⁵ Las recomendaciones para un enfoque estandarizado de la tipificación epidemiológica de cepas de *B. pertussis* han incluido una combinación de técnicas serológicas y moleculares, como LPS y serotipificación de fimbrias, huellas digitales (*fingerprinting*) de DNA mediante electroforesis en gel de campo pulsado y la secuenciación de los genes para pertactina (PRN) y la subunidad S1 de PT.⁸⁹⁰ También se ha utilizado análisis de enzimas de restricción y ribotipificación para la diferenciación de *B. hinzii* y *B. avium*.¹¹¹⁸

Se han comparado los métodos que utilizan la PCR con la IFD y los cultivos convencionales en varios estudios. En un estudio canadiense reciente, Tilley y cols. observaron que la PCR tenía una sensibilidad del 95% comparada con el cultivo (36%) y la prueba de IFD que utilizaba reactivos policlonales (11,4%) y monoclonales (8,3%).¹²⁷⁵ En un estudio de validación de PCR llevado a cabo durante un ensayo de vacuna contra la tos ferina en Suecia, el análisis por PCR de 2 421 muestras de aspiración nasofaríngea en el que se utilizó la región promotora PT como diana tuvo una sensibilidad del 94,3% y una especificidad diagnóstica del 99%.¹⁰⁶³ Nelson y cols. comunicaron que la PCR y el cultivo tenían sensibilidades de sólo 86% y 58%, respectivamente; el intervalo entre el inicio de la enfermedad y la recolección de muestras y el estado inmunitario del paciente por evaluar fueron los factores que más afectaron la sensibilidad de ambos ensayos.⁹³¹ Loeffelholz y cols. compararon cultivo, IFD y PCR para la secuencia IS481 en 319 muestras consecutivas, lo que llevó a que 59 muestras fueran positivas para una o más pruebas. Sobre la base de las revisiones de protocolos y las evaluaciones de los pacientes según una definición de caso de tos ferina de los CDC, la sensibilidades del cultivo, la IFD y la PCR fueron del 15,2%, 52,2% y 93,5%, con especificidades correspondientes del 100%, 98,2% y 97,1%, respectivamente.⁷⁹³ Este estudio señaló que varios resultados positivos de la PCR se obtuvieron sobre muestras de individuos que no cumplían con la definición de caso, pero tenían síntomas compatibles con tos ferina típica y atípica.

Los métodos moleculares también han identificado secuencias de inserción y, por lo tanto, métodos de identificación molecular, para *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*.¹³⁰⁸ IS1002 es una secuencia de inserción que se encuentra junto con IS481 en *B. pertussis* y tiene una identidad de secuencia del 61,5% con IS481. IS1002 también se encuentra en cepas de *B. parapertussis* humanas, pero está ausente en cepas ovinas. Otra secuencia de inserción, IS1001, se encuentra en todas las cepas de *B. parapertussis* humanas y ovinas y en cepas de *B. bronchiseptica* que se aíslan en mamíferos pero no se encuentran en *B. pertussis*. La detección directa de IS1001, una secuencia de inserción que se encuentra en *B. parapertussis*, ha sido utilizada para desarrollar una técnica de detección/identificación basada sobre PCR para este microorganismo.⁷⁸³ El análisis filogenético de estas secuencias de inserción sugiere que es probable que las cepas humanas y ovinas de *B. parapertussis* evolucionan en forma independiente de las cepas de *B. bronchiseptica* y que *B. parapertussis* haya adquirido IS1002 de *B. pertussis*.

Pruebas serológicas para el diagnóstico de la tos ferina

Con la disponibilidad de antígenos separados de *B. pertussis*, como PT y FHA, se han investigado y desarrollado métodos serológicos para determinar las respuestas inmunes a antígenos específicos luego de la infección clínica o la inmunización. Varios componentes de *B. pertussis* son inmunogénicos y generan respuestas intensas de anticuerpos. Guiso y cols. utilizaron análisis de Western blot para examinar la respuesta del huésped a varios antígenos de *B. pertussis*, entre ellos PT, FHA, adenilato ciclasa-hemolisina y pertactina, en 27 niños con sospecha de tos ferina.⁵⁰⁹ De estos niños, 19 tuvieron diagnóstico de tos ferina mediante pruebas serológicas y 10 tenían cultivos positivos. En la convalecencia, los sueros de los 19 pacientes fueron positivos para anticuerpos anti-PT, anti-FHA y anti-H-AC mediante Western immunoblot, mientras que sólo una muestra de suero de la etapa de convalecencia mostró anticuerpos antipertactina. He y cols. examinaron antígenos acumulados y purificados de *B. pertussis* en un formato de inmunoenálisis enzimático para determinar el antígeno o los antígenos que proporcionarían la prueba más sensible que tuviera una especificidad por lo menos del 99%.⁵⁴⁵ Observaron que las sensibilidades del EIA utilizando PT solo, FHA solo o pertactina sola fueron del 92%, 85% y 62%, respectivamente; la sensibilidad del EIA con un conjunto de estos antígenos fue del 85%. También se purificó la adenilato ciclasa de *B. pertussis* y se utilizó como antígeno en una prueba serológica basada sobre EIA, que mostró que se producen títulos elevados de anticuerpos antiadenilato ciclasa después de la infección y después de la inmunización con vacunas de células enteras.³⁹⁶ También se han creado pruebas funcionales para la inhibición de los efectos biológicos de los factores de virulencia del microorganismo mediada por anticuerpos. Por ejemplo, Kaslow y cols. describieron métodos directos e indirectos para medir la inhibición de la actividad de la ADP-ribosiltransferasa mediada por PT luego de la inmunización y de la infección por *B. pertussis*.⁶⁷⁰

Las pruebas serológicas para *B. pertussis* han atraído mucho interés científico en los últimos años debido al desarrollo y la evaluación de vacunas acelulares contra la tos ferina que utilizan antígenos purificados más que células enteras.^{238,524,526} Antes de la iniciación de grandes ensayos sobre la eficacia de las vacunas, se realizaron pruebas de detección de anticuerpos para tos ferina con células enteras inactivadas, células enteras sonificadas o extractos acelulares crudos de *B. pertussis* como antígenos; la interpretación de las pruebas serológicas utilizando estos antígenos a menudo fue difícil. Como parte de varios ensayos de vacunas llevados a cabo bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se desarrolló mejor la serología de la tos ferina como un procedimiento de inmunoenálisis enzimático semiestandarizado que fue incluido en la definición de caso de tos ferina adoptada por la OMS.¹³⁹⁶ En la actualidad, la mayoría de los ensayos de anticuerpos para el diagnóstico de tos ferina utilizan antígenos purificados, como PT, FHA, pertactina y antígenos de las fimbrias, en un formato de EIA. Los anticuerpos dirigidos contra PT son específicos de *B. pertussis*, mientras que los anticuerpos anti-FHA también son producidos luego de la infección por *B. parapertussis*. Además, otros microorganismos pueden generar anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con FHA de *B. pertussis* (p. ej., *H. influenzae* no tipificables). Luego de la infección natural, los anticuerpos suelen aparecer 10 días a 2 semanas después del inicio de los síntomas y se detectan anticuerpos IgG anti-PT y anti-FHA en más del 90% y anticuerpos IgA en el 20-40% de los individuos infectados. Las respuestas inmunita-

rias a otros antígenos (p. ej., pertactina, antígenos de las fimbrias) tienden a ser más variables y pueden hallarse en el 20-60% de las personas infectadas.

Las respuestas inmunes a *B. pertussis* están influidas por el estado de vacunación y la edad del huésped.⁹⁰⁶ En la definición de caso de tos ferina desarrollada por la OMS, la confirmación serológica requiere sueros apareados (que muestran seroconversión de negativo a positivo o una elevación de cuatro veces en el título), junto con criterios clínicos (tos espasmódica durante más de 21 días).¹³⁹⁶ Trollfors y cols. realizaron pruebas serológicas para tos ferina en un grupo de niños suecos no vacunados, con signos clínicos (tos ≥ 21 días y tos < 21 días) y evidencia no serológica de infección por *B. pertussis* (cultivo positivo, PCR). Entre los que tenían tos ≥ 21 días, las concentraciones de anticuerpos anti-PT y anti-FHA aumentaron 400 veces y 68 veces, respectivamente. Más del 90% de los niños tuvieron un aumento importante del título a ambos antígenos si la muestra de fase aguda se obtenía dentro de los 14 días del inicio de la enfermedad.¹²⁸⁹ Sin embargo, es posible que las pruebas serológicas no sean útiles en el tratamiento de un paciente con enfermedad aguda porque la producción de anticuerpos específicos se puede retardar, sobre todo en los lactantes. En un estudio reciente de un grupo de pacientes pediátricos no vacunados que se ajustaban a la definición de caso de tos ferina de la OMS, sólo el 7-14% de todos los niños tenían concentraciones elevadas de IgG anti-PT en la muestra de fase aguda.¹³⁸⁶ Las muestras recogidas 5 a 10 semanas después del inicio de la tos tuvieron una sensibilidad diagnóstica del 81-89% cuando se aplicaron los valores de referencia relacionados con prevalencia de tos ferina en los lactantes (< 1 año), los niños pequeños (1-4 años) y los escolares (5-10 años). En los niños vacunados, la respuesta inmunitaria secundaria conduce a incrementos rápidos del título de anticuerpos, de modo que es posible que no se observen cambios importantes en los anticuerpos entre las muestras secuenciales. Sin embargo, las pruebas serológicas en las poblaciones vacunadas pueden ser útiles para el diagnóstico, dado que un título elevado de la respuesta inmunitaria secundaria en una única muestra de suero puede indicar infección en "tiempo real". Este enfoque puede ser útil para diagnosticar tos ferina en adolescentes y adultos, ya que la tos ferina a menudo no se incluye en el diagnóstico diferencial inicial de las infecciones respiratorias pediátricas; en consecuencia los intentos de cultivo o de PCR se hacen tarde en el curso clínico. Después del análisis de datos de un estudio poblacional grande llevado a cabo en Holanda, De Melker y cols. observaron que los niveles de IgG anti-PT de al menos 100 U/mL en un ensayo de EIA son diagnósticos de infección reciente o activa por *B. pertussis*; en la mayoría de los casos, esta concentración de anticuerpos se logró dentro de las 4 semanas del comienzo de la enfermedad.³¹⁸ Las unidades de PT por mililitro de suero se determinan mediante calibración de ensayos de EIA con antígeno preparado por la FDA (Laboratorio para Tos ferina de la Food and Drug Administration, Rockville, MD).

Además de la EIA, también se describieron pruebas de aglutinación de partículas para detección de anticuerpos. Aoyama y cols. desarrollaron un ensayo de aglutinación de partículas con poli(γ -metil-L-glutamato) sensibilizado para PT como partícula sólida para la detección de anticuerpos anti-PT.⁴³ Se detectaron anticuerpos anti-PT en los 21 receptores de la vacuna después de cada vacunación. Además, se detectó un aumento importante (más de cuatro veces) en los anticuerpos anti-PT en el 76% de 51 pacientes con tos ferina confirmada dentro de las 4 semanas del inicio de la enfermedad, comparado con el 67% de los 51 que fueron detectados con EIA.⁴³

Tratamiento de la tos ferina

En general, la tos ferina se trata con eritromicina (forma de estolato, 40 mg/kg/día; forma de etilsuccinato, 50-60 mg/kg/día) durante un período por lo menos de 2 semanas para evitar las recaídas. Es posible que las series más cortas (p. ej., 7-10 días) no eliminen el microorganismo de las vías respiratorias altas. La administración de este antibiótico incluso durante la etapa paroxística disminuye la gravedad y la duración de la enfermedad. Las cepas de *B. pertussis* son sensibles a la eritromicina in vitro y tienen CIM que varían entre 0,02 y 0,12 µg/mL. No se observó resistencia a la eritromicina hasta 1995, cuando se comunicó el primer caso de tos ferina causada por una cepa de *B. pertussis* resistente a la eritromicina en un niño de 2 meses en Yuma, Arizona.⁷⁷⁴ Cuando no hubo mejoría clínica después de una serie de 12 días de eritromicina, las pruebas con disco de las cepas no mostraron zonas de inhibición alrededor de los discos de eritromicina, claritromicina y clindamicina. Las pruebas de dilución en agar pusieron en evidencia una CIM de eritromicina > 64 µg/mL. Sin embargo, las cepas resistentes a la eritromicina siguen siendo relativamente infrecuentes. En una vigilancia de 47 cepas de niños recogidas en la región occidental intermontañosa de los Estados Unidos desde enero de 1985 hasta junio de 1997, sólo una fue resistente a la eritromicina (CIM, 32 µg/mL) en las pruebas de dilución en agar.⁷²¹ Se han utilizado otros fármacos como azitromicina en estudios no comparativos abiertos y eliminan con éxito el microorganismo del aparato respiratorio, pero el equilibrio de la experiencia clínica indica que la eritromicina es superior.⁷⁴ El trimetoprim-sulfametoxazol también puede erradicar *B. pertussis* de la nasofaringe y fue utilizado con éxito para tratar al niño con la cepa resistente a la eritromicina. Aunque trimetoprim-sulfametoxazol puede ser una alternativa útil a la eritromicina, no se ha determinado la dosificación ni la duración del tratamiento.^{598,774} Las fluoroquinolonas también suele tener buena actividad contra *B. pertussis*, pero no se han realizado ensayos clínicos, ya que su uso está contraindicado en los niños; estos agentes pueden ser útiles para el tratamiento de adultos con infección por *B. pertussis*.⁶⁰³

Además de la quimioterapia antibiótica, se han investigado otros métodos terapéuticos para *B. pertussis*. Recientemente, se llevó a cabo un ensayo en fase I sobre la seguridad, la farmacología y la respuesta al tratamiento de *B. pertussis* con inmunoglobulina anti-*B. pertussis* intravenosa (P-IGIV). Este producto plasmático acumulado contiene una concentración siete veces mayor de inmunoglobulina anti-PT que la globulina sérica inmune convencional. En 26 niños con tos ferina confirmada, el tratamiento con P-IGIV condujo a declinaciones de la linfocitosis y la tos paroxística para el tercer día después de la transfusión de P-IGIV en todos los tratados sin provocar efectos adversos.¹⁸⁵

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Bordetella*

Aunque no existen procedimientos estandarizados, se han evaluado varios métodos para las pruebas de sensibilidad in vitro de las especies de *Bordetella*. Se han realizado pruebas de sensibilidad por dilución en agar con algunos medios, entre ellos agar de Mueller-Hinton con sangre de caballo al 5%, agar de Bordet-Gengou con sangre de caballo al 5% o al 20% y agar de Regan-Lowe.^{572,599} Hoppe y Paulus evaluaron el agar de Bordet-Genou con sangre de caballo al 5%, agar oxoide-carbón con sangre de caballo al 5% y agar de Mueller-Hinton con sangre de caballo al 5% para las pruebas de dilución en agar in vitro y

observaron que el agar de Mueller-Hinton con sangre de caballo proporcionaba los resultados más constantes.⁵⁹⁹ Las CIM determinadas en medios que contienen carbón fueron una a cinco veces más altas para las cepas clínicas, las cepas control y *S. aureus* ATCC 29213, debido a la inactivación de algunos antibióticos por el carbón. Utilizando el método de dilución en agar, *B. pertussis* es sensible a una amplia variedad de antibióticos in vitro, incluidos β-lactámicos (ampicilina/amoxicilina), macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina, roxitromicina), sulfamidas (trimetoprim-sulfametoxazol), rifampicina y fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, temafloxacina, trovafloxacina).^{596,597,600,603,721,740} Entre las fluoroquinolonas, la levofloxacina es más activa contra *B. pertussis* (CIM, 1 µg/mL) que contra cepas de *B. parapertussis* (CIM, > 2 µg/mL).⁶⁰⁴ La mayoría de las cepas de *B. pertussis* son resistentes a la tetraciclina.

Las tiritas Etest (AB Biodisk, Piscataway, NJ) y los métodos modificados de difusión con discos también fueron evaluados para pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *B. pertussis*. Korgenski y Daly observaron un acuerdo esencial entre las CIM por dilución en agar y las CIM de Etest para el 89,1% de 46 aislamientos (la CIM de Etest estaba dentro ± 1 dilución doble de la CIM del agar, mientras que el 10,9% tenía CIM que eran > 1 dilución doble de la CIM por dilución en agar).⁷²¹ Hill y cols. también evaluaron el Etest utilizando tanto agar de Bordet-Gengou con sangre de caballo al 20% como agar de Regan-Lowe y observaron que el método Etest producía resultados similares a los de su procedimiento de dilución en agar de referencia (utilizando agar de Bordet-Gengou con sangre de caballo al 20%) para eritromicina, rifampicina y cloranfenicol; las CIM de trimetoprim-sulfametoxazol utilizando Etest fueron más bajas que las obtenidas con dilución en agar.⁵⁷² Estos investigadores evaluaron también un procedimiento de difusión con disco utilizando agar de Regan-Lowe con un inóculo estandarizado (estándar de McFarland 0,5) y observaron que este método detectaba con precisión la resistencia a la eritromicina.⁵⁷² Las cepas resistentes (CIM, > 256 µg/mL) no produjeron zonas alrededor del disco de eritromicina estándar, mientras que las sensibles (CIM, ≤ 0,06 µg/mL) produjeron zonas de por lo menos 42 mm. La estandarización de las pruebas de sensibilidad para estos microorganismos es necesaria para la investigación de nuevos antibióticos contra las bordetelas y puede ganar relevancia clínica si la resistencia a la eritromicina se extiende.

Las cepas de *B. parapertussis* son más resistentes a los antibióticos que *B. pertussis*. Como parte del Multicenter Pertussis Surveillance Project, se recogieron datos sobre sensibilidad a los antibióticos por dilución en agar de 46 cepas de *B. parapertussis* y 11 de *B. bronchiseptica*.⁷⁴⁰ Aunque las cepas de *B. parapertussis* fueron sensibles a eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina, la mayoría fueron resistentes a rifampicina y tetraciclina. La levofloxacina, la ciprofloxacina y la cefpirona, una cefalosporina de amplio espectro, son más activas contra *B. pertussis* que contra *B. parapertussis*.⁶⁰⁰ Entre los macrólidos, tanto la eritromicina como la azitromicina son activas contra *B. parapertussis* y el 90% de las cepas tienen CIM para eritromicina y azitromicina de 0,5 µg/mL y ≤ 0,06 µg/mL, respectivamente.^{596,828}

Las otras especies de *Bordetella* tienden a ser más resistentes a los antibióticos que *B. pertussis* o *B. parapertussis*. En el estudio multicéntrico, el 82% de las cepas de *B. bronchiseptica* fueron sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol y 27%, a ciprofloxacina; todas las cepas de *B. bronchiseptica* fueron resistentes a amoxicilina, eritromicina, rifampicina y tetraciclina.

na.⁷⁴⁰ Las cepas de *B. hinzii* fueron resistentes a ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefazolina, ceftriaxona, cefotaxima, cefuroxima, cefotetán, aztreonam, ciprofloxacina y tobramicina, y sensibles a cefalotina, cefatizidima, cefepima, imipenem, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, levofloxacina, gentamicina y amikacina.^{443,671} Las cepas de *B. holmesii* fueron sensibles a amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, tetraciclina, eritromicina, rifampicina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol, y resistentes a la penicilina.^{784,940,1257}

REFERENCIAS

1. Abu-Ekteih F, Kakish. Pneumonia as the sole presentation of brucellosis. *Respir Med* 2001;95:766-767.
2. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, et al. Invasive serotype A *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era. *Pediatrics* 2001;108: E18.
3. Ahmed K, Sein PP, Shahnawaz M, Hoosen AA. *Pasteurella gallinarum* neonatal meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:55-57.
4. Akdeniz H, Irmak H, Anlar O, Demiroz AP. Central nervous system brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment. *J Infect* 1998;36:297-301.
5. Akinci E, Gol MK, Balbay Y. A case of prosthetic mitral valve endocarditis caused by *Brucella abortus*. *Scand J Infect Dis* 2001;33:71-72.
6. Akova M, Uzun O, Akalin HE, et al. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;7:1831-1834.
7. Alanen A, Laurikainen E. Second-trimester abortion caused by *Capnocytophaga sputigena*: case report. *Am J Perinatol* 1999;16:181-183.
8. Alcalá L, García-Garrote F, Cercenado E, et al. Comparison of broth microdilution method using *Haemophilus* test medium and agar dilution method for susceptibility testing of *Eikenella corrodens*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2386-2388.
9. Al-Eissa YA, Assuhaimi SA, Al-Fawaz IM, et al. Pancytopenia in children with brucellosis: clinical manifestations and bone marrow findings. *Acta Haematol* 1993;89:132-136.
10. Al-Eissa YA, Kambal AM, Al-Nasser MN, et al. Childhood brucellosis: a study of 102 cases. *Pediatr Infect Dis* 1990;9:74-79.
11. Al-Eissa YA, Kambal AM, Alrabeeh AA, et al. Osteoarticular brucellosis in children. *Ann Rheum Dis* 1990;49:896-900.
12. Alfa MJ, DeGagne P. Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin. *Microb Pathog* 1997;22:39-46.
13. Alfa MJ, DeGagne P, Totten PA. *Haemophilus ducreyi* hemolysin acts as a contact cytotoxin and damages human foreskin fibroblasts in cell culture. *Infect Immun* 1996;64:2349-2352.
14. Alfa MJ, Stevens MK, DeGagne P, et al. Use of tissue culture and animal models to identify virulence-associated traits of *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* 1995;63:1754-1761.
15. Al Fadel Saleh M, Al-Madan MS, Erwa HH, et al. First case of human infection caused by *Pasteurella gallinarum* causing infective endocarditis in an adolescent 10 years after surgical correction for truncus arteriosus. *Pediatrics* 1995;95:944-948.
16. Al-Faran MF. *Brucella melitensis* endogenous endophthalmitis. *Ophthalmologica* 1990;201:19-22.
17. Al-Kharty TM. Neonatal brucellosis and blood transfusion: case report and review of the literature. *Ann Trop Paediatr* 2001;21:349-352.
18. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, et al. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1988;170:4603-4607.
19. Allen CA, Adams G, Ficht TA. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 1998;66:1008-1016.
20. Almeda FQ, Tenorio AR, Barkatullah S, et al. Infective endocarditis due to *Haemophilus aphrophilus* treated with levofloxacin. *Am J Med* 2002;113:702-704.
21. Alrawli AM, Chem KC, Cevallos V, et al. Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* ocular isolates. *Br J Ophthalmol* 2002;86:276-277.
22. Al-Shamahy HA, Wright SG. Enzyme-linked immunosorbent assay for brucella antigen detection in human sera. *J Med Microbiol* 1998;47:169-172.
23. Al-Tawfiq JA, Harezlak J, Katz BP, Spinola SM. Cumulative experience with *Haemophilus ducreyi* 35000 in the human model of experimental infection. *Sex Transm Dis* 2000;27:111-114.
24. Alvarez M, Patel C, Rey L, et al. Biliary tract infection caused by *Haemophilus parainfluenzae*. *Scand J Infect Dis* 1999;31:212-213.
25. Ambati BK, Ambati J, Azar N, et al. Periorbital and orbital cellulitis before and after the advent of *Haemophilus influenzae* type b vaccination. *Ophthalmology* 2000;107:1450-1453.
26. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2001;83:37-44.
27. Amir J, Yagupsky P. Invasive *Kingella kingae* infection associated with stomatitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:757-758.
28. Amrikachi M, Krihnan B, Finch CJ, Shahab I. Actinomycetes and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Actinomycetes-associated lymphadenopathy mimicking lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1502-1505.
29. Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis* 2001;7(3Suppl):575-582.
30. Andersen HK, Mortensen A. Unrecognized neurobrucellosis giving rise to *Brucella melitensis* peritonitis via a ventriculoperitoneal shunt. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:953-954.
31. Andersen JK, Pedersen M. Infective endocarditis with involvement of the tricuspid valve due to *Capnocytophaga canimorsus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:831-832.
32. Anderson B, Kelly C, Threlkel R, et al. Detection of *Rochalimaea henselae* in cat-scratch disease skin test antigens. *J Infect Dis* 1993;168:1034-1036.
33. Andercon B, Lu E, Jones D, et al. Characterization of a 17-kilodalton antigen of *Bartonella henselae* reactive with sera from patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:2358-2365.
34. Anderson B, Sims K, Regnery R, et al. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA specimens from cat scratch disease patient by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:942-948.
35. Andres MT, Manin MC, Fierro JF, Mendez FJ. Chorioamnionitis and neonatal septicemia caused by *Eikenella corrodens*. *J Infect* 2002;44:133-134.
36. Ang MS, Ngan CC. *Eikenella corrodens* discitis after spinal surgery: case report and literature review. *J Infect* 2002;45:272-274.
37. Angen O, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) haemolytica-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol* 2002;84:103-114.
38. Angen O, Mutters R, Caugant DA, et al. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalls* sp. nov., and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:67-86.
39. Angus BJ, Green ST, McKinley JJ, et al. *Eikenella corrodens* septicemia among drug injectors: a possible association with "licking wounds." *J Infect* 1994;28:102-103.
40. Anolik R, Berkowitz RJ, Campos JM, et al. *Actinobacillus* endocarditis associated with periodontal disease. *Clin Pediatr* 1981;20:653-655.
41. Anthony LSD, Morrissey PJ, Nano FE. Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN- γ -activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *J Immunol* 1992;148:1829-1834.
42. Aoyama T, Iwata T, Iwai Y, et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in young infants. *J Infect Dis* 1993;167:483-486.
43. Aoyama T, Kato T, Takeuchi Y, et al. Simple, speedy, sensitive, and specific serodiagnosis of pertussis by using a particle agglutination assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:1859-1861.
44. Aoyama T, Murase Y, Iwata T, et al. Comparison of blood-free (cyclodextrin solid medium) with Bordet-Gengou medium for clinical isolation of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1986;23:1046-1048.
45. Apisarnthanarak A, Johnson RM, Braverman AC, et al. *Cardiobacterium hominis* bioprosthetic valve endocarditis presenting as septic arthritis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:79-81.
46. Arana E, Vallcanera A, Santamaria JA, et al. *Eikenella corrodens* skull infection: a case report with review of the literature. *Surg Neurol* 1998;7:389-391.
47. Arashima Y, Kato K, Kakuta R, et al. First case of *Pasteurella gallinarum* isolation from blood of a patient with symptoms of acute gastroenteritis in Japan. *Clin Infect Dis* 1999;29:698-699.
48. Arias-Stella J, Lieberman PH, Erlandson RA, et al. Histology, immunocytochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *Am J Surg Pathol* 1986;10:595-610.
49. Arico B, Nuti S, Scarlato V, et al. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eucaryotic cell requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9204-9208.
50. Arico B, Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol* 1987;169:2847-2853.
51. Arisoy ES, Correa AG, Wagner ML, Kaplan S. Hepatosplenic cat-scratch disease in children: elected clinical features and treatment. *Clin Infect Dis* 1999;28:778-784.
52. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, et al. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:131-140.
53. Ariza J, Pigrau C, Canas C, et al. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis* 2001;32:1024-1033.
54. Ariza J, Servite O, Pallares R, et al. Characteristic cutaneous lesions in patient with brucellosis. *Arch Dermatol* 1989;125:330-333.
55. Arlet G, Sanson-Lo Pors M-J, Casin IM, et al. In vitro susceptibility of 96 *Capnocytophaga* strains, including a β -lactamase producer, to new β -lactam antibiotics and six quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1283-1284.
56. Armon R, Ruzal-Shapiro C, Salen E, et al. *Eikenella corrodens*: a rare pathogen in a polymicrobial hepatic abscess in an adolescent. *Clin Pediatr (Phila)* 1999;38:429-432.
57. Aronson NE, Zhick CJ. Dysgonic fermenter 3 bacteremia in a neutropenic patient with acute lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 1988;26:2213-2215.
58. Arslan H, Korkma ME, Kart H, Gul C. Management of *Brucella* endocarditis of a prosthetic valve. *J Infect* 1998;37:70-71.
59. Artman M, Frankl G. Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate splitting enzyme(s) of sheep and rabbit erythrocytes: their effect on the growth of *Haemophilus*. *Can J Microbiol* 1982;28:696-702.

50. Arvand M, Mielke MEA, Sterry K, Hahn H. Detection of specific cellular immune response to *Bartonella henselae* in a patient with cat scratch disease. *Clin Infect Dis* 1998;27:1633-1634.
51. Arvand M, Wendt C, Regnath T, et al. Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus-infected patient in Germany. *Clin Infect Dis* 1998;26:1296-1299.
52. Asensi V, Alvarez M, Carton JA, et al. Eikenella corrodens brain abscess after repeated periodontal manipulations cured with imipenem and neurosurgery. *J Infect* 2002;30:240-242.
53. Ashdown LR, Mottarelli IW. Acute painful cellulitis caused by a *Pasteurella pneumotropica*-like bacterium in Northern Queensland. *Med J Aust* 1990;152:333-334.
54. Ashburn-Smith C, Norton R, Thoreau, Peel MM. *Actinobacillus equuli* septicemia: an unusual zoonotic infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:2789-279.
55. Asikainen S, Chen C, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:65-68.
56. Assefa D, Dalitz E, Handrick W, et al. Septic cavernous sinus thrombosis following infection of ethmoidal and maxillary sinuses: a case report. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1994;29:249-255.
57. Astagneau P, Goldstein FW, Francoual S, et al. Appendicitis due to both *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Eur J Syst Bacteriol* 1992;11:559-560.
58. Austen GM, Levy CS, Smith MA. *Haemophilus parainfluenzae* as a rare cause of epidural abscess: case report and review. *Rev Infect Dis* 1993;13:609-612.
59. Avador B, Kletter Y, Abulafia S, et al. Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach. *J Clin Microbiol* 1997;35:1924-1930.
60. Avila-Campos MJ, Cavalho MAR, Zelanle F. Distribution of biotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:382-384.
61. Avlami A, Papalambrou C, Tzivra M, et al. Bone marrow infection caused by *Actinobacillus ureae* in a rheumatoid arthritis patient. *J Infect* 1997;35:298-299.
62. Aygen B, Sumerkan B, Dogany M, Schmen E. Prostatitis and hepatitis due to *Brucella melitensis*: a case report. *J Infect* 1998;36:111-112.
63. Aysha MH, Shayib MA. Pancytopenia and other haematological findings in brucellosis. *Scand J Haematol* 1986;36:335-338.
64. Bace A, Zrnec T, Begovac J, et al. Short-term treatment of pertussis with azithromycin in infants and young children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:296-298.
65. Baddour LM, Gelfand MS, Weaver RE, et al. CDC group HB-5 as a cause of genitourinary tract infection in adults. *J Clin Microbiol* 1989;27:801-805.
66. Baker CN, Hollis DG, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. *J Clin Microbiol* 1985;22:212-215.
67. Baker D, Stahlman GC. *Pasteurella multocida* infection in a patient with AIDS. *J Tenn Med Assoc* 1991;84:325-326.
68. Baldwin CJ, Panciera RJ, Monon RJ, et al. Acute tularemia in three domestic cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1602-1605.
69. Ballard RC, Ye H, Matta A, et al. Treatment of chancroid with azithromycin. *Int J STD AIDS* 1996;7(Suppl 1):9-12.
70. Bandi V, Apicella MA, Mason E, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2114-2119.
71. Bangsberg JM, Frederiksen W, Bruun B. Dysgonic fermenter 3-associated abscess in a diabetic patient. *J Infect* 1990;20:237-240.
72. Bannerjee TK, Grubb W, Otero C, et al. Musculocutaneous mononeuropathy complicating *Capnocytophaga canimorsus* infection. *Neurology* 1993;43:2411-2412.
73. Baquero F, Fernandez J, Dronda F, et al. Capnophilic and anaerobic bacteremia in neutropenic patients: an oral source. *Rev Infect Dis* 1990;12(Suppl 2):S157-S160.
74. Barbour ML, Crook DW, Mayon-White RT. An improved antiserum agar method for detecting carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:215-217.
75. Barenkamp SJ. Outer membrane proteins and lipopolysaccharides of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S181-S184.
76. Barenkamp SJ. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect Immun* 1996;64:1246-1251.
77. Barenkamp SJ, Lininger E. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of gene encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1992;60:1302-1313.
78. Barenkamp JS, St Geme JW III. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun* 1994;62:3320-3328.
79. Barenkamp SJ, St Geme JW III. Identification of surface-exposed B-cell epitopes on high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1996;64:3032-3037.
80. Barenkamp SJ, St Geme JW III. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 1996;19:1215-1223.
81. Barham WB, Church P, Brown JE, et al. Misidentification of *Brucella* species with use of rapid bacterial identification systems. *Clin Infect Dis* 1993;17:1068-1069.
82. Barka NE, Hadfield T, Patnaik M, et al. EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat scratch disease. *J Infect Dis* 1993;167:1503-1504.
83. Baron S, Njamkepo E, Grimprel E, et al. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:412-418.
84. Basaranoglu M, Mert A, Tabak F, et al. A case of cervical *Brucella* spondylitis with paravertebral abscess and neurological deficits. *Scand J Infect Dis* 1999;31:214-215.
85. Baskar B, Desai SP, Parsons MA. Postoperative endophthalmitis due to *Pasteurella multocida*. *Br J Ophthalmol* 1997;81:172-173.
86. Bass JW, Vincent JM, Person D. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr Infect Dis* 1997;16:2-10.
87. Bass JW, Vincent JM, Person D. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:163-179.
88. Bass JW, Wittler RR. Return of epidemic pertussis in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:343-345.
89. Batchelor BI, Brindle RJ, Gilks GF, et al. Biochemical misidentification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *J Hosp Infect* 1992;22:159-162.
90. Baucheron S, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Res Microbiol* 2002;153:277-280.
91. Baum M, Zamir O, Bergman-Rios R, et al. Comparative evaluation of microagglutination tests and serum agglutination tests as supplementary diagnostic methods for brucellosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:2166-2170.
92. Bauwens JE, Spach DH, Schacker W, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 1992;30:2474-2475.
93. Beales IL. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Pasteurella multocida* without animal exposure. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1110-1111.
94. Beier CL, Horn M, Michel R, et al. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales (α -proteobacteria) and to *Francisella tularensis* (γ -proteobacteria). *Appl Environ Microbiol* 2002;68:6043-6050.
95. Bekir NA, Gungor K, Namiduru M. *Brucella melitensis* dacryoadenitis: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2003;10:259-261.
96. Bell J, Grass S, Jeanteur D, Munson RS Jr. Diversity of the P2 protein among nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1994;62:2639-2643.
97. Bell JM, Turmidge JD, Pfaller MA, Jones RN. In vitro assessment of gatifloxacin spectrum and potency tested against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae* isolates from Asia-Western Pacific component of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-1999). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:315-318.
98. Bellido-Casado J, Perez-Castrillon JL, Bachuller-Luque P, et al. Report on five cases of tularemia pneumonia in a tularemia outbreak in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:218-220.
99. Benaoudia F, Escande F, Simonet M. Infection due to *Actinobacillus lignieresii* after a horse bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:439-440.
100. Benson RF, Lanier-Thacker W, Plikaytis BB, et al. Cross-reactions in *Legionella antiserum* with *Bordetella pertussis* strains. *J Clin Microbiol* 1987;25:594-596.
101. Bernal BP, Mehl R, Haaheim H, et al. Field detection of *Francisella tularensis*. *Scand J Infect Dis* 2000;32:287-291.
102. Berewill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:3159-3166.
103. Berger C, Altwegg M, Meyer A, Nadal D. Broad range polymerase chain reaction for diagnosis of rate-bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1181-1182.
104. Bergfors E, Trollfors B, Taranger J, et al. Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis* 1999;3:140-146.
105. Bergmans AMC, DeJong CMA, Van Amerongen G, et al. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997;35:2256-2261.
106. Bergmans AMC, Groothedde JW, Schellekens JFP, et al. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia felis* DNA with serology and skin tests. *J Infect Dis* 1995;171:916-923.
107. Bergmans AMC, Peeters MF, Schellekens JFP, et al. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997;35:1931-1937.
108. Bergmans AMC, Schellekens JFP, Van Embden JDA, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1996;34:254-260.
109. Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, et al. *Bartonella bovis* Bermond, et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:383-390.
110. Bermond D, Heller R, Barrat F, et al. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1973-1979.
111. Bernard K, Cooper C, Tessier S, Ewan EP. Use of chemotaxonomy as an aid to differentiate among *Capnocytophaga* species, CDC group DF-3, and aerotolerant strains of *Leptotrichia buccalis*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2263-2265.
112. Bernard K, Tessier S, Winstanley J, et al. Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement. *J Clin Microbiol* 1994;32:551-553.
113. Betriu C, Coronel F, Martin P, Picazo JJ. Peritonitis caused by *Haemophilus parainfluenzae* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1999;37:3074-3075.

124. Bevenger L, Maeland JA, Naess AI. Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. *J Clin Microbiol* 1988;26:433-437.
125. Bevenger L, Maeland JA, Naess AI. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43,000-molecular-weight *Francisella tularensis* outer membrane protein for the diagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 1989;27:922-926.
126. Bezwada HP, Nazarian DG, Booth RE Jr. *Haemophilus influenzae* infection complicating a total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 2002;402:202-205.
127. Bhatnagar N, Getachew E, Straley S, et al. Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. *J Infect Dis* 1994;170:841-847.
128. Biedenbach DJ, Jones RN. Evaluation of in vitro susceptibility testing criteria for gemifloxacin when tested against *Haemophilus influenzae* with reduced susceptibility to ciprofloxacin and ofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:232-236.
129. Biedenbach DJ, Jones RN, Pfaller MA. Activity of BM284756 against 2,681 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000) in Europe, Canada, and the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:245-250.
130. Bieger RC, Brewer NS, Washington JA. *Haemophilus aphrophilus*: a microbiologic and clinical review and report of 42 cases. *Medicine (Baltimore)* 1978;57:345-355.
131. Bigel ML, Berardi-Grassias LD, Furioli J. Isolation of *Actinobacillus ureae* (*Pasteurella ureae*) from a patient with otitis media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:206-207.
132. Bilgrami S, Bergstrom SK, Peterson DE, et al. Capnocytophaga bacteremia in a patient with Hodgkin's disease following bone marrow transplantation: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:1045-1049.
133. Birgisson H, Steingrimsdottir O, Gudnason T. Kingella kingae infections in paediatric patients: 5 cases of septic arthritis, osteomyelitis, and bacteraemia. *Scand J Infect Dis* 1997;29:495-498.
134. Birkebaek NH, Kristiansen M, Seefeldt T, et al. *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults. *Clin Infect Dis* 1999;29:1239-1242.
135. Birtles RJ. Differentiation of *Bartonella* species using restriction endonuclease analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Lett* 1995;129:261-266.
136. Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, et al. Proposals to unify the genera *Gramhamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species. *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylory* sp. nov., and *Bartonella doshae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:1-8.
137. Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:891-897.
138. Bisgaard KM, Kao A, Leake J, et al. *Haemophilus influenzae* invasive disease in the United States, 1994-1995: near disappearance of a vaccine-preventable childhood disease. *Emerg Infect Dis* 1998;4:229-237.
139. Bisgaard M, Helberg O, Frederiksen W. Isolation of *Pasteurella caballi* from an infected wound on a veterinary surgeon. *APMIS* 1991;99:291-294.
140. Bisgaard M, Mutters R. Characterization of some previously unclassified "Pasteurella" spp. obtained from the oral cavity of dog and cats and description of a new species tentatively classified with the family Pasteurellaceae Pohl 1981 and provisionally called taxon 16. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1986;94:177-184.
141. Black S. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(4 Suppl):S85-S89.
142. Blanche P, Sicard D, Meyniard O, et al. Capnocytophaga canimorsus lymphocytic meningitis in an immunocompetent man who was bitten by a dog. *Clin Infect Dis* 1994;18:654-655.
143. Block SL. Causative pathogens, antibiotic resistance and therapeutic considerations in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:449-456.
144. Blum RN, Berry CD, Phillips MG. Clinical illnesses associated with isolation of dysgonic fermenter 3 from stool samples. *J Clin Microbiol* 1992;30:396-400.
145. Blumer J. Clinical perspectives on sinusitis and otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:S68-S72.
146. Bobo RA, Newton EJ. A previously undescribed gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. *Am J Clin Pathol* 1976;65:564-569.
147. Boerlin P, Siegrist HH, Burnens AP, et al. Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a body. *J Clin Microbiol* 2000;38:1235-1237.
148. Bogaerts J, Kestens L, Manineze Tello W, et al. Failure of treatment for chancroid in Rwanda is not related to human immunodeficiency virus infection: in vitro resistance of *Haemophilus ducreyi* to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 1995;20:924-930.
149. Bogaerts J, LePage P, Kestelyn P, et al. Neonatal conjunctivitis caused by *Pasteurella ureae*. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:427-428.
150. Boegaert J, Verhaegen J, Tello WM, et al. Characterization, in vitro susceptibility, and clinical significance of CDC group HB-5 from Rwanda. *J Clin Microbiol* 1990;28:2196-2199.
151. Bolton RW, Kluever EA, Dyer JK. In vitro immunosuppression mediated by an extracellular polysaccharide from *Capnocytophaga ochracea*: influence on macrophages. *J Periodontol Res* 1985;20:251-259.
152. Bonnel M, Bonnet E, Alric L, et al. Severe knee arthritis due to *Eikenella corrodens* following a human bite. *Clin Infect Dis* 1997;24:80-81.
153. Boot E, Oosterhuis A, Thuis HC. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab Anim* 2002;36:200-208.
154. Borenstein W, Simon GL. *Haemophilus influenzae* septic arthritis in adults. *Medicine (Baltimore)* 1986;65:191-201.
155. Bovre K, Henriksen SD, Jonsson V. Correction of the specific epithet kingii in the combinations *Moraxella kingii* Henriksen and Bovre 1968 and *Pseudomonas kingii* Jonsson 1970 to kingae. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:307.
156. Brass EP, Wray LM, McDuff T. *Pasteurella ureae* meningitis associated with endocarditis: report of a case and review of the literature. *Eur Neurol* 1983;22:138-141.
157. Brazilian Purpuric Fever Study Group. Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. *Lancet* 1987;2:757-761.
158. Brazilian Purpuric Fever Study Group. *Haemophilus aegyptius* bacteremia in Brazilian purpuric fever. *Lancet* 1987;2:761-763.
159. Brazilian Purpuric Fever Study Group. Brazilian purpuric fever identified in a new region of Brazil. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S26-S19.
160. Breen D, Schonell A, Au T, Reiss-Levy E. *Pasteurella multocida*: a case report of bacteremic pneumonia and a 10-year laboratory review. *Pathology* 2000;12:152-153.
161. Breitschwerdt EB, Atkins CE, Brown TT, et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and related members of the α -subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. *J Clin Microbiol* 1999;37:618-626.
162. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animal: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:428-438.
163. Breitschwerdt EB, Kordick DL, Malarkey DE, et al. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *J Clin Microbiol* 1995;33:154-160.
164. Breitschwerdt EB, Sontakke S, Cannedy A, et al. Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Carolina beef herd. *J Clin Microbiol* 2001;39:879-882.
165. Brenner DJ, Hollis DG, Fanning R, et al. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol* 1989;27:231-235.
166. Brenner DJ, Hollis DG, Moss CW, et al. Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov., (formerly the cat-cratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J Clin Microbiol* 1991;29:2450-2460.
167. Brenner DJ, Mayer LW, Carlone GM, et al. Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol* 1988;26:1524-1514.
168. Brenner DJ, O'Connell SP, Winkler HH, et al. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the Family Bartonellaceae from the Order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:777-786.
169. Brentjens RJ, Ketterer M, Apicella MA, Spinola SM. Fine tangled pili expressed by *Haemophilus ducreyi* are a novel class of pili. *J Bacteriol* 1996;178:808-816.
170. Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, et al. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 2000;38:1258-1262.
171. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2660-2666.
172. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995;33:1640-1642.
173. Bricker BJ, Tabatabai LB, Judge BA, et al. Cloning expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Mn dismutase. *Infect Immun* 1990;58:2933-2939.
174. Brill CB, Pearlstein LS, Kaplan JM, Mancall EL. CNS infection caused by *Eikenella corrodens*. *Arch Neurol* 1982;39:431-432.
175. Brion JP, Recule C, Croize J, et al. Isolation of *Francisella tularensis* from lymph node aspirate inoculated into a non-radiometric blood culture system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:180-181.
176. Brissette CA, Five-Taylor PM. *Actinobacillus acrinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:137-142.
177. Brivet F, Guibert M, Banhelemy P, et al. *Pasteurella multocida* sepsis after hemorrhagic shock in a cirrhotic patient: possible role of endoscopic procedures and gastrointestinal translocation. *Clin Infect Dis* 1994;18:842-843.
178. Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, et al. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun* 1994;62:501-508.
179. Brook I. Bacteriology of acute and chronic frontal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:583-585.
180. Brouqui P, Houpikian P, DuPont HT, et al. Survey of the seroprevalence of *Bartonella quintana* in homeless people. *Clin Infect Dis* 1996;23:756-759.
181. Brouqui P, LaScola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med* 1999;340:184-189.
182. Broussard LA. Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism. *Mol Diagn* 2001;6:323-333.
183. Bruam G, Gousset N, Quentin R, Rosenau A. Fimbrial ghl gene cluster of genital strains of *Haemophilus* spp. *Infect Immun* 2002;70:5438-5445.
184. Bruneel F, D'estanque J, Fournier PE, et al. Isolated right-sided *Bartonella quintana* endocarditis in an immunocompetent adult. *Scand J Infect Dis* 1998;30:424-425.
185. Bruss JB, Malley R, Halpenn S, et al. Treatment of severe penicillin: a study of the safety and pharmacology of intravenous pertussis immunoglobulin. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:505-511.

186. Bruun B, Ying Y, Kirkegaard E, Fredaiken W. Phenotypic differentiation of *Cardiobacterium hominis*, *Kingella indologenes*, and CDC group EF-4. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:230-235.
187. Buck GE. Detection of *Bordetella pertussis* by rapid-cycle PCR and colorimetric microwell hybridization. *J Clin Microbiol* 1996;34:1355-1358.
188. Bullock DW, Deviu PG. Pancreatic abscess and septicemia caused by *Haemophilus segnis*. *J Infect* 1981;3:82-85.
189. Bundle DR, Chetwonogrodzky IW, Gidney JW, et al. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 1992;57:2829-2836.
190. Burns JL, Mendelman PM, Levy J, et al. A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:46-54.
191. Butt TS, Khan A, Ahmad A, et al. *Pasteurella multocida* infectious arthritis with acute gout after a cat bite. *J Rheumatol* 1997;24:1649-1652.
192. Buu-hoi AY, Joundy S, Acar JF. Endocarditis caused by *Capnocytophaga ochracea* J. *Clin Microbiol* 1988;26:1061-1062.
193. Byrd LH, Anama L, Gutkin M, et al. *Bordetella bronchiseptica* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1981;14:232-233.
194. Caldeira L, Dutschmann L, Carmo G, et al. Fatal *Pasteurella multocida* infection in a systemic lupus erythematosus patient. *Infection* 1993;21:254-255.
195. Campbell JD, Lagos R, Levine MM, Losonsky GA. Standard and alternative regimens of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (polyribosylribitol phosphate-tetanus toxoid conjugate vaccine) elicit comparable antibody avidities in infants. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:822-826.
196. Campos A, Taylor JH, Campbell M. Hamster bite peritonitis: *Pasteurella pneumotropica* peritonitis in a dialysis patient. *Pediatr Nephrol* 2000;15:31-32.
197. Caniza MA, Granger DL, Wilson KH, et al. *Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity. *Clin Infect Dis* 1995;20:1505-1511.
198. Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release 5'-guanosine monophosphate and adenosine by *Brucella abortus* and the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986;154:464-470.
199. Carbeck RB, Murphy JF, Britt EM. Streptobacillary rat-bite fever with massive pericardial effusion. *JAMA* 1967;201:133-134.
200. Carden SM, Colville DJ, Gonis G, Gilben GL. *Kingella kingae* endophthalmitis in an infant. *Austral NZ J Ophthalmol* 1991;19:217-220.
201. Carlone GM, Gorenkin L, Gheesling LL, et al. Potential virulence-associated factors in Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol* 1989;27:609-614.
202. Carlsson RM, Claesson BA, Fagerlund E, et al. Antibody persistence in five-year-old children who received a pentavalent combination vaccine in infancy. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:535-541.
203. Caron E, Gross A, Liautaud J-P, Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- α expression, active on human macrophage-like cells. *J Immunol* 1996;156:2885-2893.
204. Carpenter PD, Heppner BT, Gnan JW. DF-2 bacteremia following cat bites: report of two cases. *Am J Med* 1987;82:621-623.
205. Carter GR, Genus I. *Pasteurella* Trevisan 1887. 94AL. Nom. cons. Opin. 13. *Jud. Comm.* 1954;153. In: Kneg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:552-557.
206. Casanas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodriguez-Torres A, et al. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:127-131.
207. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP): Recommendations for use of *Haemophilus b* conjugate vaccines and a combined diphtheria-tetanus-pertussis and *Haemophilus b* vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42:RR-13.
208. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases. United States, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42:952-960.
209. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46(RR-7):1-25.
210. Centers for Disease Control and Prevention. Unlicensed use of combination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine and diphtheria and tetanus toxoid and acellular pertussis vaccine for infants. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998;47:787.
211. Centers for Disease Control and Prevention. Suspected brucellosis case prompts investigation of possible bioterrorism-related activity—New Hampshire and Massachusetts, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:509-512.
212. Centers for Disease Control and Prevention. Recommended childhood immunization schedule: United States, January-December, 2000. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. *Pediatrics* 2000;105:148-151.
213. Chadha V, Warady BA. *Capnocytophaga canimorsus* peritonitis in a pediatric peritoneal dialysis patient. *Pediatr Nephrol* 1999;13:646-648.
214. Chakraborty RN, Meigh RE, Kaye GC. *Kingella kingae* prosthetic valve endocarditis. *Indian Heart J* 1999;51:438-439.
215. Challapalli M, Covert RF. Infectious diseases casebook: *Pasteurella multocida* early onset septicemia in newborns. *J Perinatol* 1997;17:248-249.
216. Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, et al. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect immunofluorescence antibody assay: test development and application in an area of bartonellosis endemicity. *J Clin Microbiol* 2000;38:4269-4271.
217. Chambers GW, Westblom TU. Pleural infection caused by *Capnocytophaga canimorsus*, formerly CDC group DF-2. *Clin Infect Dis* 1992;15:325-326.
218. Chan PC, Lu CY, Lee PI, et al. *Haemophilus influenzae* type b meningitis with subdural effusion: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35:61-64.
219. Chan R, Hardiman RP. Endocarditis caused by *Brucella melitensis*. *Med J Aust* 1993;158:631-632.
220. Chang C-c, Chomel BB, Kasten RW, et al. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis* 2000;6:306-311.
221. Chang C-c, Chomel BB, Kasten RW, et al. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 2001;39:1221-1226.
222. Chang C-c, Hayashidani H, Pusterla N, et al. Investigation of *Bartonella* infection in ixodid ticks from California. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002;25:229-236.
223. Chang C-c, Kasten RW, Chomel BB, et al. Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. *J Clin Microbiol* 2000;38:4193-4200.
224. Chang C-c, Yamamoto , Chomel BB, et al. Seroepidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in California coyotes, 1994-1998. *Emerg Infect Dis* 1999;5:711-715.
225. Chang KC, Zakheim RM, Cho CT, et al. Post-traumatic purulent meningitis due to *Bordetella bronchiseptica*. *J Pediatr* 1975;86:639-640.
226. Chao C-L, Chang S-C, Sheu J-C, et al. Transdiaphragmatic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection: case report. *Clin Infect Dis* 1994;19:958-960.
227. Chapin-Robertson K, Dahlberg SE, Edberg SC. Clinical and laboratory analyses of cytosin-prepared gram stains for recovery and diagnosis of bacteria from sterile body fluids. *J Clin Microbiol* 1992;30:377-380.
228. Chen C. Distribution of a newly described species, *Kingella oralis*, in the human oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:425-427.
229. Chen C, Ashimoto A. Clonal diversity of oral *Eikenella corrodens* within individual subjects by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:1837-1839.
230. Chen C-KC, Potts TV, Wilson ME. A homologies shared among *Eikenella corrodens* isolates and other corroding bacilli from the oral cavity. *J Periodontol Res* 1990;25:106-112.
231. Chen C-KC, Sunday GJ, Zambon JJ, Wilson ME. Restriction endonuclease analysis of *Eikenella corrodens*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1265-1270.
232. Chen RV, Bradley IS. *Haemophilus parainfluenzae* sepsis in a very low birth weight premature infant: a case report and review of the literature. *J Perinatol* 1999;19:315-317.
233. Chen S, Hicks L, Yuen M, et al. Serological cross-reaction between *Legionella* spp. and *Capnocytophaga ochracea* by using latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1994;32:3054-3055.
234. Chen Y-C, Chang S-C, Luh K-T, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis: a report of four cases and review of the literature. *Q J Med* 1991;81:871-878.
235. Cherry JD. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: at analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:S90-S96.
236. Cherry JD. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):S107-S111.
237. Cherry JD. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):S112-S117.
238. Cherry JD, Beer T, Chutrand SA, et al. Comparison of values of antibody to *Bordetella pertussis* antigens in young German and American men. *Clin Infect Dis* 1995;20:1271-1274.
239. Chia JKS, Nakata MN, Lami JLM, et al. Azithromycin for the treatment of cat-scratch disease. *Clin Infect Dis* 1998;26:193-194.
240. Childs IE, Rooney JA, Cooper JL, et al. Epidemiologic observations on infection with *Rochalimaea* species among cats living in Baltimore, Md. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:1775-1778.
241. Chirgwin K, DeHovitz JA, Dillon S, McCormack WM. HIV infection, genital ulcer disease, and crack cocaine use among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *Amer J Public Health* 1991;81:1576-1579.
242. Chodosh J. Cat's tooth keratitis: human corneal infection with *Capnocytophaga canimorsus*. *Cornea* 2001;20:661-663.
243. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, et al. *Bartonella henselae* in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 1995;33:2445-2450.
244. Chomel BB, Boulouis HJ, Petersen H, et al. Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. *Vet Res* 2002;33:205-213.
245. Chomel BB, DeBess EE, Mangiamale DM, et al. Changing trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973-1992: a shift toward foodborne transmission. *J Infect Dis* 1994;70:1216-1223.
246. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 1996;4:1952-1956.
247. Chomel BB, MacDonald KA, Kasten RW, et al. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3548-3554.
248. Choy KW, Wulffraat NM, Wolfs TF, et al. *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection in a child after bone marrow transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:481-483.
249. Christen RD. *Cardiobacterium hominis* endocarditis in a patient with a hypersensitivity reaction to penicillin. Successful treatment with partial resection of the posterior mitral valve leaflet and antibiotic therapy with cefazolin. *Infection* 1990;18:291-293.

250. Christensen H, Bisgaard M, Angen O, Olsen JE. Final classification of Bisgaard taxon 9 as *Actinobacillus arthritidis* sp. nov. and recognition of a novel genome species for equine strains of *Actinobacillus lignieresii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1239-1246.
251. Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE. Reclassification of equine isolates previously reported as *Actinobacillus equuli*, variants of *A. equuli*, *Actinobacillus suis* or Bisgaard taxon 11 and proposal of *A. equuli* subsp. *equuli* subsp. nov., and *A. equuli* subsp. *haemolyticus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1569-1576.
252. Christensen JJ, Kirkegaard E, Korner B. *Haemophilus* isolated from unusual anatomical sites. *Scand J Infect Dis* 1990;22:437-444.
253. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eilzen MM Jr. Biological warfare: a historical perspective. *JAMA* 1997;278:412-417.
254. Chuba PJ, Bock R, Grafi G, et al. Comparison of 16S RNA sequences from the Family Pasteurellaceae: phylogenetic relatedness by cluster analysis. *J Gen Microbiol* 1988;134:1923-1930.
255. Chui L, Albritton W, Paster B, et al. Development of the polymerase chain reaction for diagnosis of chancroid. *J Clin Microbiol* 1993;31:659-664.
256. Church S, Harrigan KE, Irving AE, Peel MM. Endocarditis caused by *Pasteurella coballi* in a horse. *Aust Vet J* 1998;76:528-530.
257. Cianlar M, Spratt DA, Newman HN, Wilson M. Capnocytophaga granulosa and Capnocytophaga haemolytica: novel species in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 2001;28:701-705.
258. Clairmont GJ, Zon LI, Groopman JE. *Haemophilus parainfluenzae* prostatitis in a homosexual man with chronic lymphadenopathy and HTLV-III infection. *Am J Med* 1987;82:175-178.
259. Clamidge IE III, Raich TJ, Pirwani D, et al. Strategy to detect and identify Bartonella species in routine clinical laboratory yields Bartonella strain from his cat. *J Clin Microbiol* 1995;33:2107-2113.
260. Clarridge JE III, Raich TJ, Sjöstedt A, et al. Characterization of two unusual clinically significant Francisella strains. *J Clin Microbiol* 1996;34:1995-2000.
261. Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, et al. Phenotypic and molecular characterization of a Brucella strain isolated from a mink whale (Balaenoptera acutorostrata). *Microbiology* 1999;144:3267-3273.
262. Cloeckaert A, Grayson M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of Brucella spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:835-839.
263. Cloeckaert A, Verger JM, Grayson M, et al. Classification of Brucella spp. isolated from marine animals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 2001;3:729-738.
264. Cockerell CJ, LeBoit PE. Bacillary angiomatosis: a newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:501-512.
265. Coggin JH Jr. Bacterial pathogens. In: Fleming DO, Hunt DL, eds. *Biological Safety: Principles and Practices*. 3rd Ed. Washington, DC: ASM Press. 2000;65-88.
266. Cohn SE, Knorr KL, Gilligan PH, et al. Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:411-413.
267. Cokca F, Azap A, Meco O. Bilateral mammary abscess due to Brucella melitensis. *Scand J Infect Dis* 1999;31:318-319.
268. Cokca F, Meco O, Arasil E, et al. An intramedullary dermoid cyst abscess due to Brucella abortus biotype 3 at T1-L2 spinal levels. *Infection* 1994;22:359-360.
269. Colebunders R, Vael C, Blot K, et al. *Bordetella pertussis* as a cause of chronic respiratory infection in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:313-315.
270. Collazos J, Diaz F, Ayarza R, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a cause of pulmonary-valve endocarditis of 18 month's duration with unusual manifestations. *Clin Infect Dis* 1994;18:115-116.
271. Collins IK, Kelly MT. Comparison of Phadeback coagglutination, Bactigen latex agglutination, and counterimmunoelectrophoresis for detection of *Haemophilus influenzae* type b antigens in spinal fluid. *J Clin Microbiol* 1983;17:1005-1008.
272. Coll-Vinent B, Suris X, Lopez-Soto A, et al. *Haemophilus aphrophilus* endocarditis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1995;20:1381-1383.
273. Colmenero JD, Queipo-Ortuno MI, Maria Reguera J, et al. Chronic hepatosplenic abscesses in brucellosis: clinicotherapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:159-167.
274. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, et al. Complications associated with Brucella melitensis infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)* 1996;75:195-211.
275. Colson P, LaScola B, Champsaur P. Vertebral infections caused by *Haemophilus aphrophilus*: case report and review. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:107-113.
276. Colson P, LeBrun L, Drancourt M, et al. Multiple recurrent bacillary angiomatosis due to Bartonella quintana in an HIV-infected patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:178-179.
277. Comer JA, Flynn C, Regnery RL, et al. Antibodies to Bartonella species in inner-city intravenous drug users in Baltimore Md. *Arch Intern Med* 1996;156:2491-2495.
278. Cook PP. Persistent postoperative wound infection with *Pasteurella multocida*: case report and literature review. *Infection* 1995;23:252.
279. Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, et al. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1989;57:2223-2229.
280. Cookson BT, Vandamme P, Carlson C, et al. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol* 1994;32:2569-2571.
281. Cooper CL, Van Caeseele P, Canvin J, Nicolle LE. Chronic prosthetic device infection with *Francisella tularensis*. *Clin Infect Dis* 1999;29:1589-1591.
282. Corbel MJ. Identification of dye-sensitive strains of Brucella melitensis. *J Clin Microbiol* 1991;29:1066-1068.
283. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3:213-221.
284. Corbel MJ. Recent advances in brucellosis. *J Med Microbiol* 1997;6:101-103.
285. Corboz L, Ossent P, Gruber H. Isolation and characterization of group EF-4 bacteria from various lesions in cat, dog, and badger. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993;279:140-145.
286. Costas M, Owen RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of Streptobacillus moniliformis strains from human, murine, and avian infection. *J Med Microbiol* 1987;23:393-311.
287. Courtney SE, Hall RT. *Haemophilus influenzae* sepsis in the premature infant. *Am J Dis Child* 1978;132:1039-1040.
288. Cox RA, Slack MP. Clinical and microbiological features of *Haemophilus influenzae* vulvovaginitis in young girls. *J Clin Pathol* 2002;55:961-964.
289. Craig-Mylus KA, Weiss AA. Antibacterial agents and release of periplasmic pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1383-1386.
290. Cross JT, Davidson KW, Bradsher RW Jr. *Haemophilus influenzae* epididymo-orchitis and bacteremia in a man infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1994;19:768-769.
291. Cross JT, Jacob RF. Tularemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone. *Clin Infect Dis* 1993;17:976-980.
292. Cuadrado-Gomez LM, Arranz-Caso JA, Cuadros-Gonzalez J, Albarran-Hernandez F. *Pasteurella pneumotropica* pneumonia in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;21:445-446.
293. Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, et al. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun* 1994;62:639-643.
294. Cunningham BB, Paller AS, Katz BZ. Rat bite fever in a pet lover. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:330-332.
295. Currie PF, Codispoti M, Mankad PS, Goodman MJ. Late aortic homograft valve endocarditis caused by *Cardiobacterium hominis*: a case report and review of the literature. *Heart* 2000;83:579-581.
296. Cutter D, Mason KW, Howell AP, et al. Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. *J Infect Dis* 2002;186:1115-1121.
297. DaCosta M, Guillou J-P, Garin-Bastuji B, et al. Specificity of six genes sequences for the detection of the genus Brucella by DNA amplification. *J Appl Bacteriol* 1996;81:267-275.
298. Dallon MJ, Robinson LE, Cooper J, et al. Use of Bartonella antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch Intern Med* 1995;155:1670-1676.
299. Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. Rochalimaea elizabethae sp. nov., isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1993;31:872-881.
300. Daneshvar MI, Hollis DG, Moss CW. Chemical characterization of clinical isolates which are similar to CDC group DF-3 bacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29:2351-2353.
301. Das I, DeGiovanni JV, Gray J. Endocarditis caused by *Haemophilus parainfluenzae* identified by 16S ribosomal RNA sequencing. *J Clin Pathol* 1997;50:72-74.
302. Dauga C, Miras I, Grimont PAD. Identification of Bartonella henselae and B. quintana 16S rDNA sequences by branch-, genus-, and species-specific amplification. *J Med Microbiol* 1996;45:192-199.
303. Daum RS, Murphy-Corb M, Shapira E, et al. Epidemiology of ROB-1 β -lactamase among ampicillin-resistant Haemophilus influenzae isolates in the United States. *J Infect Dis* 1988;157:450-455.
304. Davies RL, Pater BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:736-744.
305. Decker MD. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(Suppl 11): S10-S18.
306. Decker MD, Edwards KM. *Haemophilus influenzae* type b vaccines history, comparisons, and choices. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:S113-S116.
307. Decker MD, Graham BS, Hunter EB, Liebowitz SM. Endocarditis and infections of intravascular devices due to Eikenella corrodens. *Am J Med Sci* 1986;292:209-212.
308. Dees SB, Karr DE, Hollis D. Cellular fatty acids of Capnocytophaga species. *J Clin Microbiol* 1982;16:779-783.
309. Dehio C, Lanz C, Pohl R, et al. Bartonella schoenbuchii sp. nov., isolate from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1557-1565.
310. De La Fuente A, Sanchez JR, Uriz J, et al. Infection of a pacemaker by Brucella melitensis. *Tex Heart Inst J* 1997;24:129-130.
311. De La Puente-Redondo VA, Del Blanco NG, Gutierrez-Martin CB, et al. Comparison of different PCR approaches for typing of Francisella tularensis strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:1016-1022.
312. De La Rosa GR, Barnett BJ, Ericsson CD, Turk JB. Native valve endocarditis due to Bartonella henselae in a middle-aged human immunodeficiency virus-negative woman. *J Clin Microbiol* 2001;39:3417-3419.
313. DeLey JW, Mannheim W, Mulders R, et al. Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistron of the Pasteurellaceae. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:126-137.
314. De Ley J, Segers P, Kersters K, et al. Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella ribosomal* ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, Alcaligenaceae. *Int J Syst Bacteriol* 1986;26:405-414.
315. Del Vecchio VG, Kapatal V, Elzer P, et al. The genome of Brucella melitensis. *Vet Microbiol* 2002;90:587-592.

316. Del Vecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:443-448.
317. DeMara TF, Murwin DM, Leake ER. Immunization with outer membrane protein P6 from nonlyseable *Haemophilus influenzae* induces bactericidal anti-body and affords protection in the chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* 1996;64:5187-5192.
318. De Melker HE, Versteegh FGA, Conyn-van Spaendonck MAE, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:800-806.
319. Demetrios P, Constantine B, Demetrios S, Nikolaos A. *Haemophilus influenzae* pyelonephritis in the elderly. *Urol Nephrol* 2002;34:23-24.
320. Demirkan F, Akalin HE, Simsek H, et al. Spontaneous peritonitis due to *Brucella melitensis* in a patient with cirrhosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:66-67.
321. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001;285:2763-2773.
322. Depres-Brummer P, Buijs J, van Engelenburg KC, Osten HR. *Capnocytophaga canimorsus* sepsis presenting as an acute abdomen in an asplenic patient. *Neth J Med* 2001;59:213-217.
323. Dechpande LM, Jones RN. Antimicrobial activity of advanced-spectrum fluoroquinolones tested against more than 2000 contemporary bacterial isolates of species causing community-acquired respiratory tract infections in the United States (1999). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:139-142.
324. De Smet MD, Chan CC, Nussenblatt RB, et al. *Capnocytophaga canimorsus* as the cause of a chronic corneal infection. *Am J Ophthalmol* 1990;109:240-242.
325. Deulofeu F, Nava JM, Bella F, et al. Prospective epidemiological study of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:633-638.
326. Dever LL, Shashikumar K, Johanson WG Jr. Antibiotics in the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:911-925.
327. Deville JG, Cherry JD, Christenson PD, et al. Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis* 1995;21:639-642.
328. Dewhirst FE, Chen C-K, Paster BJ, Zambon JJ. Phylogeny of species in the Family Neisseriaceae isolated from human dental plaque and description of *Kingella orale* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:490-499.
329. Dewhirst FE, Paster BJ, Bright PL. *Chromobacterium Eikenella Kingella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, and *Vitreoscilla* species comprise a major branch of the β -group Proteobacteria by 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparison: transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to the family Neisseriaceae (emend.). *Int J Syst Bacteriol* 1990;39:258-266.
330. Dewhirst FE, Paster BJ, La Fontaine S, et al. Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.; transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the γ -division of Proteobacteria on the basis of 16S rRNA sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:426-433.
331. Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, et al. Phylogeny of 54 representative strains of species in the Family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* 1992;174:2002-2013.
332. Dewire P, McGrath BE, Brass C. *Haemophilus aphrophilus* osteomyelitis after dental prophylaxis; a case report. *Clin Orthop* 1999;363:196-202.
333. Dijkman BAC, Thomeer RTWN, Vielvoe GJ, et al. Brain abscess due to *Streptobacillus moniliformis* and *Actinobacillus meyeri*. *Infection* 1984;12:262-264.
334. Di Mario A, Sica S, Zini G, et al. Microangiopathic hemolytic anemia and severe thrombocytopenia in *Brucella* infection. *Ann Hematol* 1995;70:59-61.
335. Dimmitt SB, Christiamsem K, Newman M. *Haemophilus paraphrophilus*: an unusual cause of endocarditis. *Aust NZ J Med* 1994;24:581.
336. Dobrea V, Opris A, Daraban S. An epidemiological and surveillance overview of brucellosis in Romania. *Vet Microbiol* 2002;90:157-163.
337. Dobson SRM, Kroll JS, Moxon ER. Insertion sequence IS1016 and absence of *Haemophilus* capsulation genes in the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *Infect Immun* 1992;60:618-622.
338. Dockrell DH, Poland GA, Sleckelberg JM, et al. Immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type b protein conjugate vaccines in HIV seropositive adults and analysis of predictors of vaccine response. *Vaccine* 1999;17:2779-2785.
339. Dodman T, Robson J, Pincus D. *Kingella kingae* infections in children. *J Paediatr Child Health* 2000;36:87-90.
340. Doebbeling BN, Feilmeier ML, Herwaldt LA. Pertussis in an adult man infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1990;161:1296-1298.
341. Derm GV, Chapin KC. Laboratory identification of *Haemophilus influenzae*: effect of basal media on the results of the satellitism test and evaluation of the Rapid NH system. *J Clin Microbiol* 1984;20:599-601.
342. Doern GV, Jones RN, Pfäler MA, et al. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:385-389.
343. Dogan B, Asikainen S, Jousimies-Sommer H. Evaluation of two commercial kits and arbitrarily primed PCR for identification and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus* and *Haemophilus paraphrophilus*. *J Clin Microbiol* 1999;37:742-747.
344. Dogan B, Saarela MH, Jousimies-Somer H, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e-biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:98-103.
345. Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, et al. Syndrome of *Rochalimaea henselae* suggesting cat scratch disease. *Ann Intern Med* 1993;118:331-336.
346. Dolan SA, Dommaraju CB, DeGuzman GB. Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1998;26:764-765.
347. Donnio PY, Allardet-Servent A, Perrin M, et al. Characterization of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J Med Microbiol* 1999;48:125-131.
348. Dorittke C, Vandamme P, Hinz KH, et al. Isolation of a *Bordetella avium*-like organism from a human specimen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:451-454.
349. Dougherty MJ, Spach DH, Larson AM, et al. Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 1996;34:2444-2447.
350. Douglas E, Coote JG, Parton R, et al. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J Mol Microbiol* 1993;38:140-144.
351. Douglas W, Lundy MD, Kehl DiY. Increasing prevalence of *Kingella kingae* in osteoarticular infections in young children. *J Pediatr Orthop* 1998;18:22-267.
352. Douvier S, Neuwirth C, Filipuzi M, Kisterman J-P. Chorioamnionitis with intact membranes caused by *Capnocytophaga sputigena*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:109-112.
353. Drancourt M, Birtles R, Chaumontin G, et al. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 1996;347:441-443.
354. Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, et al. *Bartonella* (Rochalimaea) *henselae* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med* 1995;332:419-421.
355. Drancourt M, Moal V, Brunet P, et al. *Bartonella* (Rochalimaea) *quintana* infection in a seronegative hemodialyzed patient. *J Clin Microbiol* 1996;34:1158-1160.
356. Drapkin MS, Wilson ME, Shrager SM, et al. Bacteremic *Haemophilus influenzae* type b cellulitis in the adult. *Am J Med* 1977;63:449-452.
357. Droz S, Chi H, Horn E, et al. *Bartonella kochlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* 1999;37:1117-1122.
358. Duim B, Vogel L, Puijck W, et al. Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1996;64:4673-4679.
359. Dul MJ, Shlaes DM, Lerner PI. EF-4 bacteremia in a patient with hepatic-carcinoid. *J Clin Microbiol* 1983;18:1260-1261.
360. Duong M, Bescancenot JF, Neuwirth C, et al. Vertebral osteomyelitis due to *Capnocytophaga* species in immunocompetent patients: report of two cases and review. *Clin Infect Dis* 1996;22:1099-1101.
361. Durmaz G, Us T, Aydinli A, et al. Optimum detection times for bacteria and yeast species with the BACTEC 9120 aerobic blood culture system: evaluation for a 5-year period in a Turkish university hospital. *J Clin Microbiol* 2003;41:819-821.
362. Dworkin MS, Sullivan PS, Buskin SE, et al. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patient. *Clin Infect Dis* 1999;28:1095-1099.
363. Ebinger M, Niehlerlein T, Schumacher UK, et al. Isolation of *Capnocytophaga granulosa* from an abscess in an immunocompetent adolescent. *Clin Infect Dis* 2000;30:606-607.
364. Edwards KM, Decker MD, Graham BS, et al. Immunization of adults with acellular pertussis vaccine. *JAMA* 1993;269:53-56.
365. Edwards KM, Meade BD, Decker MD, et al. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serological response. *Pediatric* 1995;96:548-557.
366. Edwards R, Finch RG. Characterization and antibiotic susceptibilities of *Streptobacillus moniliformis*. *J Med Microbiol* 1986;21:39-42.
367. Ehrhart H-U, Gubler J, Harbath S, Hirschel B. *Capnocytophaga canimorsus* sepsis complicated by myocardial infarction in two patients with normal coronary arteries. *Clin Infect Dis* 1996;23:335-336.
368. Eigelsbach HT, McGann VG. Genus *Francisella* Dorofeev 1947m, 176^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams J Wilkins, 1984:394-399.
369. Ejertsen T, Gahrn-Hansen B, Sogaard P, et al. *Pasteurella aerogenes* isolated from ulcers or wounds in humans with occupational exposure to pigs: a report of 7 Danish cases. *Scand J Infect Dis* 1996;28:567-570.
370. Elkinc C. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* 1995;63:1241-1245.
371. Ellis BA, Regnery RL, Beati L, et al. Rats of the genus *Rattus* as reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease? *J Infect Dis* 1999;180:220-224.
372. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:631-646.
373. Elrazek MA. *Brucella* optic neuritis. *Arch Intern Med* 1991;151:776-778.
374. Elster AD, Macrone AB, Kasser IR. Osteomyelitis caused by *Capnocytophaga ochracea*. *J Pediatr Orthop* 1983;3:613-615.
375. Emanuel PA, Bell R, Dang JL, et al. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J Clin Microbiol* 2003;41:689-693.
376. Emmett L, Allman KC. *Eikenella corrodens* vertebral osteomyelitis. *Clin Nucl Med* 2000;25:1059-1069.
377. Enck RE, Bennett JM. Isolation of *Haemophilus aphrophilus* from an adult with acute leukemia. *J Clin Microbiol* 1976;4:194-195.

378. Endara SA, Roati AA, Alizzi AM, et al. Aortic valve endocarditis caused by *Bartonella henselae*: a rare surgical entity. *Heart Surg Forum* 2001;4:359-360.
379. Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, et al. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis* 1994;19:42-47.
380. English CK, Wear DJ, Margileth AM, et al. Cat-scratch disease: isolation and culture of the bacterial agent. *JAMA* 1988;259:1347-1352.
381. Ericsson M, Sandstrom G, Sjostedt A, et al. Persistence of cell-mediated immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J Infect Dis* 1994;170:110-114.
382. Eriksen N, Lemming L, Hojlyng N, Bruun B. Brucellosis in immigrants in Denmark. *Scand J Infect Dis* 2002;34:540-542.
383. Ertem M, Kurekci AE, Aysev D, et al. Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:225-226.
384. Erwin AL, Munford RS, Brazilian Purpuric Fever Study Group. Comparison of lipopolysaccharides from Brazilian purpuric fever isolates and conjunctivitis isolates of *Haemophilus influenzae* biogroup *Aegyptius*. *J Clin Microbiol* 1989;27:762-767.
385. Escande F, Bailly A, Bone S, Lemozy J. *Actinobacillus suis* infection after a pig bite. *Lancet* 1996;348:888.
386. Escande F, Grimont F, Grimont PAD, et al. Deoxyribonucleic acid relatedness among strains of *Actinobacillus* spp. and *Pasteurella ureae*. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:309-315.
387. Escande F, Vallee E, Aubart F. *Pasteurella caballi* infection following a horse bite. *Zentralbl Bakteriol* 1997;285:440-444.
388. Esteban J, Albalade M, Caramelo C, et al. Peritonitis involving a *Capnocytophaga* species in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:2471-2472.
389. Esteve V, Porcheret H, Clerc D, et al. Septic arthritis due to *Kingella kingae* in an adult. *Joint Bone Spine* 2001;68:85-86.
390. Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains. 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 2000;38:3085-3086.
391. Fainstein V, Luna MA, Bodey GP. Endocarditis due to *Eikenella corrodens* in a patient with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 1981;48:40-42.
392. Fajfar-Whetstone CJ, Coleman L, Biggs DR, Fox BC. *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *J Clin Microbiol* 1995;33:202-204.
393. Fakih MG, Murphy TF, Pattoli MA, Berenson CS. Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1997;65:1695-1700.
394. Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2382-2386.
395. Falla TJ, Dobson SRM, Crook DWM, et al. Population-based study of non-typeable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonate. *Lancet* 1993;341:851-854.
396. Farfel Z, Konen S, Wiertz E, et al. Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase are produced in man during pertussis infection and after vaccination. *J Med Microbiol* 1990;32:173-177.
397. Farley MM, Stephens DS, Kaplan SI, et al. Pilus- and non-pilus-mediated interactions of *Haemophilus influenzae* type b with human erythrocytes and human nasopharyngeal mucosa. *J Infect Dis* 1990;161:274-280.
398. Farlow J, Smith KL, Wong J, et al. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3186-3192.
399. Faro S, Walker C, Pierson RL. Amnionitis with intact amniotic membranes involving *Streptobacillus moniliformis*. *Obstet Gynecol* 1980;55(Suppl):9S-11S.
400. Feldman JD, Kontaxis EN, Sherman MP. Congenital bacteremia due to *Capnocytophaga*. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:415-416.
401. Feldman WE, Schwartz J. *Haemophilus influenzae* type b brain abscess complicating meningitis: a case report. *Pediatrics* 1983;72:473-475.
402. Fellows L, Boivin M, Kapusta M. *Pasteurella multocida* arthritis of the shoulder associated with postsurgical lymphedema. *J Rheumatol* 1996;23:1824-1825.
403. Felmingham D, Gruneberg RN. Alexander Project Group. The Alexander Project 1996-1997: late susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:191-203.
404. Fenichel S, Bodino C, Kocka F. Isolation of *Acrinobacillus actinomycetemcomitans* from a skin lesion. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:428-429.
405. Ferber B, Bruckheimer E, Schlesinger Y, et al. *Kingella kingae* endocarditis in a child with hair-cartilage hypoplasia. *Pediatr Cardiol* 1997;18:445-446.
406. Fernandez-Esparrach G, Mascaro J, Rota R, et al. Septicemia peritonitis, and empyema due to *Pasteurella multocida* in a cirrhotic patient. *Clin Infect Dis* 1994;18:486.
407. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1989;57:3281-3291.
408. Fink DL, Green BA, St Geme JW III. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun* 2002;70:4902-4907.
409. Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, et al. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J Med Entomol* 2002;39:915-919.
410. Finlay FO, Witherow H, Rudd PT. Latex agglutination testing in bacterial meningitis. *Arch Dis Child* 1995;73:160-163.
411. Finn M, Dale B, Isles C. Beware of the dog! A syndrome resembling thrombotic thrombocytopenic purpura associated with *Capnocytophaga canimorsus* septicemia. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1839-1840.
412. Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2000;38:2005-2006.
413. Fischer LJ, Weyant RS, White EH, Quinn FD. Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. *Infect Immun* 1995;63:3483-3490.
414. Fiher RG, Benjamin DK Jr. Facial cellulitis in childhood: a changing spectrum. *South Med J* 2002;95:672-674.
415. Fiemmig TF, Rudiger S, Hofman U, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J Clin Microbiol* 33:3102-3105, 1995.
416. Fiesher SA, Bottone EJ. *Eikenella corrodens* cellulitis and arthritis of the knee. *J Clin Microbiol* 1989;27:2606-2608.
417. Fordham JN, McKay-Ferguson E, Davies A, et al. Rat bite fever without the bite. *Ann Rheum Dis* 1992;51:411-412.
418. Forsman M, Sandstrom G, Jaurin B. Identification of *Francisella* species and discrimination of type a and type B strains of *F. tularensis* by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:949-955.
419. Forsman M, Sandstrom G, Sjostedt A. Analysis of 16S DNA sequence of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:38-46.
420. Fortier AH, Leiby DA, Narayanan RB, et al. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect Immun* 1995;63:1478-1483.
421. Fortier AH, Slayter MV, Ziemba R, et al. Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: infection and immunity in mice. *Infect Immun* 1999;59:2922-2928.
422. Foster G, Jahans KL, Reid RJ, Ross HM. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals, and an otter. *Vel Res* 1996;138:583-586.
423. Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, et al. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol* 2002;90:563-580.
424. Foster G, Rosh HM, Malnick H, et al. *Actinobacillus delphinicola* sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* Pohl (1979) 1981 isolated from sea mammals. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:648-652.
425. Foster G, Ross HM, Malnick H, et al. *Phococobacter uteri* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* Pohl (1979) 1981 isolated from a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:135-139.
426. Foster G, Ross HM, Patterson IA, et al. *Actinobacillus scotiae* sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* Pohl (1979) 1981 isolated from porpoise (*Phocaena phocoena*). *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:929-933.
427. Foucault C, Barrau K, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* bacteremia among homeless people. *Clin Infect Dis* 2002;35:684-689.
428. Fournier PE, Bernabeu L, Schuben B, et al. Isolation of *Francisella tularensis* by centrifugation of shell vial cell culture from an inoculation eschar. *J Clin Microbiol* 1998;36:2782-2783.
429. Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:245-251.
430. Foweraker JE, Hawkey PM, Heritage J, et al. Novel β -lactamase from *Capnocytophaga* sp. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1501-1504.
431. Fox KF, Fox A, Nagpal M, et al. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J Clin Microbiol* 1998;36:3217-3222.
432. Francioli PB, Foussianos D, Glauser MP. *Cardiobacterium hominis* endocarditis manifesting as bacterial meningitis. *Arch Intern Med* 1983;143:1483-1484.
433. Frandsen EVG, Reinholdt J, Kjeldsen M, et al. In vivo cleavage of immunoglobulin A 1 by immunoglobulin A 1 proteases from *Prevotella* and *Capnocytophaga* species. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:291-296.
434. Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA* 1997;278:399-411.
435. Frazier IP, Cleary TG, Pickering LK. Meningitis due to *Haemophilus parainfluenzae*: report of three cases and review of the literature. *Pediatr Infect Dis* 1981;1:117-119.
436. Frebourg NB, Benhelot G, Hocq R, et al. Septicemia due to *Pasteurella pneumotropica*: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J Clin Microbiol* 2002;40:687-689.
437. Frederiksen W, Tonning B. Possible misidentification of *Haemophilus aphrophilus* as *Pasteurella gallinarum*. *Clin Infect Dis* 2001;32:987-989.
438. Friedl J, Stift A, Berlakovich GA, et al. *Haemophilus parainfluenzae* liver abscess after successful liver transplantation. 1998;36:818-819.
439. Friedman RL, Paulaitis S, McMillan JW. Development of a rapid diagnostic test for pertussis: direct detection of pertussis toxin in respiratory secretions. *J Clin Microbiol* 1989;27:2466-2470.
440. Friesen CA, Cho CT. Characteristic features of neonatal sepsis due to *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 1986;8:777-780.
441. Friis-Moller A. A new *Actinobacillus* species from the human respiratory tract. *Actinobacillus hominis* nov. sp. In: Kilian M, Frederiksen W, Bibertin EL, eds. *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*. London, Academic Press, 1981:151-160.
442. Friis-Moller A, Christensen JJ, Fussing V, et al. Clinical significance and taxonomy of *Actinobacillus hominis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:930-935.
443. Funke G, Hess T, Von Graevenitz A, Vandamme P. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 1996;34:966-969.

444. Gadberry JL, Zipper R, Taylor JA, et al. *Pasteurella pneumotropica* isolated from bone and joint infections. *J Clin Microbiol* 1984;19:926-927.
445. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Benito N, et al. *Bordetella pertussis*: a "new" opportunistic pathogen to think about. *J Infect* 2000;40:298-299.
446. Galle C, Streulens M, Liesner C, et al. *Brucella melitensis* osteitis following craniotomy in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1997;24:1012.
447. Gan VN, Murphy TV. Pertussis in hospitalized children. *Am J Dis Child* 1990;144:1130-1134.
448. Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martine-Romero E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 2001;39:235-240.
449. Garcia FU, Wojla J, Hoover RL. Interactions between live *Bartonella bacilliformis* and endothelial cells. *J Infect Dis* 1992;165:1138-1141.
450. Garcia del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2964-2972.
451. Garcia-Rodriguez JA, Baquero E, Garcia de Lomas J, et al. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Infection* 1999;27:265-267.
452. Garcia San Miguel L, Quereda C, Martinez M, et al. *Bordetella bronchiseptica* cavitary pneumonia in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:675-676.
453. Garin-Bastuji B, Bowden RA, Dubray G, Limet JN. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella biovars* related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 1990;28:2169-2174.
454. Garpenholdt O, Hugosson S, Fredlund H, et al. Epiglottitis in Sweden before and after introduction of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:490-493.
455. Garrity GM, Holt JG, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the roadmap to the manual. New York: Bergey's Manual Trust/Springer, 2000.
456. Gasquet S, Maun M, Brouqui P, et al. Bacillary angiomatosis in immunocompromised patients. *AIDS* 1998;12:1793-1803.
457. Gazi MI, Cox SW, Clark DT, Eley BM. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Treponema denticola*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:240-248.
458. Genne D, Siegrist HH, Monnier P, et al. *Pasteurella multocida* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 1996;28:95-97.
459. Georgilis K, Kontoyannis S, Prifti H, Petrocheilou-Paschou V. *Haemophilus influenzae* type b endocarditis in a woman with mitral valve prolapse. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:115-116.
460. Gerber JE, Johnson JE, Scott MA, Madhusudhan KT. Fatal meningitis and encephalitis due to *Bartonella henselae* bacteria. *J Forensic Sci* 2002;47:640-644.
461. Ghez D, Bernard L, Bayou E, et al. *Bartonella henselae* infection mimicking a splenic lymphoma. *Scand J Infect Dis* 2001;33:935-936.
462. Giladi M, Avidor B, Kletter Y, et al. Cat scratch disease: the role of *Afipia felis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2499-2502.
463. Gill V, Cunha BA. Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect* 1997;12:61-67.
464. Gill VJ, Travis LB, Williams DY. Clinical and microbiological observations on CDC group DF-3, a gram-negative coccobacillus. *J Clin Microbiol* 1991;29:1589-1592.
465. Gilsdorf JR, Chang HY, McCrea KW, et al. Comparison of hemagglutinating pili of type b and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1): 1589-1592.
466. Gilsdorf JR, McCrea KW, Marrs CF. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun* 1997;65:2997-300.
467. Glare EM, Paton JC, Premier RR, et al. Analysis of a repetitive DNA Sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:1982-1987.
468. Glaser DB. Angular blepharitis caused by gram-negative bacillus DF-2. *Am J Ophthalmol* 1986;102:119-120.
469. Glaus T, Greene R, Hofmann-Lehmann C, et al. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997;35:2883-2885.
470. Glickman M, Klein RS. Acute epiglottitis due to *Pasteurella multocida* in an adult without animal exposure. *Emerg Infect Dis* 1997;3:408-409.
471. Gmur R, McNabb H, van Steenbergen TJM, et al. Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8(2):116-120, 19.
472. Godfroid I, Kabohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the 21st century. *Vet Microbiol* 2002;90:135-145.
473. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, et al. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection in both human and bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2141-2145.
474. Goldbaum FA, Velikovskiy CA, Baldi P, et al. The 18-kDa cytoplasmic protein of *Brucella* species—an antigen useful in diagnosis—is a lumazine synthase. *J Med Microbiol* 1999;48:833-839.
475. Goldstein DA, Mounstn L, Friedlander S, et al. Acute endogenous endophthalmitis due to *Bartonella henselae*. *Clin Infect Dis* 2001;33:718-721.
476. Goldstein EJC, Citron DM. Comparative activities of cefuroxime, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin, enoxacin, and ofloxacin against aerobic and anaerobic bacteria isolated from bite wound. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1143-1148.
477. Goldstein EJC, Citron DM. Comparative susceptibilities of 173 aerobic and anaerobic bite wound isolates to sparfloxacin, temafloxacin, clarithromycin, and older agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1150-1153.
478. Goldstein EJC, Citron DM, Gerardo SH, et al. Activities of HMR 3004 (RU 64004) and HMR 3647 (RU 66647) compared to those of erythromycin, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, and eight other antimicrobial agents against unusual aerobic and anaerobic human and animal bite pathogens isolated from skin and soft tissue infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;42:1127-1132.
479. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV. Linezolid activity compared to those of selected macrolide and other agents against aerobic and anaerobic pathogens isolated from soft tissue bite infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1469-1474.
480. Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, et al. Activity of gatifloxacin compared to those of five other quinolones versus aerobic and anaerobic isolates from skin and soft tissue samples of human and animal bite wound infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1475-1479.
481. Goldstein EJC, Sutter VL, Finegold SM. Susceptibility of *Eikenella corrodens* to ten cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:639-641.
482. Golnik KC, Marotto ME, Fanous MM, et al. Ophthalmic manifestation of *Rochalimaea* species. *Am J Ophthalmol* 1994;118:145-151.
483. Gomez L, Graziutti M, Sumoza D, et al. Bacterial pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 1998;26:1002-1003.
484. Gomez-Gates J-L, Alos J-I, Sanchez J, et al. Bacteremia by multidrug-resistant *Capnocytophaga sputigena*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1067-1069.
485. Goncalves Da Costa PS, Gomes CA, Pinheiro Cangussu I, et al. *Pasteurella multocida* splenic abscess causing fever of unknown origin: report of one case. *Braz J Infect Dis* 1999;3:238-242.
486. Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:105-110.
487. Gonin P, Lorange M, Delage G. Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:1-4.
488. Gonzalez MH, Garst J, Nourbakhsh P, et al. Abscesses of the upper extremity from drug abuse by injection. *J Hand Surg Am* 1993;18:868-870.
489. Goral S, Anderson B, Hager C, et al. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA by polymerase chain reaction from suppurative nodes of children with cat scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:994-997.
490. Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, et al. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis: the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 1986;153:122-125.
491. Gousset N, Rosenau A, Sizaret P-Y, Quentin R. Nucleotide sequences of genes coding for fimbrial proteins in a cryptic genospecies of *Haemophilus* spp. isolated from neonatal and genital tract infections. *Infect Immun* 1999;67:8-15.
492. Gradus MS, Ng C, Pries R, et al. An unsuspected case of brucellosis mimicking appendicitis in a child. *Clin Microbiol Newslett* 1988;10:188-190.
493. Grahquist L, Enksson M. Pertussis and necrotizing enterocolitis in a previously healthy neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:698-699.
494. Grando D, Sullivan LJ, Fiexman JP, et al. *Bartonella henselae* associated with Parinaud's oculoglandular syndrome. *Clin Infect Dis* 1999;28:1156-1158.
495. Grasso RJ, West LA, Holbrook NJ, et al. Increased sensitivity of a new coagglutination test for rapid identification of *Haemophilus influenzae* type b. *J Clin Microbiol* 1981;13:1122-1124.
496. Gratten M. *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J Clin Microbiol* 1983;13:1015-1016.
497. Graves MH, Janda JM. Rat-bite fever (Streptobacillus moniliformis): a potential emerging disease. *Int J Infect Dis* 2001;5:151-155.
498. Gray CG, Cowley SC, Cheung KK, Nano E. The identification of five genetic loci of *Francisella tularensis* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215:53-56.
499. Greene BT, Ramsey KM, Nolan PE. *Pasteurella multocida* meningitis: case report and review of the last 11 years. *Scand J Infect Dis* 2002;34:213-217.
500. Greene JN, Sandin RL, Villanueva L, Sinnott JT. *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis in a patient with mitral valve prolapse. *Ann Clin Lab Sci* 1993;23:203-206.
501. Gregory RL, Kim DE, Kindel JC, et al. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol Res* 1992;27:176-183.
502. Gruner E, Bernasconi E, Galeazzi L, et al. Brucellosis: an occupational hazard for medical laboratory personnel: report of five cases. *Infection* 1994;22:33-36.
503. Grunow R, Spletstoesser W, McDonald S, et al. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:86-90.
504. Gu K, Bainbridge B, Darveau RP, Page RC. Antigenic components of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide recognized by sera from patient with localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:150-157.
505. Gu X-X, Rossau R, Jannes G, et al. The rrs (16S)-rrl (23S) ribosomal intergenic spacer region as a target for the detection of *Haemophilus ducreyi* by a heminested-PCR assay. *Microbiology* 1998;144:1013-1019.
506. Gu X-X, Sun J, Jin S, et al. Detoxified lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to proteins confers protection against otitis media in chinchillas. *Infect Immun* 1997;65:4488-4493.

507. Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol* 1995;33:2002-2006.
508. Gueitler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:207-216.
509. Guiso N, Grimprel E, Anjak I, et al. Western blot analysis of antibody responses of young infants to pertussis infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:506-600.
510. Gump DW, Holden RA. Endocarditis caused by a new species of *Pasteurella*. *Ann Intern Med* 1972;76:275-278.
511. Gurfield AN, Boulouis H-J, Chomel BB, et al. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cast. *J Clin Microbiol* 1997;35:2120-2123.
512. Gurycova D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol* 1998;14:797-802.
513. Gustafsson B, Askelof P. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Clin Microbiol* 1988;26:2077-2082.
514. Gustafsson B, Lindquist U, Andersson M. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1988;26:188-193.
515. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, et al. A controlled trial of a two-component acellular a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 1996;334:349-355.
516. Gustke CJ. A review of localized juvenile periodontitis (LJP). I. Clinical features, epidemiology, etiology, and pathogenesis. *Gen Dent* 1998;46:491-497.
517. Gustke CJ. A review of localized juvenile periodontitis (LJP). II. Clinical trials and treatment guidelines. *Gen Dent* 1998;46:580-587.
518. Guyot A, Bakhai A, Fry N, et al. Culture-positive *Bartonella quinana* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:145-147.
519. Habeeb YK, Al-Najdi AK, Sadek SA, Al-Onazi E. Pediatric neurobrucellosis; case report and literature review. *J Infect* 1998;7:59-62.
520. Hadfield TL, Warren R, Kass M, et al. Endocarditis caused by *Rochalimaea henselae*. *Hum Pathol* 2001;24:1140-1141.
521. Hadjinkolaou L, Triposkiadi F, Zains M, et al. Successful management of *Brucella melitensis* endocarditis with combined medical and surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:806-810.
522. Hadley S, Albrecht MA, Tarsy D. Cat-scratch encephalopathy: a cause of status epilepticus and coma in a healthy young adult. *Neurology* 1995;45:196.
523. Hagelskjaer L, Sorensen I, Randers E. Streptobacillus moniliformis infection: 2 cases and a literature review. *Scand J Infect Dis* 1998;30:309-311.
524. Hallander HO. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):S99-S106.
525. Hallander HO, Reizenstein E, Renemar B, et al. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:50-52.
526. Hallander HO, Storsaeter J, Mollby R. Evaluation of serology and nasopharyngeal cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. *J Infect Dis* 1991;163:1046-1054.
527. Halperin SA, Bortolussi R, Kasina A, et al. Use of a Chinese hamster ovary cell cytotoxicity assay for the rapid diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1990;28:32-38.
528. Halperin SA, Bortolussi R, Wort J. Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1989;27:752-757.
529. Halperin SA, King J, Law B, et al. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae*-tetanus toxoid conjugate vaccine given separately or in combination with a three-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated poliovirus vaccine for the first four doses. *Clin Infect Dis* 1999;28:995-1001.
530. Halperin SA, Marrie TJ. Pertussis encephalopathy in a adult: case report and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:1043-1047.
531. Hamamoto Y, Soejima Y, Ogasawara M, et al. Necrotizing fasciitis due o *Pasteurella multocida* infection. *Dermatology* 1995;190:145-147.
532. Hamed KA, Dormitzer PR, Su Ci, et al. *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis: application of a molecular approach for identification of pathogenic bacterial species. *Clin Infect Dis*. 1994;19:677-683.
533. Hammerberg O, Cregson DB, Gopal D, et al. Recurrent cervical and submandibular lymphadenitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin Infect Dis* 1998;17:1077-1078.
534. Han N, Hoover CI, Winkler JR, et al. Identification of genomic clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1991;29:1574-1578.
535. Handley SA, Regnery RL. Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3010-3015.
536. Hannah P, Greenwood JR. Isolation and rapid identification of *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol* 1982;7:39-43.
537. Hanner TL, Allen JW, Robertson-Byer A, Hurley SL. Characterization of eugonic fermenter group EF-4 by polyacrylamide gel electrophoresis and protein immunoblot analysis. *Am J Vet Res* 1991;52:1065-1068.
538. Hansen LM, Blanchard PC, Hirsch DC. Distribution of tet(H) among *Pasteurella isolates* from the United States and Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1558-1560.
539. Hara H, Ochiai T, Morishima T, et al. *Pasteurella canis* osteomyelitis and cutaneous abscess after a domestic dog bite. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(5 Suppl):S151-S152.
540. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:912-922.
541. Harrison LH, deSilva GA, Pittman M, et al. Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol* 1989;27:599-604.
542. Hartley JW, Martin ED, Gothard WP, et al. Fulminant *Capnocytophaga canimorsus* (DF-2) septicemia and diffuse intravascular coagulation in hairy cell leukemia with splenectomy. *J Infect* 1994;29:229-230.
543. Hassan IJ, Hayek L. Endocarditis caused by *Kingella denitrificans*. *J Infect* 1993;27:291-295.
544. Haubek D, Dinenzo JM, Tinoco EM, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* 1997;35:3037-3042.
545. He Q, Mertsola J, Himanen JP, et al. Evaluation of pooled and individual components of *Bordetella pertussis* as antigens in an enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:690-695.
546. He T, Nishihara T, Demuth Dr, Ishikawa I. A novel insertion sequence increases the expression of leukotoxicity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J Periodontol* 1999;70:1261-1268.
547. Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: a review of efficacy data. *Pediatr Infect Dis J* 1999;17:S117-S122.
548. Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, et al. Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:300-305.
549. Heath TC, Hewitt MC, Jalaludin B, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in elderly nursing home residents: two related cases. *Emerg Infect Dis* 1997;3:179-182.
550. Hedegaard J, Okkels H, Bruun B, et al. Phylogeny of the genus *Haemophilus* as determined by comparison of partial *infB* sequences. *Microbiology* 2001;147:2599-2609.
551. Heidemann DG, Pflugfelder SC, Kronish J, et al. Necrotizing keratitis caused by *Capnocytophaga ochracea*. *Am J Ophthalmol* 1988;105:655-660.
552. Heiner AM, DiSario JA, Carroll K, et al. Dysgonic fermenter-3: a bacterium associated with diarrhea in immunocompromised host. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1629-1630.
553. Heininger U, Stehr K, Schmitt-Grohe S, et al. Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:306-309.
554. Heiro M, Nikoskelainen J, Engblom E, Kotilainen P. *Eikenella corrodens* prosthetic valve endocarditis in a patient with ulcerative colitis. *Scand J Infect Dis* 2000;32:324-325.
555. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR Jr, et al. Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxic damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* 1994;2:173-177.
556. Heller R, Artoiz M, Xemar V, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol* 1997;35:1327-1331.
557. Heller R, Kubina M, Mariet P, et al. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:283-288.
558. Heller R, Riegel P, Hansmann Y, et al. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1333-1339.
559. Helberg O, Busch HE, Bremmelgaard A, et al. The cultivation and rapid enzyme identification of DF-2. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:241-243.
560. Hemady R, Zimmerman A, Katzen BW, Karesh JW. Orbital cellulitis caused by *Eikenella corrodens*. *Am J Ophthalmol* 1992;114:584-588.
561. Hendolin PH, Karkkainen U, Himi T, et al. High incidence of *Alloicoccus otitis* in otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:860-865.
562. Henriksen SD, Bovre K. Transfer of *Moraxella kingae* Henriksen and Bovre to the genus *Kingella* gen. nov. in the family Neisseriaceae. *Int J Syst Bacteriol* 1976;26:447-450.
563. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Env Microbiol* 1992;58:2099-2101.
564. Hewlett EL. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(4 Suppl):S78-S84.
565. Hewlett EL. A commentary on the pathogenesis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):S94-S98.
566. Heymann WR, Drezner D. Submandibular abscess caused by *Eikenella corrodens*. *Cutis* 1997;60:101-102.
567. Hicklin H, Verghese A, Alvarez S. Dysgonic fermenter 2 septicemia. *Rev Infect Dis* 1987;9:884-890.
568. Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, et al. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:310-318.
569. High NJ, Jennings MP, Moxon ER. Tandem repeats of the tetramer 5'-CAAT-3' present in *lic2A* are required for phase variation but not lipopolysaccharide biosynthesis in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 1995;20:165-174.
570. Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia* (*Pasteurella*) haemolytica. *Front Biosci* 2001;6:D1128-D1150.
571. Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, et al. Inactivation of *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation in virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* 2000;68:3916-3922.
572. Hill BC, Baker CN, Tenover FC. A simplified method for testing *Bordetella pertussis* for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2000;38:1151-1155.

573. Hill SL, Mitchell JL, Stockley RA, Wilson R. The role of *Haemophilus parainfluenzae* in COPD. *Chest* 2000;117(Suppl 1):293S.
574. Hille TJ, Sethi S, Murphy TF. Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. *J Infect Dis* 2002;185:627-631.
575. Hjelm E, McGill S, Blomqvist G. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae*, and *B. quintana* in Swedish domestic cats. *Scand J Infect Dis* 2002;34:192-196.
576. Hoberman A, Marchant CD, Kaplan SL, Feldman S. Treatment of acute otitis media: consensus recommendations. *Clin Pediatr (Phila)* 2002;41:373-390.
577. Hockman DE, Pence CD, Whittler RR, Smith LE. Septic arthritis of the hip secondary to rat-bite fever: a case report. *Clin Orthop* 2000;380:173-176.
578. Hodder SL, Cherry JD, Mortimer EA Jr, et al. Antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens and clinical correlations in elderly community residents. *Clin Infect Dis* 2000;31:7-14.
579. Hoel T, Scheel O, Nordahl SHG, et al. Water- and airborne *Francisella tularensis* biovar palaeartica isolated from human blood. *Infection* 1991;19:348-350.
580. Hoffman ME, Sorri EM, Barza M. *Pasteurella multocida* endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1987;71:609-610.
581. Hofstad T, Olsen I, Eribe ER, et al. *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei*, sp. nov., and organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:2189-2195.
582. Hoiseith SK, Corn PG, Anders J. Amplification status of capsule genes in *Haemophilus influenzae* type b clinical isolates. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S114.
583. Hoiseith SK, Moxon ER, Silver RP. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1106-1110.
584. Holley HP. Successful treatment of cat-scratch disease with ciprofloxacin. *JAMA* 1991;265:1563-1565.
585. Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *Novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol* 1989;27:1601-1608.
586. Hollis DG, Wiggins GL, Weaver RE. An unclassified gram-negative rod isolated from the pharynx on Thayer-Martin medium (selective agar). *Appl Microbiol* 1972;24:772-777.
587. Holmberg M, McGill S, Ehrenborg C, et al. Evaluation of human seroreactivity to *Bartonella* species in Sweden. *J Clin Microbiol* 1999;37:1381-1384.
588. Holmes AH, Greenough TC, Balady GJ, et al. *Bartonella henselae* endocarditis in an immunocompetent adult. *Clin Infect Dis* 1995;21:1004-1007.
589. Holmes B, Popoff M, Kiredjian M, et al. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov., from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:406-416.
590. Holmes RL, Kozinn WP. Pneumonia and bacteremia associated with *Haemophilus influenzae* serotype d. *J Clin Microbiol* 1983;18:730-732.
591. Holroyd KJ, Reiner AP, Dick JD. *Streptobacillus moniliformis* polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis: an urban case of rat-bite fever. *Am J Med* 1988;85:711-714.
592. Holst E, Roloff J, Larson L, Nielsen JP, et al. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J Clin Microbiol* 1992;30:2984-2987.
593. Holt SC, Leadbetter ER, Socransky SS. *Capnocytophaga*: a new genus of gram-negative gliding bacteria: II. Morphology and ultrastructure. *Arch Microbiol* 1979;122:17-27.
594. Honberg PZ, Fredricksen W. Isolation of *Pasteurella multocida* in a patient with spontaneous bacterial peritonitis and liver cirrhosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1986;5:340-342.
595. Hoppe JE. Update on respiratory infection caused by *Bordetella parapertussis*. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:375-381.
596. Hoppe JE, Bryskier A. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to two ketolides (HMR 3004 and HMR 3647) four macrolides (azithromycin, clarithromycin, erythromycin A and roxithromycin), and two ansamycins (rifampin and rifapentine). *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:965-966.
597. Hoppe JE, Dalhoff A, Pfrunder D. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to BAY 12-8039, trovafloxacin, and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1868.
598. Hoppe JE, Halm U, Hagedorn HJ, Krammer-Hagedorn A. Comparison of erythromycin ethylsuccinate and cotrimoxazole for treatment of pertussis. *Infection* 1989;17:227-231.
599. Hoppe JE, Paulus T. Comparison of three media for agar dilution testing of *Bordetella pertussis* using six antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:391-393.
600. Hoppe JE, Rahimi-Galougahi E, Seibert G. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to four fluoroquinolones (levofloxacin, ofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin), cefpirome, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:807-808.
601. Hoppe JE, Schlagenhauf M. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar. *J Clin Microbiol* 1989;27:2115-2117.
602. Hoppe JE, Schwaderer J. Comparison of four charcoal media for the isolation of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1984;27:1097-1098.
603. Hoppe JE, Simon CG. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to seven fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2287-2288.
604. Host H, Schumacher H, Prag J, Arpi M. Isolation of *Kingella kingae* from synovial fluids using four commercial blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:608-611.
605. Houpiakian P, Fournier PE, Raoult D. Phylogenetic position of *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* based on 16S rRNA and *gltA* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:179-182.
606. Hovenga S, Tulleken JE, Moller LVM, et al. Dog-bite induced sepsis: a report of four cases. *Intensive Care Med* 1997;23:1179-1180.
607. Howard AW, Viskomas D, Sabbagh C. Reduction in osteomyelitis and septic arthritis related to *Haemophilus influenzae* type b vaccination. *J Pediatr Orthop* 1999;19:705-709.
608. Howell JM, Woodward GR. Precipitous hypotension in the emergency department caused by *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. sepsis. *Am J Emerg Med* 1990;8:312-314.
609. Hoyle SL, Antony S. *Eikenella corrodens*: an unusual cause of severe parapneumonic infection and empyema in immunocompetent patients. *J Natl Med Assoc* 2001;93:224-229.
610. Hritz M, Fisher E, Demuth DR. Differential regulation of the leukotoxin operon in highly leukotoxic and minimally leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1996;64:2724-2729.
611. Huh Y, Rose S, Schoen R, et al. Colonic bacillary angiomatosis. *Ann Intern Med* 1996;124:735-737.
612. Hulzebos CV, Koets HA, Kimpen JLL, Wolfs TFW. Vertebral osteomyelitis associated with cat-scratch disease. *Clin Infect Dis* 1999;28:1310-1312.
613. Hunt Gerardo S, Citron DM, Claros MC, et al. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *Pasteurella multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity. *J Clin Microbiol* 2001;39:2558-2564.
614. Hussain S, Singh N. Pyomyositis associated with bacillary angiomatosis in a patient with HIV infection. *Infection* 2002;30:50-53.
615. Hutcheson KA, Maghalon M. Periorbital abscess and cellulitis from *Pasteurella multocida* in a healthy child. *Am J Ophthalmol* 1999;128:514-515.
616. Hwang JJ, Lal YJ, Hu BS, et al. *Haemophilus parainfluenzae* and *Fusobacterium necrophorum* liver abscess: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35:65-67.
617. Ikaheimo I, Syrjala H, Karhukorpi J, et al. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2000;40:287-290.
618. Inoue T, Ohta H, Kokeguchi S, et al. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett* 1990;57:13-17.
619. Ip M, Teo JG, Cheng AF. Waterhouse-Friderichsen syndrome complicating primary biliary sepsis due to *Pasteurella multocida* in a patient with cirrhosis. *J Clin Pathol* 1995;48:775-777.
620. Irono K, Grimont F, Casin I, rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* strains associated with Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol* 1988;26:1535-1538.
621. Ives TJ, Manzwitsch P, Regnery RL, et al. In vitro susceptibilities of *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, and *R. prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:578-582.
622. Ives TJ, Maron EL, Regnery RL, et al. In vitro susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:305-310.
623. Jackson LA, Cherry ID, Wang S-P, Grayston IT. Frequency of serological evidence of *Bordetella* infections and mixed infections with other respiratory pathogens in university students with cough illness. *Clin Infect Dis* 2000;31:3-6.
624. Jacobs RF, Condrey YM, Yamauchi T. Tularemia in adults and children: a changing presentation. *Pediatrics* 1985;76:818-822.
625. Jacobs RF, Schute GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis* 1998;26:80-84.
626. Jahans KL, Foster G, Broughm ES. The characteristics of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 1997;57:373-382.
627. James EA, Hill J, Uppal R, Prencis MB. *Bartonella* infection: a significant cause of native valve endocarditis necessitating surgical management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:171-172.
628. Janda WM, Bradna JJ, Ruther P. Identification of *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., and other fastidious gram-negative bacteria with the MicroScan *Haemophilus-Neisseria* identification panel. *J Clin Microbiol* 1989;27:869-873.
629. Janda WM, Malloy PJ, Schreckenberger PC. Clinical evaluation of the Vitek *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol* 1987;25:37-41.
630. Janda WM, Santos E, Stevens J, et al. Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from a blood culture. *J Clin Microbiol* 1994;32:2851-2853.
631. Jantzen E, Bernal BP, Omland T. Cellular fatty acid composition of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 1979;10:928-930.
632. Jansen DL, Gray GC, Putnam SD, et al. Evaluation of pertussis infection among U.S. Marine Corps trainees. *Clin Infect Dis* 1997;25:1099-1107.
633. Jellicoe PA, Cohan A, Campbell P. *Haemophilus parainfluenzae* complicating total hip arthroplasty: a rapid failure. *J Arthroplasty* 2002;17:114-116.
634. Jenny DB, Leandre PW, Iverson G. Endocarditis caused by *Kingella indologenes*. *Rev Infect Dis* 1987;9:787-788.

635. Jensen AE, Cheville NF, Thoen CO, et al. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J Vet Diagn Invest* 1999;11:152-157.
636. Jensen KT, Seifonheyder H, Thomsen VF. In vitro activity of β -lactam and other antimicrobial agents against *Kingella kingae*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:635-640.
637. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, et al. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-sep PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:1717-1722.
638. Jeppson KG, Reimer LG. *Eikenella corrodens* chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 1991;78:503-505.
639. Jepson PD, Brew S, MacMillan AP, et al. Antibodies to *Brucella* in marine animals around the coasts of England and Wales. *Vet Rec* 1997;141:513-515.
640. Jimenez-Lucho V, Shulman M, Johnson J. *Bordetella bronchiseptica* in an AIDS patient cross-reacts with *Legionella antisera*. *J Clin Microbiol* 1994;32:3095-3096.
641. Joblet C, Roux V, Drancourt M, et al. Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995;33:1879-1883.
642. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, et al. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:22-26.
643. Johansson A, Berglund L, Golhefors L, et al. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:449-453.
644. Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, et al. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 2000;35:85-92.
645. Johansson A, Goransson I, Larsson P, Sjostedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J Clin Microbiol* 2001;39:314U-3146.
646. Johansson A, Ibrahim A, Goransson I, et al. Evaluation of PCR-based methods for dissemination of *Francisella* species and subspecies and development of specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4180-4185.
647. Johansson A, Urlich SK, Chu MC, et al. In vitro susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:327-330.
648. Johnson SR, Martin DH, Cammarata C, et al. Development of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemophilus ducreyi*. *Sex Transm Dis* 1994;21:13-23.
649. Jones ME, Karlowky JA, Blosser-Middleton R, et al. Apparent plateau in β -lactamase production among clinical isolate of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in the United States: results from the LIBRA surveillance initiative. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:119-123.
650. Jones RN, Slepak J, Bigelow J. Ampicillin-resistant *Haemophilus paraphrophilus* laryngo-epiglottitis. *J Clin Microbiol* 1976;4:405-407.
651. Jordens JZ, Leaves NI, Anderson EC, et al. Polymerase chain reaction-based strain characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2981-2987.
652. Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. *J Clin Microbiol* 1990;28:985-988.
653. Jorgensen JH, Redding JD, Maher LA, et al. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1987;25:2105-2113.
654. Joseph A, Lobo DN, Gardner ID, Ifitkhar SY. *Eikenella corrodens* liver abscess complicated by endophthalmitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:709-711.
655. Joshi N, O'Bryan T, Appelbaum PC. Pleuropulmonary infections caused by *Eikenella corrodens*. *Rev Infect Dis* 1991;13:207-212.
656. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon, Bourg C, et al. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998;27:99-106.
657. Junhui Z, Ruifu Y, Jianchun L, et al. Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1996;45:477-482.
658. Kabeya H, Maruyama S, Irei M, et al. Genomic variation among *Bartonella henselae* isolates derived from naturally infected cats. *Vet Microbiol* 2002;89:211-221.
659. Kadikoylu G, Tuncer G, Bolaman Z, Sina M. Brucellar orchitis in innerwest Anatolia region of Turkey: a report of 12 cases. *Urol Int* 2002;69:31-35.
660. Kainz A, Lubitz W, Busse HJ. Genomic fingerprints. ARDRA profiles, and quinone systems for classification of *Pasteurella sensu stricto*. *Syst Appl Microbiol* 2000;23:292-303.
661. Kaka S, Lunz R, Klugman KP. *Actinobacillus (Pasteurella) ureae* meningitis in a HIV-positive patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;20:105-107.
662. Kanaan N, Gavage P, Janssens M, et al. *Pasteurella multocida* in peritoneal dialysis: a rare case of peritonitis associated with exposure to domestic cats. *Acta Clin Belg* 2002;57:254-256.
663. Kao PT, Tseng HK, Su SC, Lee SM. *Haemophilus aphrophilus* brain abscess: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35:184-186.
664. Kaplan AH, Weber DJ, Oddone EZ, et al. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* 1989;11:46-63.
665. Kaplan JB, Schneider HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40:1181-1187.
666. Kaplan SL. Clinical presentation, diagnosis, and prognostic factors of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed. Infectious Disease Clinics of North America. Vol 13. Bacterial Meningitis. Philadelphia, Saunders, 1999:579-594.
667. Karhukorpi EK, Karhukorpi J. Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularemia with polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 2001;33:383-385.
668. Karlowky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, et al. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a β -lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol* 2002;40:1063-1066.
669. Karlowky JA, Jones ME, Mayfield DC, et al. Ceftazoxime activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens isolated in U.S. clinical microbiology laboratories from 1996 to 2000: results from the Surveillance Network (TSN). *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:413-426.
670. Kaslow HR, Plutler BW, Blumberg DA, et al. Deletion of antibodies inhibiting the ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in human serum. *J Clin Microbiol* 1992;30:1380-1387.
671. Kattar MM, Chave JF, Limaye AP, et al. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:789-794.
672. Katti MK, Sarada C, Sivasankaran S, Shanmugham J. Serological diagnosis of human brucellosis: analysis of seven cases with neurological and cardiological manifestations. *J Commun Dis* 2001;33:36-43.
673. Katzko G, Hofmeister M, Church D. Extended incubation of culture plates improves recovery of *Bordetella* spp. *J Clin Microbiol* 1996;34:1563-1564.
674. Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and post-attack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis* 1997;3:83-94.
675. Keitel WA. Cellular and acellular pertussis vaccines in adults. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):S118-S123.
676. Kemper CA, Lombard CM, Deresinski SC, et al. Visceral bacillary epithelioid angiomatosis: possible manifestations of disseminated cat scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases. *Am J Med* 1990;89:216-222.
677. Kempf VA, Petzold H, Autenrieth IB. Cat scratch disease due to *Bartonella henselae* infection mimicking parotid malignancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:732-733.
678. Kennedy CA, Rosen H. *Kingella kingae* bacteremia and adult epiglottitis in a granulocytopenic host. *Am J Med* 1988;85:701-702.
679. Kerem E, Diav O, Navon P, et al. Pleural fluid characteristics in pulmonary brucellosis. *Thorax* 1994;49:89-90.
680. Kerkhoff FT, Bergmans AM, van Der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol* 1999;37:4034-4038.
681. Kersters K, Hinz K-H, Hertle A, et al. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:56-70.
682. Khattak MN, Matthews RC. Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digest resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:695-664.
683. Khelef N, Sakamoto H, Guiso N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* 1992;12:227-235.
684. Kilian M. A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains: the porphyrin test. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1974;82:935-942.
685. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 1976;93:9-62.
686. Kilian M, Biberstein EL, Genus II. *Haemophilus*. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:558-559.
687. Kilian M, Poulsen K. Enzymatic, serologic, and genetic polymorphism of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1): S192-S193.
688. Killen JW, Swift GL, White RJ. Pleuropulmonary infection with chest wall infiltration by *Eikenella corrodens*. *Thorax* 1996;51:871-872.
689. Kilpi T, Herva E, Kajjalainen T, et al. Bacteriology of acute otitis media in a cohort of Finnish children followed for the first two years of life. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:654-662.
690. Kim JO, Ginsberg J, McGowan KL. *Campylobacter* meningitis in a cancer patient. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:636-637.
691. Kingsland RC, Guss DA. *Actinobacillus ureae* meningitis: case report and review of the literature. *J Emerg Med* 1995;13:623-627.
692. Kirchner BK, Lake SG, Wightman SR. Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a guinea pig with granulomatous pneumonia. *Lab Anim Sci* 1992;42:519-521.
693. Kirmani KI, Loftus G, Pichichero ME, et al. Seven-year follow-up of vaccine response in extremely premature infants. *Pediatrics* 2002;109:498-504.
694. Kitzis M-D, Goldstein FW, Mieg M, Acar JF. In vitro activity of levofloxacin, a new fluoroquinolone: evaluation against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43(Suppl C):21-26.
695. Klein B, Couch J, Thompson J. Ocular infections associated with *Eikenella corrodens*. *Am J Ophthalmol* 1990;109:127-131.
696. Klein JL, Nair SK, Harrison TG, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella henselae*. *Emerg Infect Dis* 2002;8:202-203.
697. Kleinfelder JW, Mueller RF, Lange DE. Fluoroquinolones in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:202-208.
698. Knapp JS, Back A, Bahst AF, et al. In vitro susceptibilities of isolates of *Haemophilus ducreyi* from Thailand and the United States to currently recommended and newer agents for treatment of chancroid. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1552-1555.
699. Knutsson N, Trollfors B, Taranger J, et al. Immunogenicity and reactogenicity of diphtheria, tetanus and pertussis toxoids combined with inactivated polio vaccine.

- when administered concomitantly with or as a diluent for a Hib conjugate vaccine. *Vaccine* 2001;19:4396-4403.
700. Kocagöz S, Akova M, Altun B, et al. In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:240-242.
 701. Koch CA, Mabey CL, Robyn JA, et al. Exposure to domestic cats: risk factor for *Pasteurella multocida* peritonitis in liver cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 1996;91:1447-1449.
 702. Kodama S, Suenaga S, Hirano T, et al. Induction of specific immunoglobulin A and Th2 immune responses to P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in middle ear mucosa by intranasal immunization. *Infect Immun* 2000;68:2294-2300.
 703. Koehler JE. Bacillary angiomatosis: investigation of the unusual interaction between *Rochalimaea* bacilli and endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1994;124:475-477.
 704. Koehler JE, Cederberg L. Intra-abdominal mass associated with gastrointestinal hemorrhage: a new manifestation of bacillary angiomatosis. *Gastroenterology* 1995;109:2011-2014.
 705. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rochalimaea henselae* infection: a new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 1994;271:531-535.
 706. Koehler JE, LeBoit PE, Egben BM, et al. Cutaneous vascular lesion and disseminated cat scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* 1988;109:449-455.
 707. Koehler JE, Quinn ED, Berger TG, et al. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med* 1992;325:1625-1631.
 708. Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* 1997;337:1876-1883.
 709. Kok RH, Wolfhagen MJ, Mooi BM, Offerman JJ. A patient with thrombotic thrombocytopenic purpura caused by *Capnocytophaga canimorsus* septicemia. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:297-298.
 710. Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Craig E. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1989;57:1465-1469.
 711. Kolodrubetz D, Spitznagel J, Wang B, et al. cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1996;64:3451-3460.
 712. Komiya A, Kato T, Nakagawa T, et al. A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 2000;71:760-767.
 713. Koopman JP, Van den Brink, Vennix PPCA. Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from the middle ear of rats. *Lab Anim* 1991;25:35-39.
 714. Kooter AJ, Derks A, Vasmel WL. Rapidly progressive tricuspid valve endocarditis caused by *Capnocytophaga canimorsus* infection in an immunocompetent host. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:173-175.
 715. Kordick DL, Hreitschwerdt EB. Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. *Emerg Infect Dis* 1998;4:325-328.
 716. Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol* 1999;37:1536-1547.
 717. Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, et al. *Bartonella clarridgeiae* a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* 1997;35:1813-1818.
 718. Kordick DL, Papich MG, Breitschwerdt EB. Efficacy of enrofloxacin and doxycycline for treatment of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2448-2455.
 719. Kordick DL, Swaminathan B, Greene CE, et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffii* subsp. nov., isolated from dogs: *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*, and emended description of *Bartonella vinsonii*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:704-709.
 720. Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, et al. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:3245-3251.
 721. Korgenski EK, Daly JA. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the intermountain west region of the United States. *J Clin Microbiol* 1997;35:2989-2991.
 722. Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. *J Infect Dis* 2000;182:865-872.
 723. Koskela P, Salminen A. Humoral immunity against *Francisella tularensis* following natural infection. *J Clin Microbiol* 1985;22:973-979.
 724. Kosoy MY, Regnery RL, Tianabos T, et al. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the Southeastern United States. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:578-588.
 725. Kostman JR, Sherry BL, Fligner CL, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in older children and adults in Seattle. *Clin Infect Dis* 1993;17:289-296.
 726. Kragstjerg P, Nilsson K, Persson L, et al. Deep obstetrical and gynecologic infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Scand J Infect Dis* 1993;25:341-346.
 727. Krasan CP, Cutter D, Block SL, St Geme JW III. Adhesin expression in matched nasopharyngeal and middle ear isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* from children with acute otitis media. *Infect Immun* 1999;67:449-454.
 728. Krause R, Wenisch C, Fladerer P, et al. Osteomyelitis of the hip joint associated with systemic cat scratch disease in an adult. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:781-783.
 729. Kreiss JK, Koeh D, Plummer FA, et al. AIDS virus infection in Nairobi prostitutes: spread of the epidemic to East Africa. *N Engl J Med* 1986;314:414-418.
 730. Kreutzer DL, Robertson DC. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of the cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1979;23:819-828.
 731. Kristensen B, Schonheyder HC, Peterslund NA, et al. *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga ochracea* group) Bacteremia in hematological patients with profound granulocytopenia. *Scand J Infect Dis* 1995;27:153-155.
 732. Kroll JS. The genetics of encapsulation in *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S93-S96.
 733. Kroll JS, Farrant JL, Tyler S, et al. Characterisation and genetic organisation of a 24-Mdal plasmid from the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *Plasmid* 2002;48:38-48.
 734. Kroll JS, Hopkins I, Moxon ER. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. *Cell* 1988;53:347-356.
 735. Kubiet M, Ramphal E, Weber A, Smith A. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect Immun* 2000;68:3362-3367.
 736. Kugler KC, Biedenbach DJ, Jones RN. Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:73-76.
 737. Kuhnert P, Boerlin P, Emmler S, et al. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int J Med Microbiol* 2000;290:599-604.
 738. Kuijper EJ, Wiggerts HO, Jonker GJ, et al. Disseminated actinomycetosis due to *Actinomyces meyeri* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand J Infect Dis* 1992;24:667-672.
 739. Kullberg B-J, Wastendorp RGJ, Van't Wout JW, et al. Purpura fulminans and symmetrical peripheral gangrene caused by *Capnocytophaga canimorsus* (formerly DF-2) septicemia: a complication of dogbite. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:287-292.
 740. Kurzynski TA, Boehm DM, Rott-Petri JA, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Bordetella* species isolated in a multicenter pertussis surveillance project. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:137-140.
 741. Kurzynski TA, Boehm DM, Rott-Petri JA, et al. Comparison of modified *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:2661-2663.
 742. Labruno P, Jabir B, Magny JF, et al. Recurrent enterocolitis-like symptoms as the possible presenting manifestations of neonatal *Brucella melitensis* infection. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:707-709.
 743. LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol* 2003;41:393-396.
 744. Lacroix J-M, Walker C. Characterization of a β -lactamase found in *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:886-891.
 745. Lambe DW. *Streptobacillus moniliformis* isolated from a case of Haverhill fever: biochemical characterization and inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate. *Am J Clin Pathol* 1973;60:854-860.
 746. Lang R, Dagan R, Potasman I, et al. Failure of ceftriaxone in the treatment of acute brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:506-509.
 747. Lang R, Raz R, Sacks T, et al. Failure of prolonged treatment with ciprofloxacin in acute infections due to *Brucella melitensis*. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:841-846.
 748. Larson AM, Dougherty MI, Nowowifski DJ, et al. Detection of *Bartonella* (*Rochalimaea*) quintana by routine acridine orange staining of broth blood cultures. *J Clin Microbiol* 1994;32:1492-1496.
 749. Laron CL, Wicht W, Jellison WL. An organism resembling *P. tularensis* from water. *Public Health Rep* 1955;70:253-258.
 750. LaScola B, Barrassi L, Raoult D. Isolation of new fastidious α -Proteobacteria and *Afpia* felis from hospital water supplies by direct plating and amoebal coculture procedures. *FEMS Microbiol Ecol* 2000;34:129-137.
 751. LaScola B, Iorulescu I, Bollini G. Five case of *Kingella kingae* skeletal infection in a French hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:12-15.
 752. LaScola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. Description of *Afpia birgiae* sp. nov. and *Afpia massiliensis* sp. nov. and recognition of *Afpia felis* genospecies A. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1773-1782.
 753. LaScola B, Mezi L, Auffray JP, et al. Patients in the intensive care unit are exposed to amoeba-associated pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:462-465.
 754. LaScola B, Raoult D. Serological cross-reaction between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1899-1905.
 755. LaScola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 1999;37:1899-1905.
 756. LaScola B, Raoult D. *Afpia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae. *Lancet* 1999;353:1330.
 757. Lass JH, Varley MP, Frank KE, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endophthalmitis with subacute endocarditis. *Ann Ophthalmol* 1984;16:54-61.
 758. Lawson PA, Collin MD. Description of *Bartonella clarridgeiae*. *Med Microbiol Lett* 1996;5:64-73.
 759. Lawson PA, Falsen E, Inganas E, et al. *Dysgonomonas mossii* sp. nov., from human sources. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:194-197.
 760. Layton CT. *Pasteurella multocida* meningitis and septic arthritis secondary to a cat bite. *J Emerg Med* 1999;17:445-448.
 761. Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS. *Capnocytophaga*: a new genus of gamnegative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations, and significance. *Arch Microbiol* 1979;122:9-16.

762. LeBoit PE, Berger TG, Egbert EM, et al. Epithelioid haemangioma-like vascular proliferation in AIDS: manifestation of cat scratch disease bacillus infection? *Lancet* 1988;2:960-963.
763. LeDoux MS. Tularemia presenting with ataxia. *Clin Infect Dis* 2000;30:211-212.
764. Lehman CR, Deckley JE, Hu SS. *Eikenella* corrodens vertebral osteomyelitis secondary to direct inoculation: a case report. *Spine* 2000;25:1185-1187.
765. Lejbkiewicz F, Cohn L, Hashman N, Kassir I. Recovery of *Kingella* kingae from blood and synovial fluid of two pediatric patients by using the BacT/Alert system. *J Clin Microbiol* 1999;37:878.
766. Le Moal G, Landron C, Grollier G, et al. Meningitis due to *Capnocytophaga canimorsus* after receipt of a dog bite: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2003;36:e42-c46.
767. Leonard A, Williams C. *Haemophilus influenzae* in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:371-375.
768. Lepine G, Caudry S, DiRenzo JM, Ellen RP. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from restriction fragment-length polymorphism groups associated with juvenile periodontitis or carrier state. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:241-247.
769. Le Quellec A, Bessis D, Perez C, et al. Endocarditis due to a β -lactamase-producing *Cardiobacterium hominis*. *Clin Infect Dis* 1994;19:994-995.
770. Lesage V, Van Pee D, Luyx C, et al. Septic arthritis due to *Haemophilus influenzae* associated with endocarditis. *Clin Rheumatol* 1998;17:340-342.
771. Lesse AJ, Gheesling LL, Bittner WE, et al. Stable, conserved outer membrane epitope of strains of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius associated with Brazilian purpuric fever. *Infect Immun* 1992;60:1351-1357.
772. Lev EI, Onn A, Levo Y, Giladi M. *Haemophilus influenzae* biotype III cellulitis in an adult. *Infection* 1999;27:42-43.
773. Lewis DA. Diagnostic tests for chancroid. *Sex Transm Infect* 2000;76:137-141.
774. Lewis K, Saubolle MA, Tenover FC, et al. Pertussis caused by an erythromycin-resistant strain of *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:388-391.
775. Li WC, Chiu NC, Hsu CH, et al. Pathogens in the middle ear effusion of children with persistent otitis media: implications of drug resistance and complications. *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:190-194.
776. Liang Z, Raoult D. Species-specific monoclonal antibodies for rapid identification of *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:21-24.
777. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, et al. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 1996;34:3035-3039.
778. Liese JG, Meschivitz CK, Harzer E, et al. Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:1038-1044.
779. Lim ME, Hoffman JA, Kim KS. Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 1999;28:147-148.
780. Limaye AP, Hooper CJ. Treatment of tularemia with fluoroquinolones: two cases and review. *Clin Infect Dis* 1999;29:922-924.
781. Lin BH, Vieco PT. Intracranial mycotic aneurysm in a patient with endocarditis caused by *Cardiobacterium hominis*. *Can Assoc Radiol J* 1995;46:40-42.
782. Lindberg AA. Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine* 1999;17:S28-S36.
783. Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergard T, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:679-683.
784. Lindquist SW, Weber DJ, Magnum ME, et al. *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:813-815.
785. Lion C, Escande F, Burdin JC. *Capnocytophaga canimorsus* infections in humans: review of the literature and case reports. *Eur J Epidemiol* 1996;12:521-533.
786. Lion C, Lozniewski A, Rosner V, Weber M. Lung abscess due to β -lactamase-producing *Pasteurella multocida*. *Clin Infect Dis* 1999;29:1345-1346.
787. Lipkka JA, Peros WJ, Keville MW, French CK. DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta*, and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:81-87.
788. Lipuma JJ, Richman H, Stull L. Haemocin, a bacteriocin produced by *Haemophilus influenzae* type b: species distribution and role in colonization. *Infect Immun* 1990;58:1600-1605.
789. LiPuma JJ, Sharetzsky C, Edlind TD, et al. Haemocin production by encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S118-S119.
790. Liu W, Chemaly RF, Tuohy MJ, et al. *Pasteurella multocida* urinary tract infection with molecular evidence of zoonotic transmission. *Clin Infect Dis* 2003;36:E58-E60.
791. Livrelli VO, Darfeuille-Richaud A, Rich CD, et al. Genetic determinant of the ROB-1 β -lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1282-1284.
792. Loe H, Brown LJ. Early-onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* 1991;62:606-616.
793. Loeffelholz JI, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2872-2876.
794. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:467.
795. Loghman-Adham M. *Pasteurella multocida* peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1997;11:353-354.
796. Loez C, Wallef F, Husson MO, Courcol RJ. *Pasteurella multocida* and intrauterine device: a woman and her pets. *Scand J Infect Dis* 2002;34:473.
797. Lombardo J. Cat-scratch neuroretinitis. *J Am Optom Assoc* 1999;70:525-53.
798. Long GWE, Oporandy JJ, Narayanan RB, et al. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:152-154.
799. Lopez-Merino A, Monnet SL, Hernandez I, et al. Identification of *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, and *B. suis* by carbon substrate assimilation test. *Vet Microbiol* 2001;80:359-363.
800. Lozano FM, Corzo JE, Leon EM, et al. Massive hemoperitoneum: a new manifestation of bacillary peliosis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1999;28:911-912.
801. Lu PL, Hsueh PR, Hung CC, et al. Infective endocarditis complicated with progressive heart failure due to β -lactamase producing *Cardiobacterium hominis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2015-2016.
802. Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, et al. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* immunocompetent hosts: implications for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* 1992;14:683-688.
803. Luhmann JD, Luhmann SJ. Etiology of septic arthritis in children: an update for the 1990's. *Pediatr Emerg Care* 1999;15:40-42.
804. Luong N, Tsai J, Chen C. Susceptibilities of *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* clinical isolates to amoxicillin and tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3253-3255.
805. Maccato M, McLean W, Riddle G, Faro S. Isolation of *Kingella denitrificans* from amniotic fluid in a woman with chorioamnionitis. *J Reprod Med* 1991;36:685-687.
806. Madhi SA, Petersen K, Khoosal M, et al. Reduced effectiveness of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in children with a high prevalence of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:315-321.
807. Madini IM, Fosse TB, Hitzig C, et al. Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999;70:888-892.
808. Maguina C, Garcia PJ, Gotuzzo E, et al. Bartonellosis (Carrión's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* 2001;33:772-779.
809. Maguina C, Gotuzzo E. Bartonellosis: new and old. *Infect Dis Clin N Am* 2000;14:1-22.
810. Mahler S, Raik E. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia associated with cat scratch. *Pathology* 1992;24:194-196.
811. Malavolta N, Frigato M, Zanardi M, et al. *Brucella* spondylitis was paravertebral abscess due to *Brucella melitensis* infection: a case report. *Drugs Exp Clin Res* 2002;28:95-98.
812. Maliszewski CR, Shuster CW, Badger SJ. A type-specific antigen of *Eikenella corrodens* is the major outer membrane protein. *Infect Immun* 1983;42:208-213.
813. Malizos KN, Makris CA, Soucacos PN. Total knee arthroplasties infected by *Brucella melitensis*: a case report. *Am J Orthop* 1997;26:283-285.
814. Malone FD, Athanassiou A, Noreas LA, Dalton ME. Poor perinatal outcome associated with maternal *Brucella abortus* infection. *Obstet Gynecol* 1997;90:674-676.
815. Malonza IM, Tyndall MW, Ndinya-Achola JO, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single-dose ciprofloxacin versus erythromycin for the treatment of chancroid in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis* 1999;180:1886-1893.
816. Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, et al. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun* 1991;59:3267-3272.
817. Maradona JA, Asensi V, Carton JA, et al. Prosthetic joint infection by *Pasteurella multocida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:623-625.
818. Maranan RC, Schiff D, Johnson DC, et al. Pneumonic tularemia in a patient with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 1997;25:630-633.
819. Marchette NJ, Nicholes PS. Virulence and citrulline ureidase activity of *Pasteurella tularensis*. *J Bacteriol* 1961;82:26-32.
820. Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ. Comparative laboratory evaluation of three antigen detection methods for diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Clin Microbiol* 1984;19:333-337.
821. Margileth AM, Baehren DF. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. *Clin Infect Dis* 1998;27:353-357.
822. Markowitz SM. Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:80-83.
823. Marston EL, Sumner JW, Regnery RL. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (groEL) of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1015-1023.
824. Martin DH, Sargent SJ, Wendel GD Jr, et al. Comparison of azithromycin and ceftriaxone for the treatment of chancroid. *Clin Infect Dis* 1995;21:409-414.
825. Martone WJ, Zuehl RW, Minson GE, et al. Postsplenectomy sepsis with DF-2: report of a case with isolation of the organism from the patient's dog. *Ann Intern Med* 1980;93:457-458.
826. Marullo S, Jaccard A, Roulot D, et al. Identification of the *Rochalimaea henselae* 16S rRNA sequence in the liver of a French patient with bacillary peliosis hepatis. *J Infect Dis* 1992;166:1462-1464.
827. Marx RE, Carlson ER, Smith BR, Toraya N. Isolation of *Actinomyces* species and *Eikenella corrodens* from patients with chronic diffuse sclerosing osteomyelitis. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:26-33.
828. Mastrantonio P, Stefaneli P, Giuliano M, et al. *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characterization of isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:999-1002.
829. Matar GM, Koehler IE, Malcolm G, et al. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol* 1999;37:4045-4047.
830. Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, et al. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J Clin Microbiol* 1993;31:1730-1734.
831. Matthews HW, Baker CN, Thornsberry C. Relationship between in vitro susceptibility test results for chloramphenicol and production of chloramphenicol acetyl-

- transferrase by *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Aerococcus species*. *J Clin Microbiol* 1988;26:2387-2390.
832. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2283-2287.
 833. Maurin M, Gasquet S, Ducco C, Raoult D. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2387-2391.
 834. Maurin M, Lepocher H, Mallet D, et al. Antibiotic susceptibilities of *Afpia felis* in axenic medium and in cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1410-1413.
 835. Maurin M, Raoult D. Antimicrobial susceptibility of *Rochalimaea quintana*, *Rochalimaea vinsonii*, and the newly recognized *Rochalimaea henselae*. *J Antimicrob Chemother* 1993;32:587-594.
 836. Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1004-1009.
 837. Maurin M, Roux V, Stein A, et al. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1166-1171.
 838. Mayatepek E, Zilow E, Pohl S. Severe intrauterine infection due to *Capnocytophaga ochracea*. *Biol Neonate* 1991;60:184-186.
 839. Mayer LW, Bibb WF, Birkness KA, et al. Distinguishing clonal characteristics of the Brazilian purpuric fever-producing sorain. *Pediatr Infect Dis* 1989;J 8:245-247.
 840. Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and feature of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999;67:1227-1237.
 841. Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, et al. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol* 2000;8:2330-2333.
 842. McAllister HA, Carter GR. An aerogenic *Pasteurella*-like organism recovered from swine. *Am J Vet Res* 1974;35:917-922.
 843. McClain JB, Almazan RD, Keiser JF. *Haemophilus parainfluenzae* urethritis with accompanying bacteremia. *Clin Microbiol Newslett* 1983;5:31.
 844. McCrary B, Cockerham W, Pierce P. Neuroretinitis in cat-scratch disease associated with the macular star. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:838-839.
 845. McCrea KW, St Sauver J, Marrs CF, et al. Immunologic and structural relationships of the minor plus subunits among *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect Immun* 1998;66:4788-4796.
 846. McDonald PJ, Pruihl H. Phagocyte uptake and transport of azithromycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:828-833.
 847. McIntyre P, Wheaton G, Erlich J. Brazilian purpuric fever in Central Australia. *Lancet* 1987;2:112.
 848. McLaren BL. *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis. *NZ Med J* 1993;106:412.
 849. Meade BD, Bollen A. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *J Med Microbiol* 1994;41:51-55.
 850. Megraud F, Bebear C, Dabernal H, Deimas C. *Haemophilus* species in the human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:437-438.
 851. Meininger GR, Nadasdy T, Hruban RH, et al. Chronic active myocarditis following acute *Bartonella henselae* infection (cat scratch disease). *Am J Surg Pathol* 2001;25:1211-1214.
 852. Meis JF, Sauerwein RW, Gyssens IC, et al. *Kingella kingae* intervertebral diskitis in an adult. *Clin Infect Dis* 1992;15:530-532.
 853. Melhus A. Isolation of dysgonic fermenter 3, a rare isolate associated with diarrhoea in immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis* 1997;29:195-196.
 854. Memish ZA, Bannatyne RM, Alshaalan M. Endophlebitis of the leg caused by *Brucella* infection. *J Infect* 2001;42:281-283.
 855. Memish ZA, Mah MW. Brucellosis in laboratory workers at a Saudi Arabian hospital. *Am J Infect Control* 2001;29:48-52.
 856. Memish Z, Mah MW, Al-Mahmoud SA, et al. *Brucella* bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J Infect* 2000;40:59-63.
 857. Mendelman PM. Targets of the β -lactam antibiotics, penicillin binding proteins, in ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S107-S109.
 858. Mendelman PM, Chaffin DO, Clausen C, et al. Failure to detect ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* by standard disk susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:274-280.
 859. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, et al. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:235-244.
 860. Mercer LJ. *Capnocytophaga* isolated from the endometrium as a cause of neonatal sepsis. *J Reprod Med* 1985;30:67-68.
 861. Mesnard R, Guiso N, Michelet C, et al. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:304-306.
 862. Mexas AM, Hancock SI, Breitschwerdt EB. *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J Clin Microbiol* 2002;40:4670-4674.
 863. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1991;59:2719-2726.
 864. Michel F, Allaouchiche B, Chassard D. Postoperative adult respiratory distress syndrome (ARDS) due to *Pasteurella multocida*. *J Infect* 1999;38:133-134.
 865. Mifflin JK, Blackall PJ. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:216-221.
 866. Milam MW, Balerdi MJ, Toney JF, et al. Epithelioid angiomatosis secondary to disseminated cat-scratch disease involving the bone marrow and skin of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989;88:180-183.
 867. Milonis H, Christou L, Elisaf M. Cutaneous manifestations in brucellosis: case report and review of the literature. *Infection* 1989;28:124-126.
 868. Miller WG, Adams LG, Ficht TA, et al. *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 1999;30:100-110.
 869. Min K-W, Reed JA, Welch DF, et al. Morphologically variable bacilli of cat scratch disease are identified by immunocytochemical labeling with antibodies to *Rochalimaea henselae*. *Am J Clin Pathol* 1994;101:607-610.
 870. Minamoto GY, Sordillo EM. *Kingella dentrificans* as a cause of granulomatous disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:1052-1053.
 871. Mink CM, Cherry JD, Christenson P, et al. A search for *Bordetella pertussis* infection in university students. *Clin Infect Dis* 1992;14:464-471.
 872. Minton EJ. *Pasteurella pneumotropica*: meningitis following a dog bite. *Postgrad Med J* 1990;66:125-126.
 873. Mintz KP, Fives-Taylor PM. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. *Infect Immun* 1994;62:3672-3678.
 874. Mintz KP, Fives-Taylor PM. Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1994;62:4500-4505.
 875. Miranda RT, Gimeno AE, Rodriguez TF, et al. Acute cholecystitis caused by *Brucella melitensis*: case report and review. *J Infect* 2001;42:77-78.
 876. Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, et al. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Chest* 1999;116:40-46.
 877. Mirza I, Wolk J, Toth L, et al. Waterhouse-Friderichsen syndrome secondary to *Capnocytophaga canimorsus* septicemia and demonstration of bacteremia by peripheral blood smear. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:859-863.
 878. Modi SP, Eppes SC, Klein JD. Cat scratch disease presenting as multifocal osteomyelitis with thoracic abscess. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1006-1007.
 879. Mohle-Boetani J, Kochler J, Berger T, et al. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study. *Clin Infect Dis* 1996;22:794-800.
 880. Molina F, Duran MT, Miguez E, et al. Isolation of *Haemophilus paraphrophilus* from an abdominal abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:722-723.
 881. Molina F, Echaniz A, Duran MT, et al. Infectious arthritis of the knee due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:687-689.
 882. Molina R, Baro T, Torne J, et al. Empyema caused by *Kingella dentrificans* and *Pseudomonas aeruginosa* spp. in a patient with bronchogenic carcinoma. *Eur Respir J* 1988;1:870-871.
 883. Mollee T, Kelly P, Tilee M. Isolation of *Kingella kingae* from a corneal ulcer. *J Clin Microbiol* 1992;30:2516-2517.
 884. Moller K, Fussing V, Grimont PA, et al. *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., *Actinobacillus indolicus* sp. nov., three new V factor-dependent species from the respiratory tract of pigs. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:951-956.
 885. Moncla BJ, Braham P, Hillier SL. Sialidase (neuraminidase) activity among gram-negative anaerobic and capnophilic bacteria. *J Clin Microbiol* 1990;28:422-425.
 886. Monkemuller KE, Bronze MS. Immunoblastic lymphadenopathy presenting as an acute abdomen and mixed bacteremia with *Eikenella corrodens* and group C streptococci. *Am J Gastroenterol* 1998;93:652-653.
 887. Monso E, Ruiz J, Rozell A, et al. Bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease: a study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1316-1320.
 888. Montaraz JA, Winter AJ, Hunter DM, et al. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1986;51:961-963.
 889. Mooi FR. Genes for the filamentous hemagglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*: colocation, coregulation, and cooperation? In: Miller VL, Kaper JB, eds. *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994:145-155.
 890. Mooi FR, Hallander H, Wirsing Von Konig CH, et al. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:174-181.
 891. Moore CH, Foster L-A, Gerbig DG, et al. Identification of alcaligin, the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1995;177:1116-1118.
 892. Moreno E. Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* 2002;90:31-38.
 893. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyon I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 2002;90:209-227.
 894. Moreno E, Stackbrandt E, Dorsch M, et al. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the α -2 subgroup of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* 1990;172:3569-3576.
 895. Morgan MG, Hamilton-Miller JMT. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* as urinary pathogens. *J Infect* 1990;20:143-145.
 896. Moritz F, Mattin E, Lemeland JF, et al. Fatal *Pasteurella bettiae* pleuropneumoniae in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996;22:591-592.
 897. Morris JF, Sewell VL. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:450-452.
 898. Morris JT, Myers M. Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis* 1998;27:912-913.

899. Montensen JE, Giger O, Rodgers GL. In vitro activity of oral antimicrobial agents against clinical isolates of *Pasteurella multocida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:99-102.
900. Moshal KL, Hodinka RL, McGowan KL. Concomitant viral and *Bordetella pertussis* infections in infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:353-354.
901. Moxon ER, Murphy TF. *Haemophilus influenzae*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Ed. New York: Churchill-Livingstone, 2000;2369-2378.
902. Moylett EH, Rossmann SN, Epps HR, Demmler GJ. Importance of *Kingella kingae* as a pediatric pathogen in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:263-265.
903. Mueller NJ, Kaplan V, Zhinden R, Altwegg M. Diagnosis of *Cardiobacterium hominis* endocarditis by broad-range PCR from arterio-embolic tissue. *Infection* 1999;27:278-279.
904. Muhlemann K, Alexander ER, Pepe M, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease and epiglottitis among Swiss children from 1980 to 1993: evidence for herd immunity among older age groups. The Swiss *Haemophilus influenzae* Study Group. *Scand J Infect Dis* 1996;28:265-268.
905. Mulder AH, Gerlag PG, Verhoef LH, Van den Wall Bake AW. Hemolytic uremic syndrome after *Capnocytophaga canimorsus* (DF-2) septicemia. *Clin Nephrol* 2000;55:167-170.
906. Muller FM, Hoppe JE, Wirsing Von Konig CH. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997;35:2435-2443.
907. Muller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Hoffer U. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J Clin Periodontol* 2002;29:736-742.
908. Mulvany NJ, Billson VR. Bacillary angiomatosis of the spleen. *Pathology* 1993;25:398-401.
909. Munson E, Pfaller M, Koontz F, Doern G. Comparison of porphyrin-based, growth factor-based, and biochemical-based testing methods for identification of *Haemophilus influenzae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:196-203.
910. Murphy TF, Apicella MA. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspect, surface antigens and human immune response to infection. *Rev Infect Dis* 1987;147:838-846.
911. Murphy TF, Bartos LC. Purification and analysis with monoclonal antibodies of P2, the major outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1988;56:1084-1089.
912. Murphy TF, Bartos LC, Rice PA, et al. Identification of a 16,600-dalton outer membrane protein on nontypeable *Haemophilus influenzae* as a target for human bactericidal antibody. *J Clin Invest* 1986;78:1020-1027.
913. Murphy TF, Kirkhum C, Sikkema DJ. Neonatal, urogenital isolates of biotype 4 nontypeable *Haemophilus influenzae*, express a variant K outer membrane protein molecule. *Infect Immun* 1992;60:2016-2022.
914. Murphy TV, Pastor P, Medley F, et al. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 1993;122:517-523.
915. Musio F, Tiu A. *Pasteurella multocida* peritonitis in peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 1998;49:258-261.
916. Musser JM, Selander RK. Brazilian purpuric fever: evolutionary genetic relationships of the case clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius to encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1990;161:130-133.
917. Musso D, Drancourt M, Raoult D. Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella* (Rochalimaea) *henselae*. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:101-108.
918. Mutters R, Ihm P, Pohl S, et al. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:309-322.
919. Mutters R, Peichulla K, Hinz K-H, et al. *Pasteurella avium* (Hinz and Kunjara) comb. nov. and *Pasteurella volutans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:509.
920. Mutters R, Peichulla K, Mannheim W. Phenotypic differentiation of *Pasteurella sensu stricto* and *Actinobacillus* group. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:225-229.
921. Mutters R, Pohl S, Mannheim W. Transfer of *Pasteurella ureae* Jones 1962 to the genus *Actinobacillus* Brumpt 1910: *Actinobacillus ureae* comb. nov. *Int Syst Bacteriol* 1986;36:343-344.
922. Naas T, Benaoudia F, Lebrun L, Nordmann P. Molecular identification of TEM-1 β -lactamase in a *Pasteurella multocida* isolate of human origin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:210-213.
923. Namiduru M, Gungor K, Dikensoy O, et al. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *Int J Clin Pract* 2003;57:20-24.
924. Nashi M, Venkatachalam AK, Unsworth PF, Muddu BN. Diskitis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Orthopaedic* 1998;21:714-716.
925. Naughton M, Brown R, Adkins D, DiPersio J. Tularemia: an unusual cause of a solitary pulmonary nodule in the post-transplant setting. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:197-199.
926. Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:147-151.
927. Navarro V, Solera J, Martinez-Alvaro E, et al. Brucellar osteomyelitis involving prosthetic extra-articular hardware. *J Infect* 1997;35:192-194.
928. Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, et al. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis* 2001;33:2017-2022.
929. Neibylski ML, Peacock MG, Fischer ER, et al. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3933-3940.
930. Nelson MB, Apicella MA, Murphy TF, et al. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *Infect Immun* 1988;56:128-134.
931. Nelson S, Matlow A, McDowell C, et al. Detection of *Bordetella pertussis* in clinical specimens by PCR and a microtiter plate-based DNA hybridization assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:117-120.
932. Nettles RE, Sexton DJ. *Pasteurella multocida* prosthetic valve endocarditis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:920-921.
933. Neuman HB, Wald ER. Bacterial meningitis in childhood at the Children's Hospital of Pittsburgh: 1988-1998. *Clin Pediatr (Phila)* 2001;40:595-600.
934. Newfield RS, Vargas I, Huma Z. *Eikenella corrodens* infections: case report in two adolescent females with IDDM. *Diabetes Care* 1996;19:1011-1013.
935. Newman MG, Sutter VL, Pickett MJ, et al. Detection, identification, and comparison of *Capnocytophaga*, *Bacteroides* *ochraceus*, and DF-1. *J Clin Microbiol* 1979;10:557-562.
936. Ng VL, Weir L, York MK, et al. *Bordetella pertussis* versus Non-1 pneumophilia *Legionella* spp.: a continuing diagnostic challenge. *J Clin Microbiol* 1992;30:3300-3301.
937. Ng VL, York M, Hadley WK. Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989;27:337-338.
938. Ngaage DL, Kotidis KN, Sandoe JA, Unnikrishnan Nair R. Do not snog the dog: infective endocarditis due to *Capnocytophaga canimorsus*. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:362-363.
939. Nikkari S, Gotoff R, Bourbeau PP, et al. Identification of *Cardiobacterium hominis* by broad-range bacterial polymerase chain reaction analysis in a case of culture-negative endocarditis. *Arch Intern Med* 2002;162:477-479.
940. Njankepo E, Delisle F, Hagege I, et al. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:131-136.
941. Noah DL, Bresee JS, Gorensek MJ, et al. Cluster of five children with acute encephalitis associated with cat-scratch disease in south Florida. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:866.
942. Noah DL, Kramer CM, Verbsky MP, et al. Survey of veterinary professionals and other veterinary conference attendees for antibodies to *Bartonella henselae* and *B. quintana*. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:342-344.
943. Noble RC, Marek BJ, Overman SB. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Pasteurella ureae*. *J Clin Microbiol* 1987;25:442-444.
944. Noele GL, Teale DW. In vitro activities of selected new and long-acting cephalosporins against *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:344-345.
945. Nordahl SHG, Hoel T, Scheel O, et al. Tularemia: a differential diagnosis in otorhinolaryngology. *J Laryngol Otol* 1993;107:127-129.
946. Norman AF, Regnery R, Jameson P, et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995;33:1797-1803.
947. Novotny LA, Jurcisek JA, Pichichero ME, Bakaletz LO. Epitope mapping of the outer membrane protein P5-homologous fimbrial adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2000;68:2119-2128.
948. Nsanze H, Plummer FA, Maggwa ABN, et al. Comparison of media for the primary isolation of *Haemophilus ducreyi*. *Sex Transm Dis* 1984;11:6-9.
949. Nurnberger M, Treadwell T, Lin B, Weintraub A. Pacemaker lead infection and vertebral osteomyelitis presumed due to *Cardiobacterium hominis*. *Clin Infect Dis* 1998;27:890-891.
950. Nye KJ, Fallon D, Gee B, et al. A comparison of the performance of bacitracin-incorporated chocolate blood agar with a chocolate blood agar plus a bacitracin disk in the isolation of *Haemophilus influenzae* from sputum. *J Med Microbiol* 2001;50:472-475.
951. Nygren M, Reizenstein F, Ronaghi M, Lundberg J. Polymorphism in the pertussis toxin promoter region affecting the DNA-based diagnosis of *Bordetella* infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:55-60.
952. Oberhofer TR, Back AE. Biotypes of *Haemophilus influenzae* encountered in clinical laboratories. *J Clin Microbiol* 1979;10:168-174.
953. O'Bryan TA, Whitener CJ, Katzman M, et al. Hepatobiliary infections caused by *Haemophilus* species. *Clin Infect Dis* 1992;15:716-719.
954. Ochiai K, Senpuku H, Kurita-Ochiai T. Purification of an immunosuppressive factor from *Capnocytophaga ochracea*. *J Med Microbiol* 1998;47:1087-1095.
955. Ochiai T, Ochiai K, Saito N, et al. Adoptive transfer of suppressor T-cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* regulates immune response. *J Periodontol Res* 1999;29:1-8.
956. O'Connor SP, Dorsch M, Seigerwalt AG, et al. 16S rRNA sequences of *Bartonella* bacilliformis and cat-scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the α -2 subgroup of the class Proteobacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29:2144-2150.
957. Odeh M, Oliven A. Acute pancreatitis associated with brucellosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:691-692.
958. Odeh M, Pick N, Oliven A. Deep venous thrombosis associated with acute brucellosis: a case report. *Angiology* 2000;1:253-256.
959. Ogilvie C, Omikunle A, Wang Y, et al. Capsulation loci of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 2001;184:144-149.
960. O'Halloran HS, Draud K, Minix M, et al. Leber's neuroretinitis in a patient with serologic evidence of *Bartonella elizabethae*. *Retina* 1998;18:276-278.

961. Oll ME, Spach DH. Bartonella quintana and urban trench fever. Clin Infect Dis 2000;31:131-135.
962. Olli PA, Chow AW, Guze LB. Adult bacteremic *Haemophilus parainfluenzae* infections: seven reports of cases and a review of the literature. Arch Intern Med 1979;139:985-988.
963. Oluoku IC, Chisty C. Rat bite fever in children: case report and review. Scand J Infect Dis 2002;34:474-477.
964. Okada K, Ueda K, Morokuma K, et al. Comparison of antibody titers in eleven-to twelve-year old Japanese school children six years after administration of acellular and whole cell pertussis vaccines combined with diphtheria-tetanus toxoids. Pediatr Infect Dis 1998;17:1167-1168.
965. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, et al. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Lancet 1997;350:1569-1570.
966. Oliveira S, Splitter GA. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against rucella abortus infection. Vaccine 1996;14:959-962.
967. Olk DG, Hamill RJ, Procter RA. Case report: *Haemophilus parainfluenzae* vertebral osteomyelitis. Am J Med Sci 1987;294:114-116.
968. Olopoenia LA, Mody V, Reynolds M. Eikenella corrodens endocarditis in an intravenous drug user: case report and literature review. J Natl Med Assoc 1994;86:313-315.
969. Olsen I. Recent approaches to the chemotaxonomy of the *Actinobacillus-Haemophilus-Pasteurella* group (Family Pasteurellaceae). Oral Microbiol Immunol 1993;8:327-336.
970. Omikunle A, Takahashi S, Ogilvie CL, et al. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 2002;40:1264-1270.
971. O'Reilly KL, Bauer RW, Freeland RL, et al. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16). Infect Immun 1999;67:3066-3072.
972. Orenstein WA. Pertussis in adults: epidemiology, signs, symptom, and implications for vaccination. Clin Infect Dis 1999;28(Suppl 2):S147-S150.
973. Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. J Clin Microbiol 1996;34:49-54.
974. Ory JM, Chuard C, Regamey C. *Pasteurella multocida* pneumonia with empyema. Scand J Infect Dis 1998;30:313-314.
975. Osawa R, Rainey F, Fujisawa T, et al. *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a new tannin-protein complex degrading bacterium. Syst Appl Microbiol 1995;18:368-373.
976. Oscherwitz SL. Brucellar bacteremia in pregnancy. Clin Infect Dis 1995;21:714-715.
977. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, et al. Diagnostic value of Brucella ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. J Chemother 2001;13(Suppl 1):54-59.
978. Ozkurt Z, Erol Z, Tasyaran MA, Kaya A. Detection of Brucella melitensis by the BacT/Alert automated system and Brucella broth culture. Clin Microbiol Infect 2002;8:749-752.
979. Paavonen J, Lehtinen M, Teisala K, et al. *Haemophilus influenzae* causes purulent salpingitis. Am J Obstet Gynecol 1985;151:338-339.
980. Paju S, Carlson PO, Jousimies-Somer H, Aiskainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. J Clin Microbiol 2000;38:79-84.
981. Pajukanta R, Aiskainen S, Saarela M, et al. In vitro activity of azithromycin compared with that of erythromycin against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1241-1243.
982. Pajukanta R, Aiskainen S, Saarela M, et al. Evaluation of the E test for antimicrobial susceptibility testing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol 1992;7:376-377.
983. Pajukanta R, Aiskainen S, Saarela M, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Scand J Dent Res 1993;101:299-303.
984. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. Int J Infect Dis 2000;4:55-56.
985. Parenti DM, Snyderman DR. *Capnocytophaga* species: infections in nonimmunocompromised and immunocompromised hosts. J Infect Dis 1985;151:140-147.
986. Parsons LM, Shayegani M, Waring AL, et al. DNA probes for the identification of *Haemophilus ducreyi*. J Clin Microbiol 1989;27:1441-1445.
987. Patel A, Asirvatham S, Sebastian C, et al. Polymicrobial endocarditis with *Haemophilus parainfluenzae* in an intravenous drug user whose transesophageal echocardiogram appeared normal. Clin Infect Dis 1998;26:1245-1246.
988. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, et al. Relationship between bacterial colonization and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. Thorax 2002;57:759-764.
989. Paton HG, Ormerod LD, Peppe J, et al. Evidence for a feline reservoir for dysgonic fermenter 2 keratitis. J Clin Microbiol 1988;26:2439-2440.
990. Paul K, Patel SS. *Eikenella corrodens* infections in children and adolescents: case reports and review of the literature. Clin Infect Dis 2001;33:54-61.
991. Paul RV, Rostand SG. Cat bite prionitis: *Pasteurella multocida* peritonitis following feline contamination of peritoneal dialysis tubing. Am J Kidney Dis 1987;10:318-319.
992. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbium. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:13148-13153.
993. Pavicic MJAMP, van Winkelhoff AJ, DeGraff J. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2634-2638.
994. Peake JE, Slaughter BD. Hemorrhagic conjunctivitis and invasive *Haemophilus influenzae* type b infection. Pediatr Infect Dis J 1994;13:230-231.
995. Peek RM, Truss C. Secretory diarrhea following a dog bite. Dig Dis Sci 36:1991;1151-1153.
996. Peel MM. Dog-associated bacterial infections in humans: isolates submitted to an Australian reference laboratory, 1981-1992. Pathology 1993;25:379-384.
997. Peel MM, Hornidge KA, Luppino M, et al. *Actinobacillus* spp. and related bacteria in infected wounds of humans bitten by horses and sheep. J Clin Microbiol 29:2535-2538, 1991.
998. Peltola H. Prophylaxis of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed. Infectious Disease Clinics of North America. Vol 13. Bacterial Meningitis. Philadelphia: Saunders, 1999:685-710.
999. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 year after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000;13:302-317.
1000. Perez-Calvo J, Matamala C, Sanjoaquin I, et al. Epidural abscess due to acute Brucella melitensis infection. Arch Intern Med 1994;154:1410-1411.
1001. Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol 1995;33:1486-1491.
1002. Perkocha LA, Geaghan SM, Benedict TS, et al. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1990;323:1581-1586.
1003. Pers C, Gahrn-Hansen B, Frederiksen W. Capnocytophaga canimorsus septicemia in Denmark, 1982-1995: review of 39 cases. Clin Infect Dis 1996;23:71-75.
1004. Peruski AH, Johnson LH III, Peruski LF Jr. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. J Immunol Methods 2002;263:35-41.
1005. Peter G, Hall CB, Halsey NA, et al. *Haemophilus influenzae* infections. In: 1997 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases 24th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 1997:222-231.
1006. Peters VB, Sood S. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide capsule in children with human immunodeficiency virus infection immunized with a single dose of *Haemophilus* vaccine. J Pediatr 1994;125:74-77.
1007. Petrocheilou-Pashou, Georgilis K, Kostis E, et al. Bronchitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in an elderly woman. Clin Microbiol Infect 2000;6:147-148.
1008. Pettigrew MM, Foxman B, Marrs CF, Gilsdorf JR. Identification of the lipooligosaccharide biosynthesis gene *lic2B* as a putative virulence factor in strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* that cause otitis media. Infect Immun 2002;70:3551-3556.
1009. Phillips JE, Genus III. *Actinobacillus* Brumpt 1910, 849AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore: William & Wilkins, 1984:570-575.
1010. Phipps SE, Tamblin DM, Badenoch PR. *Capnocytophaga canimorsus* endophthalmitis following cataract surgery. Clin Exp Ophthalmol 2002;30:375-377.
1011. Pichichero ME, Casey JR. Otitis media. Expert Opin Pharmacother 2002;3:1073-1090.
1012. Pichichero ME, Deloria MA, Rennels MB, et al. A safety and immunogenicity comparison of 12 acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis given as a fourth dose in 15- to 20-month old children. Pediatrics 1997;100:772-788.
1013. Pillai A, Mitchell JL, Hill SL, Stockley RA. A case of *Haemophilus parainfluenzae* pneumonia. Thorax 2000;55:623-624.
1014. Pins MR, Holden JM, Yang JM, et al. Isolation of presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital tract. Clin Infect Dis 1996;22:471-476.
1015. Pittman M. Genus *Bordetella* Moreno-Lopez 1952, 178AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. Vol 1. Baltimore. Williams & Wilkins, 1984:388-393.
1016. Pittman T, Williams D, Friedman AD. A shunt infection caused by *Francisella tularensis*. Pediatr Neurosurg 1996;24:50-51.
1017. Plettenberg A, Loretan T, Burtische BT, et al. Bacillary angiomatosis in HIV-infected patients: an epidemiological and clinical study. Dermatology 2000;201:326-331.
1018. Plourde PJ, Embree J, Friesen F, et al. Glandular tularemia with typhoidal features in a Manitoba child. Can Med Assoc J 1992;146:1953-1955.
1019. Pohl S, Bertschinger U, Fredericksen W, et al. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia in the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int J Syst Bacteriol 1983;33:510-514.
1020. Porter JF, Connor K, Donachie W. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. Microbiology 1994;140:255-261.
1021. Portnoy BL, Satterwhite TK, Dyckman JK. Rat bite fever misdiagnosed as Rocky Mountain spotted fever. South Med J 1979;72:607-609.
1022. Porto MHO, Noel GJ, Edelson PJ, et al. Resistance to serum bactericidal activity distinguishes Brazilian purpuric fever (BPF) case strains of *Haemophilus influenzae* biogroup *egyptius* (*H. aegyptius*) from non-BPF strains. J Clin Microbiol 1988;27:792-794.

1023. Postels-Multani S, Schmitt HJ, Wirsing Von Konig CH, et al. Symptoms and complications of pertussis in adults. *Infection* 1995;23:139-142.
1024. Potts TV, Zambon JJ, Genco RJ. Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:337-341.
1025. Povedras P, Donnio PY, Le Tulzo Y, et al. *Pasteurella stomatis* infection following a dog bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:65.
1026. Prasadarao NV, Lysenko E, Wass CA, et al. Opacity-associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to Chang epithelial cells. *Infect Immun* 1999;67:4153-4160.
1027. Pratt J, Cooley JD, Purdy CW, Straus DC. Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Curr Microbiol* 2000;40:306-309.
1028. Preus HR, Sunday GJ, Haraszthy VI, et al. Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* based on analysis of 23S ribosomal RNA. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:372-375.
1029. Prior RB, Spagna VA, Perkins RL. Endocarditis due to a strain of *Cardiobacterium hominis* resistant to erythromycin and vancomycin. *Chest* 1979;75:85-86.
1030. Pritchard TM, Foust RT, Cantey JR, et al. Prosthetic valve endocarditis due to *Cardiobacterium hominis* occurring after upper gastrointestinal endoscopy. *Am J Med* 1991;90:516-518.
1031. Privitera A, Licciardello L, Giannino V, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of *Haemophilus parainfluenzae* from chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Eur J Epidemiol* 1998;14:405-412.
1032. Progulskas A, Mishell R, Trummel C, Holt SC. Biological activities of *Eikenella corrodens* outer membrane and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1984;43:178-182.
1033. Provdenza JM, Klotz SA, Penn RL. Isolation of *Francisella tularensis* from blood. *J Clin Microbiol* 1986;24:453-455.
1034. Purdy D, Khardon N, Abbas F, et al. Postoperative pancreatic abscess due to *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 1993;17:49-51.
1035. Quentin R, Dubarry I, Martin C, et al. Evaluation of four commercial methods for identification and biotyping of genital and neonatal strains of *Haemophilus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:546-549.
1036. Quentin R, Goudeau A, Wallace RJ Jr, et al. Urogenital, maternal, and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae*: identification of unusually virulent serologically non-typeable clone families and evidence for a new *Haemophilus* species. *J Gen Microbiol* 1990;136:1203-1209.
1037. Quentin R, Manin C, Musser JM, et al. Genetic characterization of a cryptic genospecies of *Haemophilus* causing urogenital and neonatal infections. *J Clin Microbiol* 1993;31:1111-1116.
1038. Quentin R, Musser JM, Mellouett M, et al. Typing of urogenital, maternal, and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in correlation with clinical course of isolation and evidence for a genital specificity of *Haemophilus influenzae* biotype IV. *J Clin Microbiol* 1989;27:2286-2294.
1039. Quile I, Blazquez JC, De Teresa L, et al. Vertebral osteomyelitis due to *Pasteurella aerogenes*. *Scand J Infect Dis* 2000;32:566-567.
1040. Raab MG, Lutz RA, Stauffer ES. *Eikenella corrodens* vertebral osteomyelitis: a case report and literature review. *Clin Orthop* 1993;293:144-147.
1041. Raad I, Rand K, Gaskins D. Buffered charcoal yeast extract medium for the isolation of brucellae. *J Clin Microbiol* 1990;28:1671-1672.
1042. Radolf JD. Brucellosis: don't let it get your goat. *Am J Med Sci* 1994;307:64-75.
1043. Raffi F, Barner J, Baron D, et al. *Pasteurella multocida* bacteremia: report of 13 cases over 12 years and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 1987;19:385-393.
1044. Rahman A, Burma O, Felek S, Yeiteler H. Atrial septal defect presenting with Brucella endocarditis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:776-777.
1045. Ramdeen GD, Smith RJ, Smith EA, et al. *Pasteurella multocida* tonsillitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1995;20:1055-1057.
1046. Ramos JM, Pacho E, Garcia-Valle B, et al. Splenic abscess due to *Eikenella corrodens*. *Postgrad Med J* 1994;70:848-849.
1047. Rank EL, Matadour M, Zimmerman SE. Problems with species identification of *Pasteurella* sp new species 1: two case reports. *Clin Microbiol Newslett* 1984;6:166-167.
1048. Raoult D, Birtles RJ, Montoya M, et al. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. *Clin Infect Dis* 1999;29:434-436.
1049. Raoult D, Drancourt M, Cana A, Gastaut JA. Bartonella (Rochalimaea) quintana isolation in a patient with chronic lymphadenopathy, lymphopenia, and a cat. *Lancet* 1994;343:977.
1050. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, et al. Diagnosis of 22 new cases of Bartonella endocarditis. *Ann Intern Med* 1996;125:646-652.
1051. Raucher B, Dobkin J, Mandel L, et al. Occult polymicrobial endocarditis with *Haemophilus parainfluenzae* in intravenous drug abusers. *Am J Med* 1989;86:169-172.
1052. Rechtman DJ, Nadler JP. Abdominal abscess due to *Cardiobacterium hominis* and Clostridium bifermentans. *Rev Infect Dis* 1991;13:418-419.
1053. Redfield DC, Overturf GD, Ewing ND, et al. Bacteria, arthritis, and skin lesions due to *Kingella kingae*. *Arch Dis Child* 1980;55:411-414.
1054. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time PCR detection of Brucella abortus, Brucella melitensis, and Brucella suis. *Mol Cell Probes* 2001;15:43-52.
1055. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 2002;90:81-110.
1056. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1977;6:303-309.
1057. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, et al. Characterization of a novel Rochalimaea species, R. henselae sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992;30:265-274.
1058. Regnery RL, Martin M, Olson J. Naturally occurring "*Rochalimaea henselae*" infection in domestic cats. *Lancet* 1992;340:557-558.
1059. Regnery RL, Olson JC, Perkins BA, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992;339:1443-1445.
1060. Reina J, Bassa A, Llompart I, et al. Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a patient with a thoracic trauma. *Infection* 1991;19:46-48.
1061. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg Infect Dis* 2002;8:69-73.
1062. Reitman CA, Watters WC III. Spinal brucellosis: case report in the United States. *Spine* 2002;27:E250-E252.
1063. Reizenstein E, Lindberg L, Mollby R, Hallander HO. Validation of nested *Bordetella* PCR in pertussis vaccine trial. *J Clin Microbiol* 1996;34:810-815.
1064. Relman DA, Dontenighini M, Tuomanen E, et al. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2637-2641.
1065. Relman DA, Falkow S, LeBoit PE, et al. The organism causing bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, and fever and bacteremia in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 1991;324:1514.
1066. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, et al. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990;323:1573-1580.
1067. Reyn A, Birch-Anderson A, Murray RGE. The fine structure of *Cardiobacterium hominis*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971;79:51-60.
1068. Rhyan JC, Gidlewski T, Ewait DR, et al. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with Brucella sp. isolated from a Pacific harbor seal (Phoca vitulina richardsi). *J Vet Diagn Invest* 2001;13:379-382.
1069. Ribeiro GA, Carter GR, Frederiksen W, et al. *Pasteurella haemolytica*-like bacterium from a progressive granuloma of cattle in Brazil. *J Clin Microbiol* 1989;27:1401-1402.
1070. Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J Infect Dis* 2003;187:109-116.
1071. Riggio MP, Lennon A. Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, and *Haemophilus paraphrophilus* by restriction enzyme analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1630-1632.
1072. Riley LK, Robertson DR. Ingestion and survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1984;46:224-230.
1073. Riley UB, De P. *Pasteurella multocida*: an uncommon cause of obstetric and gynaecological sepsis. *J Infect* 1995;31:51-53.
1074. Risi GF, Plombo DJ. Relapse of tularemia after aminoglycoside therapy: case report and discussion of therapeutic options. *Clin Infect Dis* 1995;20:174-175.
1075. Ristic M, Kreier JP, Family II. *Bartonellaceae* Gieszczykiewicz 1939, 25th. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:717-719.
1076. Rivero M, Hunter GC, Brooker J, et al. Aortic graft infection due to *Pasteurella haemolytica* and group C β -hemolytic streptococcus. *Clin Infect Dis* 1994;19:941-943.
1077. Robinson-Dunne B. The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:291-294.
1078. Roblot P, Bazillou M, Grolier G, et al. Septicemia due to *Capnocytophaga canimorsus* after a dog bite in a cirrhotic patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:302-303.
1079. Rodgers BL, Duffield RP, Taylor T, et al. Tularemic meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:439-441.
1080. Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, et al. Genomic fingerprinting of Bartonella species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol* 1993;31:1089-1093.
1081. Roe DE, Braham PH, Weinberg A, et al. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:227-232.
1082. Roebuck JD, Morris JT. Chronic otitis media due to EF4 bacteria. *Clin Infect Dis* 1999;29:1343-1344.
1083. Rogers BT, Anderson JC, Palmer CA, et al. Septicaemia due to *Pasteurella pneumotropica*. *J Clin Pathol* 1973;26:396-398.
1084. Roggen EL, Pansaens R, Van Dyck E, et al. Antigen detection and immunological typing of *Haemophilus ducreyi* with a specific rabbit, polyclonal serum. *J Clin Microbiol* 1993;31:1820-1825.
1085. Rohrbach BW, Westerman E, Istre GR. Epidemiology and clinical characteristics of tularemia in Oklahoma, 1979-1985. *South Med J* 1991;84:1091-1096.
1086. Roiz MP, Peralta FG, Arjona R. *Kingella kingae* bacteremia in an immunocompetent adult host. *J Clin Microbiol* 1997;35:1916.
1087. Rolle U, Schille R, Hormann D, et al. Soft tissue infection caused by *Kingella kingae* in a child. *J Pediatr Surg* 2001;36:946-947.
1088. Ronald AR, Albritton W. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, et al., eds. *Sexually Transmitted Diseases*, 3rd Ed. New York: McGraw-Hill, 1999:515-523.
1089. Ronnevik PK, Neess HC. Septicemia caused by *Cardiobacterium hominis* a case report. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1981;89:243-244.
1090. Rordorf T, Zuger C, Zbinden R, et al. *Streptobacillus moniliformis* endocarditis in an HIV-positive patient. *Infection* 2002;28:393-394.
1091. Roscoe DL, Zemcov SJV, Thorner D, et al. Antimicrobial susceptibilities and β -lactamase characterization of *Capnocytophaga* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2197-2200.

1092. Rosenau A, Cattier B, Gousset N, et al. Capnocytophaga ochracea characterization of a plasmid-encoded extended spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum Flavobacter-Bacteroides. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:760-762.
1093. Rosenau A, Labigne A, Escande F, et al. Plasmid-mediated ROB-1 β -lactamase in *Pasteurella multocida* from a human specimen. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:2419-2422.
1094. Rosenau A, Sizarel PY, Musser JM, et al. Adherence to human cells of a cryptic *Haemophilus* genospecies responsible for genital and neonatal infections. Infect Immun 1993;61:4112-4118.
1095. Rosenbach KA, Poblete J, Larkin I. Prosthetic valve endocarditis caused by *Pasteurella dagmatis*. Soath Med J 2001;94:1033-1035.
1096. Rosenbaum GS, Calubiran O, Cunha BA. *Haemophilus parainfluenzae* bacteremia associated with a pacemaker wire localized by gallium scan. Heart Lung 1990;19:271-273.
1097. Rosenfeld JA, Clarity G. Acute otitis media in children. Prim Care 1996;23:677-686.
1098. Roson B, Carratala J, Verdager R, et al. Prospective study of the usefulness of the Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Clin Infect Dis 2000;31:869-874.
1099. Rossau R, Duhamel M, Jannes G, et al. The development of specific rRNA-derived oligonucleotide probes for *Haemophilus ducreyi* the causative agent of chancroid. J Gen Microbiol 1991;137:277-285.
1100. Rossau R, Vandenbussche G, Thielemans S, et al. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and deoxyribonucleic acid homologies of *Neisseria* Kingella, Eikenella Simonsiella, Alysiaella and Centers for Disease Control Groups EF4 and M-5 in the emended family Neisseriaceae. Int J Syst Bacteriol 1989;39:185-198.
1101. Rothstein EP, Anderson EL, Decker MD, et al. An acellular pertussis vaccine in healthy adults: safety and immunogenicity. Pennridge Pediatric Associates. Vaccine 1999;17:2999-3006.
1102. Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2000;38:1698-1700.
1103. Roux V, Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. J Clin Microbiol 1999;37:596-599.
1104. Rowbotham TJ. Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. Lancet 1983;2:567.
1105. Rubin LG, Gloster ES, Carlone GM, et al. An infant rat model of bacteremia with Brazilian purpuric fever isolates of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. J Infect Dis 1989;160:476-482.
1106. Rubsamen PE, McLeish WM, Pflugfelder S, et al. *Capnocytophaga endophthalmitis*. Ophthalmology 1993;100:456-459.
1107. Ruddock TL, Rindler JM, Bergfeld WF. Capnocytophaga canimorsus septicemia in an asplenic patient. Cutis 1997;60:95-97.
1108. Ruiz-Irastorza G, Carea C, Alonso JJ, et al. Septic shock due to *Pasteurella multocida* subspecies multocida in a previously healthy woman. Clin Infect Dis 1995;21:232-234.
1109. Rummens I-L, Gordts B, Van Landuyt HW. In vitro susceptibility of Capnocytophaga species to 29 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1986;30:739-742.
1110. Rupp ME. Streptobacillus moniliformis endocarditis: case report and review. Clin Infect Dis 1992;14:769-772.
1111. Rydkina EB, Rou V, Gagua EM, et al. Bartonella quintana in body lice collected from homeless persons in Russia. Emerg Infect Dis 1999;5:176-178.
1112. Rygg M, Bruun CF. Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a child. Scand J Infect Dis 1992;24:535-540.
1113. Saab M, Corcoran IP, Southworth SA, Randell PE. Fatal septicemia in a previously healthy man following a dog bite. Int J Clin Pract 1998;52:205.
1114. Saadati M, Gibbs HA, Parton R, Coote JG. Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*. J Med Microbiol 1997;46:276-284.
1115. Saadeh AM, Abu-Farsakh NA, Omari HZ. Infective endocarditis and occult splenic abscess caused by *Brucella melitensis* infection: a case report and review of the literature. Acta Cardiol 1996;51:279-285.
1116. Saarela M, Asikainen S, Jousimies-Somer H, et al. Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected with an rRNA gene probe. Oral Microbiol Immunol 1993;8:111-115.
1117. Saarela M, Dogan B, Alaiiusua S, et al. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). J Periodontol 1999;70:504-509.
1118. Sacco RE, Register KB, Nordholm GE. Restriction enzyme analysis and ribotyping distinguish *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii* isolates. Epidemiol Infect 2000;124:83-90.
1119. Saez-Llorens X, McCracken GH Jr. Antimicrobial and anti-inflammatory treatment of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed. Infectious Disease Clinics of North America. Vol. 13. Bacterial meningitis. Philadelphia: Saunders, 1999:619-636.
1120. Saito A, Hosaka Y, Nakagawa T, et al. Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1993;8:146-153.
1121. Salgado F, Grana M, Ferrer V, et al. Splenic infarction associated with acute *Brucella melitensis* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:63-64.
1122. Sanden GN, Cassidy PK, Barbaree JM. Rapid immunoblot technique for identifying *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1993;31:170-172.
1123. Sander A, Buhler C, Pelz K, et al. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. J Clin Microbiol 1997;35:584-587.
1124. Sander A, Penno S. Semiquantitative species-specific detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1999;37:3097-3101.
1125. Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:486-490.
1126. Sander A, Zagrosek A, Bredt W, et al. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. J Clin Microbiol 2000;38:2943-2948.
1127. Sandstrom C, Lofgren S, Tarnvik A. A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis*. LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1988;56:1194-1202.
1128. Sandstrom G, Sjosledt A, Forsman M, et al. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and Japan. J Clin Microbiol 1992;30:172-175.
1129. Sandstrom G, Sjosledt A, Johansson T, et al. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. FEMS Microbiol Immunol 1993;5:201-210.
1130. Sane SM, Faerber RN, Belani KK. Respiratory foreign bodies and Eikenella corrodens brain abscess in two children. Pediatr Radiol 1999;29:327-330.
1131. Sanford JP. Brucella pneumonia. Semin Respir Infect 1997;12:24-27.
1132. Santini C, Baiocchi P, Berardelli A, et al. A case of brain abscess due to *Brucella melitensis*. Clin Infect Dis 1994;19:977-978.
1133. Santos R, Cardoso O, Rodrigues P, et al. Bacillary angiomatosis by *Bartonella quintana* in an HIV-infected patient. J Am Acad Dermatol 2000;42:299-301.
1134. Sarangi J, Cartwright K, Stuart J, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. Epidemiol Infect 2000;124:441-447.
1135. Sari R, Buyukberber N, Sevinc A, et al. Brucellosis in the etiology of febrile neutropenia: case report. J Chemother 2002;14:88-91.
1136. Sarria JC, Vidal AM, Kimbrough RC III. *Haemophilus influenzae* osteomyelitis in adults: a report of 4 frontal bone infections and a review of the literature. Scand J Infect Dis 2001;33:263-265.
1137. Sarria C, Vidal M, Kimbrough C III, Figueroa E. Fatal infection caused by *Francisella tularensis* in a neutropenic bone marrow transplant recipient. Ann Hematol 2003;82:41-43.
1138. Sato T, Fujita H, Ohara Y, et al. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. J Clin Microbiol 1990;28:2372-2374.
1139. Sawmiller CJ, Dudrick SJ, Hamzi M. Postsplenectomy *Capnocytophaga canimorsus* sepsis presenting as an acute abdomen. Arch Surg 1998;133:1362-1365.
1140. Scannapieco FA, Millar SJ, Reynolds HS, et al. Effect of anaerobiosis on the surface ultrastructure and surface proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Haemophilus actinomycetemcomitans*). Infect Immun 1987;55:2320-2323.
1141. Schalla WO, Sanders LL, Schmid CP, et al. Use of dot immunobinding and fluorescence assays to investigate clinically suspected cases of chancroid. J Infect Dis 1986;153:879-887.
1142. Scheel O, Hoel T, Sandvik T, et al. Susceptibility pattern of Scandinavian *Francisella tularensis* isolated with regard to oral and parenteral antimicrobial agents. APMIS 1993;101:33-36.
1143. Scheel O, Reiersen R, Hoel T. Treatment of tularemia with ciprofloxacin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:447-448.
1144. Schlater LK, Brenner DJ, Steigerwalt AC, et al. *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. J Clin Microbiol 1989;27:2169-2174.
1145. Schlosser RJ, London SD, Gwaltney JM Jr. Gross CW. Microbiology of chronic frontal sinusitis. Laryngoscope 2001;111:1330-1332.
1146. Schmidt ME, Smith MA, Levy CS. Endophthalmitis caused by unusual gram-negative bacilli: three case reports and review. Clin Infect Dis 1993;17:686-690.
1147. Schmitt HJ, Wirsing Von Konig CH, Neiss A, et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. JAMA 1996;275:37-41.
1148. Schmitt-Grohe S, Cherry JD, Heininger U, et al. Pertussis in German adults. Clin Infect Dis 1995;21:860-866.
1149. Schonheyder H, Ejertson T, Frederiksen W. Isolation of a dysgonic fermenter (DF-3) from urine of a patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991;10:530-531.
1150. Schouls LM, van de Pol I, Rijpkema SCT, Schot CS. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. J Clin Microbiol 1999;37:2215-2222.
1151. Schwartz RA, Gallardo MA, Kapila R, et al. Bacillary angiomatosis in an HIV seronegative patient on systemic steroid therapy. Br J Dermatol 1996;135:982-987.
1152. Schwartzman WA, Patnaik M, Angulo FJ, et al. Bartonella (Rochalimaea) antibodies, dementia, and cat ownership among men infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1995;21:954-959.
1153. Schwartzman WA, Patnaik M, Barka NE, et al. Rochalimaea antibodies in HIV-associated neurologic disease. Neurology 1994;44:1312-1316.
1154. Sedlacek I, Gerner-Smidt P, Schmidt J, et al. Genetic relationship of *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* studies by ribotyping. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993;279:51-59.
1155. Seger RA, Hollis DG, Weaver RE, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: fatal septicemia caused by an unnamed gram-negative bacterium. J Clin Microbiol 1982;16:821-825.
1156. Seger RA, Kloeti J, Von Gravenitz A, et al. Cervical abscess due to Capnocytophaga ochracea. Pediatr Infect Dis 1982;1:170-172.
1157. Senol M, Ozcan A, Karincagolu Y, et al. Tularemia: a case transmitted from a sheep. Cutis 1999;63:49-51.

1158. Sen MA, Brown EW, Wilson LR, Crocker TP. Fatal *Streptobacillus moniliformis* infection in a two-month-old infant. *Am J Clin Pathol* 1989;91:612-616.
1159. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:336-363.
1160. Setta F, Baecke M, Jacquy J, et al. Cerebellar ataxia following whooping cough. *Clin Neurol Neurosurg* 1999;101:56-61.
1161. Severien C, Teig N, Riedel F, et al. Severe pneumonia and chronic lung disease in a young child with adenovirus and *Bordetella pertussis* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:400-401.
1162. Sevinc A, Kutlu NO, Kuku I, et al. Severe epistaxis in brucellosis-induced isolated thrombocytopenia: a report of two cases. *Clin Lab Haematol* 2000;22:373-375.
1163. Shah GM, Winer RL. Glomerulonephritis associated with endocarditis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Am J Kidney Dis* 1981;1:113-115.
1164. Shanson DC, Gazzard BG. *Kingella kingae* septicaemia with a clinical presentation resembling disseminated gonococcal infection. *BMJ* 1984;289:730-731.
1165. Shanson DC, Gazzard BG, Midgley J, et al. *Streptobacillus moniliformis* isolated from blood in four cases of Haverhill fever: first outbreak in Britain. *Lancet* 1983;2:92-94.
1166. Shanson DC, Pratt J, Greene P. Comparison of media with and without "Panemede" for the isolation of *Streptobacillus moniliformis* from blood cultures and observations on the inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate. *J Med Microbiol* 1985;19:181-186.
1167. Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, et al. The secretion of PGE₂, IL-1 β , IL-6, and TNF- α by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65:139-146.
1168. Shapiro DS, Brooks PE, Coffey DM, Browne KF. Peripartum bacteremia with CDC group HB-5 (*Pasteurella bettyae*). *Clin Infect Dis* 1996;22:1125-1126.
1169. Shawar R, Sepulveda J, Clarridge JE. Use of the RapID-ANA system and sodium polyanetholsulfonate disk susceptibility testing in identifying *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol* 1990;28:108-111.
1170. Sheng WS, Hsueh PR, Hung CC, et al. Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristics of the causative isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:231-236.
1171. Shenoy S, Kavitha R, Lasmi V, et al. Septic arthritis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Indian J Pediatr* 1996;63:569-570.
1172. Shimshony A. Epidemiology of emerging zoonoses in Israel. *Emerg Infect Dis* 1997;3:229-238.
1173. Shoshan Y, Maayan S, Gomori MJ, Israel Z. Chronic subdural empyema: a new presentation of neurobrucellosis. *Clin Infect Dis* 1996;23:400-401.
1174. Shurin SB, Socransky SS, Sweeney E, et al. A neutrophil disorder induced by Capnocytophaga, a dental microorganism. *N Engl J Med* 1979;301:849-854.
1175. Sicherer SH, Asturias EJ, Winkelstein JA, et al. Francisella philomiragia sepsis in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:420-422.
1176. Sikkema DJ, Murphy TF. Molecular analysis of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1992;60:5204-5211.
1177. Simon MW, Mitchell BL, O'Connor WN, et al. Glomerulonephritis, pulmonary hemorrhage, and coagulopathy associated with *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:183-185.
1178. Simonsen JN, Cameron DW, Gakinya MN, et al. Human immunodeficiency virus infection in men with sexually transmitted diseases: experience from a center in Africa. *N Engl J Med* 1988;319:274-278.
1179. Singhi SC, Mohankumar D, Singhi PD, et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing *Haemophilus influenzae* type b meningitis. *Ann Trop Paediatr* 1999;22:347-353.
1180. Sinnott JT, Blazejowski C, Bazzini MD. *Bordetella bronchiseptica* endocarditis: a tale of a boy and his dog. *Clin Microbiol Newslett* 1989;11:111-112.
1181. Siverio CD Jr, Whitcher JP. *Haemophilus influenzae* corneal ulcer associated with atopic keratoconjunctivitis and herpes simplex keratitis (letter). *Br J Ophthalmol* 2002;86:478-479.
1182. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tarnvik A. Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:1045-1048.
1183. Sjöstedt A, Sandstrom G, Tarnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain Francisella tularensis LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. *J Clin Microbiol* 1990;28:43-48.
1184. Slater LN, Coody DW, Woolridge LK, et al. Murine antibody responses distinguish Rochalimaea henselae from Rochalimaea quintana. *J Clin Microbiol* 1992;30:1722-1727.
1185. Slater LN, Min KW. Polypoid endobronchial lesion: a manifestation of bacillary angiomatosis. *Chest* 1992;102:972-974.
1186. Slater LN, Pitha JV, Herrera L, et al. Rochalimaea henselae infection in acquired immunodeficiency syndrome causing inflammatory disease without angiomatosis or peliosis. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:33-38.
1187. Slater LN, Welch DF, Hensel D, et al. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* 1990;323:1587-1593.
1188. Slater LN, Welch DF, Min K-W. Rochalimaea henselae causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med* 1992;152:602-606.
1189. Slonim A, Walker ES, Mishori E, et al. Person-to-person transmission of Kingella kingae among day care center attendees. *J Infect Dis* 1998;178:1843-1846.
1190. Slotnick IJ, Dougherty M. Further characterization of an unclassified group of bacteria causing endocarditis in man: Cardiobacterium hominis gen. et sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 1964;30:261-272.
1191. Smith HM, Reporter R, Rood MP, et al. Prevalence study of antibody to rabinose pathogens and other agents among patients using a free clinic in downtown Los Angeles. *J Infect* 2002;86:1673-1676.
1192. Smith KJ, Skelton HC, Tuur S, et al. Bacillary angiomatosis in an immunocompetent child. *Am J Dermatopathol* 1996;18:597-600.
1193. Smith S, Tilton RC. Acute Bordetella pertussis infection in an adult. *J Clin Microbiol* 1996;34:429-430.
1194. Sneath PHA, Stevens M. Actinobacillus rossii sp. nov., Actinobacillus seminis sp. nov. nom. rev., Pasteurella bettii sp. nov., Pasteurella lymphagitis sp. nov., Pasteurella mairi sp. nov., and Pasteurella trehalosi sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40:148-153, 1990.
1195. Snell JJS, Cenus IV. Kingella Henriksen and Bovre 1976, 449AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:307-309.
1196. Snell JJS, LaPage SP. Transfer of some saccharolytic Moraxella species to Kingella Henriksen and Bovre 1976, with descriptions of Kingella indologenes sp. nov. and Kingella dentrificans sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1976;26:451-458.
1197. Snipes KP, Biberstein EL. Pasteurella testudinis sp. nov.: a parasite of desert tortoises (Gopherus agassizi). *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:201-210.
1198. Sobraques M, Maurin M, Birtles RJ, Raoult D. In vitro susceptibilities of four Bartonella bacilliformis strains to 30 antibiotic compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2090-2092.
1199. Socransky SS, Holt SC, Leadbetter EP, et al. Capnocytophaga: a new genus of gram-negative gliding bacteria. III. Physiological characterization. *Arch Microbiol* 1979;122:29-33.
1200. Sokol W. Epidemiology of sinusitis in the primary care setting: results from the 1999-2000 respiratory surveillance program. *Am J Med* 2001;111(Suppl 9A): 19S-24S.
1201. Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, et al. Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis* 1999;29:1410-1449.
1202. Sorbello AF, O'Donnell J, Kaiser-Smith J, et al. Infective endocarditis due to Pasteurella dagmatis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:226-228.
1203. Sordillo EM, Rendel M, Sood R, et al. Septicemia due to β -lactamase-positive Kingella kingae. *Clin Infect Dis* 1993;17:818-819.
1204. Sottnek FO, Albritton WL. Haemophilus influenzae biotype VIII. *J Clin Microbiol* 1984;20:815-816.
1205. Spach DH, Callis KP, Paaauw DS, et al. Endocarditis caused by Rochalimaea quintana in a patient infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1993;31:692-694.
1206. Spach DH, Kanter AS, Daniels NA, et al. Bartonella (Rochalimaea) species as a cause of apparent "culture-negative" endocarditis. *Clin Infect Dis* 1995;20:1044-1047.
1207. Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, et al. Bartonella (Rochalimaea) quintana bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med* 1995;332:424-428.
1208. Spach DH, Koehler JE. Bartonella-associated infections. *Infect Dis Clin N America* 1998;12:137-155.
1209. Spach DH, Panther LA, Thorning DR, et al. Intracerebral bacillary angiomatosis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Ann Intern Med* 1992;116:740-742.
1210. Spagnuolo PJ, Eilner JJ, Lerner PI, et al. Haemophilus influenzae meningitis: the spectrum of disease in adults. *Medicine (Baltimore)* 1982;61:74-85.
1211. Spinola SM, Griffiths GE, Shanks KL, Blake MS. The major outer membrane protein of Haemophilus ducreyi is a member of the OmpA family of proteins. *Infect Immun* 1993;61:1326-1331.
1212. Spratt DA, Greenman J, Schaffer AG. Capnocytophaga gingivalis aminopeptidase: a potential virulence factor. *Microbiology* 1995;141:3087-3093.
1213. Stahelin J, Goldenberger D, Gnehm HE, Altwegg M. Polymerase chain reaction diagnosis of Kingella kingae arthritis in a young child. *Clin Infect Dis* 1998;27:1328-1329.
1214. Steeper TA, Roegenstem H, Weiser J, et al. Bacillary angiomatosis involving the liver, spleen, and skin in an AIDS patient with concurrent Kaposi's sarcoma. *Am J Clin Pathol* 1992;97:713-718.
1215. Stefanelli P, Giuliano M, Bottone M, et al. Polymerase chain reaction for the identification of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;24:197-200.
1216. Stefanelli P, Mastrantonio P, Haosman SZ, et al. Molecular characterization of two Bordetella bronchiseptica strains isolated from children with coughs. *J Clin Microbiol* 1997;35:1550-1555.
1217. Steffens L, Franke S, Nickel S, et al. DNA fingerprinting of Eikenella corrodens by pulsed-field gel electrophoresis. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:95-108.
1218. Stein A, Teyssie N, Capobianco C, et al. Eikenella corrodens a rare cause of pancreatic abscess: two case reports and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:273-275.
1219. Steinemann TL, Sheikholeslami MR, Brown HH, Bradsher RW. Oculoglandular tularemia. *Arch Ophthalmol* 1999;117:132-133.
1220. Steinhoff MC, Auerbach BS, Nelson KE, et al. Antibody responses to Haemophilus influenzae type b vaccines in men with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991;325:1837-1842.
1221. Steitz A, Orth T, Feddersen A, et al. A case of endocarditis with valvulitis due to Actinobacillus actinomycetemcomitans: a 16S rDNA signature for distinction from related organisms. *Clin Infect Dis* 1998;27:224-225.
1222. Stevens PK, Czuprynski CJ. Pasteurella haemolytica leukotoxin induced bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect Immun* 1996;64:2687-2694.
1223. Stevens-Krebbels AH, Schouten MA, Janssen J, Horrevorts AM. Nosocomial transmission of Bordetella bronchiseptica. *J Hosp Infect* 1999;43:323-324.
1224. St Geme JW III, Cutter D. Evidence that surface fibrils expressed by Haemophilus influenzae type b promote attachment to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995;25:77-85.

1225. St Geme JW III, Cutter D. The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an auto-transporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* 2000;182:6005-6013.
1226. St Geme JW III, Cutter D, Barenkamp JS. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* 1996;178:6281-6287.
1227. St Geme JW III, De la Morena ML, Falkow SA. *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1994;14:217-233.
1228. St Geme JW III, Falkow S. Capsule loss by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and entry into human cells. *J Infect Dis* 1992;165 (Suppl 1):S117-S118.
1229. St Geme JW III, Falkow S. Isolation, expression, and nucleotide sequence of the pilin structural gene of the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. *Infect Immun* 1993;61:2233-2237.
1230. St Geme JW III, Falkow S, Barenkamp SJ. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2875-2879.
1231. St Geme JW III, Gilsdorf JR, Falkow S. Surface structures and adherence properties of diverse strains of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. *Infect Immun* 1991;59:3366-3371.
1232. St Geme JW III, Pinkner JS, Krasan GP, et al. *Haemophilus influenzae* pili are composite structures assembled via the HifB chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11913-11918.
1233. Srebel PM, Cochi SL, Farizo KM, et al. Pertussis in Missouri: evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescent antibody testing, and clinical case definitions in the diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1993;16:276-285.
1234. Sturm AW. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in non-gonococcal urethritis. *J Infect Dis* 1986;153:165-167.
1235. Sturm AW. Iron and virulence of *Haemophilus ducreyi* in a primate model. *Sex Transm Dis* 1997;24:64-68.
1236. Sturm AW, Zanen HC. Characteristics of *Haemophilus ducreyi* in culture. *J Clin Microbiol* 1984;19:672-674.
1237. Suda R, Lai CH, Yang HW, Hasegawa K. *Eikenella corrodens* in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition. *J Periodontol* 2002;73:886-891.
1238. Sumerkan B, Gokahmetoglu S, Esel D. *Brucella* detection in blood: comparison of the BacT/Alert standard aerobic bottle, BacT/Alert FAN aerobic bottle and BacT/Alert enhanced FAN aerobic bottle in simulated blood culture. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:369-372.
1239. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycescomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:2002-2005.
1240. Sykes SO, Riemann C, Santos CI, et al. *Haemophilus influenzae* associated scleritis. *Br J Ophthalmol* 1999;83:410-413.
1241. Sylvester DA, Burnstine RA, Bower JR. Cat-inflicted corneal laceration: presentation of two cases and a discussion of infection-related management. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2002;39:114-117.
1242. Syrjala H, Koskela P, Ripatti T, et al. Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease. *J Infect Dis* 1986;153:142-145.
1243. Syrjala H, Kujala P, Myllyla V, et al. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand J Infect Dis* 1985;17:371-375.
1244. Syrjala H, Schildt R, Raisainen S. In vitro susceptibility of *Francisella tularensis* to fluoroquinolones and treatment of tularemia with norfloxacin and ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:68-70.
1245. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Infect Immun* 1980;28:258-268.
1246. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, et al. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991;164:982-986.
1247. Takala AK, Meurman O, Kleemola M, et al. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:189-195.
1248. Takala AK, Peltola H, Eskola J. Disappearance of epiglottitis during laryngoscopy with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine among children in Finland. *Laryngoscope* 1994;104:731-735.
1249. Takwale VJ, Wright ED, Bate J, Edge AJ. *Pasteurella multocida* infection of a total hip arthroplasty following a cat scratch. *J Infect* 1997;34:263-264.
1250. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, et al. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N Engl J Med* 1999;340:85-92.
1251. Talbodec N, Bottelin E, Boruchowicz A, et al. Splenic abscess associated with *Pasteurella multocida* in an immunocompetent patient. *J Clin Gastroenterol* 1995;21:76.
1252. Taleski V, Zerva L, Kantardjiev T, et al. An overview of the epidemiology and epidemiology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Vet Microbiol* 2002;90:147-155.
1253. Tamion F, Girault C, Chevrin V, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia with shock in an immunocompetent patient. *Scand J Infect Dis* 1996;28:197-198.
1254. Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycescomitans*: occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontol Res* 2002;37:268-272.
1255. Tancik CA, Dillaha JA. *Francisella tularensis* endocarditis. *Clin Infect Dis* 2000;30:399-400.
1256. Tang CM, Conlon CP. Bronchitis and bronchiectasis. In: Root RK, Waldvordel F, Corey L, Stamm WE, eds. *Clinical Infectious Diseases: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1999:523-528.
1257. Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, et al. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis and respiratory failure. *Clin Infect Dis* 1998;26:389-392.
1258. Tanner ACR, Visconti RA, Socransky SS, et al. Classification and identification of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by cluster analysis and deoxyribonucleic acid hybridizations. *J Periodontol Res* 1982;17:585-596.
1259. Tanner K, Fitzsimmons G, Carrol ED, et al. *Haemophilus influenzae* type b epiglottitis as a cause of acute airway obstruction in children. *BMJ* 2002;325:1099-1100.
1260. Tappero JW, Koehler JE, Brger TG, et al. Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann Intern Med* 1993;118:363-365.
1261. Taranger J, Trollfors B, Lagergard T, et al. Unchanged efficacy of a pertussis toxoid vaccine throughout the two years after the third vaccination of infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:180-184.
1262. Tarnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Rev Infect Dis* 1989;11:440-451.
1263. Taskapan H, Oymak O, Sumerkan B, et al. *Brucella* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis with acute brucellosis. *Nephron* 2002;91:156-158.
1264. Tatum FM, Briggs RE, Sreevatsan SS, et al. Construction of an isogenic leukotoxin mutant of *Pasteurella haemolytica* a serotype 1: characterization and virulence. *Microb Pathog* 1998;24:37-46.
1265. Taveras JM III, Campo R, Segal N, et al. Apparent culture-negative endocarditis of the prosthetic valve caused by *Cadiobacterium hominis*. *South Med J* 1993;86:1439-1440.
1266. Tay JS, Chusid MJ, Dunne WM Jr. Capnocytophaga ochracea pyonephrosis in an infant with obstructive nephropathy. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:555-556.
1267. Taylor JP, Purdue JN. The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1976-1986. *Am J Epidemiol* 1989;130:160-165.
1268. Tempio PJ, Slots J. Selective medium for the isolation of *Haemophilus aphrophilus* from the human periodontium and other oral sites and the low proportion of the organism in the oral flora. *J Clin Microbiol* 1986;23:777-782.
1269. Testillano Tarrero M, Montejó Baranda M, et al. Peritonitis involving Capnocytophaga ochracea. *Am J Gastroenterol* 1989;84:206-207.
1270. Thalhammer F, Eben G, Kopetzki-Kogler U. Unusual route of transmission for *Brucella abortus*. *Clin Infect Dis* 1998;26:763-764.
1271. Tharmaseelan K, Morgan MS. *Pasteurella multocida* conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:815.
1272. Thomas R, Johansson A, Neeson B, et al. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2003;41:50-57.
1273. Thonsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahn DF. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2612-2623.
1274. Thorsen P, Moiler BR, Arpi M, et al. *Pasteurella aerogenes* isolated from stillbirth and mother. *Lancet* 1994;343:485-486.
1275. Tilley PAG, Kanchana MV, Knight I, et al. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and the fluorescent antibody staining: accuracy and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:17-23.
1276. Tindberg Y, Blennow M, Granström M. A ten-year follow-up after immunization with a two-component acellular pertussis vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:361-365.
1277. Tison DL, Latimer JM. Lysis centrifugation-direct plating technique for isolation of group DF-2 from the blood of a dog bite victim. *J Infect Dis* 1986;153:1001-1002.
1278. Tobe TJ, Franssen CF, Zijlstra JG, et al. Haemolytic-uremic syndrome due to Capnocytophaga canimorsus bacteremia after a dog bite. *Am J Kidney Dis* 1999;33:e5.
1279. Tollo K, Helgeland K. Fc-binding component: a virulence factor in *Actinobacillus actinomycescomitans*? *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:373-377.
1280. Tonjum T, Bukholm G, Bovre K. Identification of *Haemophilus aphrophilus* and *Actinobacillus actinomycescomitans* by DNA-DNA hybridization and genetic transformation. *J Clin Microbiol* 1990;28:1994-1998.
1281. Torok L, Viragh SZ, Borka I, et al. Bacillary angiomatosis in a patient with lymphocytic leukemia. *Br J Dermatol* 1994;130:665-668.
1282. Torres A, Cuende E, De Pablos M, et al. Remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema associated with subcutaneous *Streptobacillus moniliformis* abscess. *J Rheumatol* 2001;28:1696-1698.
1283. Tohniwal R, Draghi TC, Kocka FE, Kallick CA. Manifestations of *Kingella kingae* infections in adults: resemblance to neisserial infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;5:81-85.
1284. Totten PA, Norm SV, Stamm WE. Characterization of the hemolytic activity of *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* 1995;63:4409-4416.
1285. Totten PA, Stamm WE. Clear broth and plate media for culture of *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2019-2023.
1286. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 2001;39:924-929.
1287. Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3504-3508.

1288. Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, et al. A placebo-controlled trial of a pertussis toxoid vaccine. *N Engl J Med* 1995;333:1045-1050.
1289. Trollfor B, Taranger GJ, Lagergard T, et al. Serum IgG antibody responses to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in nonvaccinated and vaccinated children and adults with pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28:552-559.
1290. Trujillano-Martin I, García-Sánchez E, Martínez JM, et al. In vitro activity of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:194-195.
1291. Tryland M, Kleivane L, Alfredsson A, et al. Evidence of brucella infection in marine animal- in the North Atlantic Ocean. *Vet Rec* 1999;144:588-592.
1292. Tsai PS, DeAngelis DD, Spencer WH, Seiff SR. Bacillary angiomatosis of the anterior orbit, eyelid, and conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 2002;134:433-434.
1293. Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, et al. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2000;38:1990-1991.
1294. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:118-116.
1295. Tyndall MW, Agoki E, Plummer FA, et al. Single dose azithromycin for the treatment of chancroid: a randomized comparison with erythromycin. *Sex Transm Dis* 1994;21:231-234.
1296. Tyndall MW, Malisa M, Plummer FA, et al. Ceftriaxone no longer predictably cures chancroid in Kenya. *J Infect Dis* 1993;167:469-471.
1297. Ueda N, Nishihua T, Ishihua Y, et al. Role of prostaglandin in the formation of osteoclast induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:69-75.
1298. Uhari M, Syrjala H, Salminen A. Tularemia in children caused by *Francisella tularensis* biovar palaeartica. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:80-83.
1299. United States Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Appendix. 1. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BML). In Fleming DO, Hunt DL, eds., *Biological Safety: Principals and Practice*. 3rd Ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:609-700.
1300. United States Department of Labor, Occupational Safety and Health. Occupational exposure to blood-borne pathogens: final rule (29 CFR Part 1910.1030). In: Fleming DO, Hunt DL, eds. *Biological Safety: Principal and Practices*. 3rd Ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:701-712.
1301. Urs S, D' Silva BSV, Jeena CP, et al. *Kingella kingae* septicaemia in association with HIV disease. *Trop Doct* 1994;24:127.
1302. Valtonen M, Lauhio A, Carlson P, et al. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia: fifth report of cat-associated infection and five other cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:520-523.
1303. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, et al. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:849-858.
1304. Vandamme P, Hommez J, Vancanneyt M, et al. *Bordetella hincii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:37-45.
1305. Vandamme P, Vancanneyt M, Van Belkum A, et al. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:782-791.
1306. Van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, et al. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun* 1999;67:1056-1062.
1307. Van der Zee A, Agerberg C, Peeters M, et al. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2134-2140.
1308. Van der Zee A, Croenendijk H, Peeters M, Mooi FR. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:640-647.
1309. Van Dyck E, Bogaens J, Smet H, et al. Emergence of *Haemophilus ducreyi* resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in Rwanda. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1647-1648.
1310. Van Dyck E, Piot P. Enzyme profiles of *Haemophilus ducreyi* strains isolated on different continent. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:40-43.
1311. Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, et al. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J Periodontol* 1982;53:502-508.
1312. Van Erps J, Schmiedding E, Naessens A, Keymeulen B. *Kingella kingae*, a rare cause of meningitis. *Clin Neurol Neurosurg* 1992;94:173-175.
1313. Van Schilfgaarde M, Van Ulsen P, Eijk P, et al. Characterization of adherence of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:4658-4665.
1314. Van Steenberg TJM, Bosch-Tijhof CJ, Van Winkelhoff AJ, et al. Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2769-2774.
1315. Van Winkelhoff AJ, Overbeek BP, Pavicic MJAMP, et al. Long-standing bacteremia caused by oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with a pacemaker. *Clin Infect Dis* 1993;6:216-218.
1316. Van Winkelhoff AJ, Tijhof CJ, de Graff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:52-57.
1317. Vartian CV, Septimus E. Endophthalmitis due to *Pasteurella multocida* and CDC EF-4. *J Infect Dis* 1989;160:733.
1318. Vasquez JE, Ferguson SA Jr, Bin-Sagheer S, et al. *Pasteurella multocida* endocarditis: a molecular epidemiological study. *Clin Infect Dis* 1998;26:518-520.
1319. Vasseur E, Joly P, Nouvellon M, et al. Cutaneous abscess: a rare complication of *Streptobacillus moniliformis* infection. *Br J Dermatol* 1993;129:95-96.
1320. Velasco J, Romero C, Lopez-Goni I, et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobacterium anthropi* and description of *Ochrobacterium intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:759-768.
1321. Velazco CH, Coelho C, Salazar F, et al. Microbiological features of Papillon-Lefevre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:622-627.
1322. Venkataramani A, Santo-Domingo NE, Main DM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pneumonia with possible septic embolization. *Chest* 1994;105:645-646.
1323. Verdon R, Geffray L, Collet T, et al. Vertebral osteomyelitis due to *Bartonella henselae* in adults: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 2002;35:141-144.
1324. Verger JM, Grayon M, Tibor A, et al. Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein- or cytoplasmic protein-specific gene probes. *Res Microbiol* 1998;149:5119-517.
1325. Verger JM, Gnmont F, Grimont PAD, et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:292-295.
1326. Verghese A, Hamati F, Berk S, et al. Subceptibility of dygonic fermenter 2 to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:78-80.
1327. Viallard JF, Bonnet S, Couzi L, et al. Glomerulonephritis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mimicking c-ANCA-positive vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:663-665.
1328. Villar MT, Helber JT, Hood B, et al. *Eikenella corrodens* phase variation involves a posttranslational event in pilus formation. *J Bacteriol* 1999;181:4154-4160.
1329. Villar MT, Hirschberg RL, Schaerer MR. Role of the *Eikenella corrodens* pilA locus in pilus formation and phase variation. *J Bacteriol* 2001;183:55-62.
1330. Vinogradov E, Perry MB, Conlan JW. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 2002;269:6112-6118.
1331. Virata M, Rosenstein NE, Hadler JL, et al. Suspected Brazilian purpuric fever in a toddler with overwhelming Epstein-Barr virus infection. *Clin Infect Dis* 1999;27:1238-1240.
1332. Visvanathan K, Jones PD. Ciprofloxacin treatment of *Haemophilus paraphrophilus* brain abscess. *J Infect* 1991;22:306-307.
1333. Vitovski S, Dunkin KT, Howard AJ, Sayer JR. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in carriage and disease: difference in IgA1 protease activity levels. *JAMA* 2002;287:1699-1705.
1334. Vizcaino N, Fernandez-Lago L. A rapid and sensitive method for the identification of *Brucella* species with a monoclonal antibody. *Res Microbiol* 1992;143: 513-518.
1335. Vogt K, Klefisch F, Hahn H, Schmutzler H. Antibacterial efficacy of ciprofloxacin in a case of endocarditis due to *Cardiobacterium hominis*. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1994;281:80-84.
1336. Voss A, Van Zwam YH, Meis JF, et al. Sepsis puerperalis caused by a genotypically proven cat-derived *Pasteurella multocida* strain. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;76:71-73.
1337. Wade NK, Levy L, Jone MR, et al. Optic disk edema associated with peripapillary serous retinal detachment: an early sign of systemic *Bartonella henselae* infection. *Am J Ophthalmol* 2000;130:327-334.
1338. Wade T, Booy R, Teare EL, Kroll S. *Pasteurella multocida* meningitis in infancy: a lick may be as bad as a bite. *Eur J Paediatr* 1999;158:875-878.
1339. Wadowky RM, Laus S, Liben T, et al. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol* 1994;32:1054-1057.
1340. Wadowky RM, Michaels RH, Liben T, et al. Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:2645-2644.
1341. Wagle A, Jones RM. Acute epiglottitis despite vaccination with *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Paediatr Anaesth* 1999;9:549-550.
1342. Wagner DK, Wright JI, Ansher AF, Gill VJ. Dysgonic fermenter 3-associated gastrointestinal disease in a patient with common variable hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1988;84:315-318.
1343. Waldor M, Roberts D, Kazinjian P. In utero infection due to *Pasteurella multocida* in the first trimester of pregnancy: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:497-500.
1344. Wallace PL, Hollis DG, Weaver RE, Moss CW. Cellular fatty acid composition of *Kingella* species. *Cardiobacterium hominis*, and *Eikenella corrodens*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1592-1594.
1345. Wallace PL, Hollis DG, Weaver RE, Moss CW. Characterization of CDC group DF-3 by cellular fatty acid analysis. *J Clin Microbiol* 1989;27:735-717.
1346. Wallace RJ, Baker CJ, Quinone F, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (biotype IV) as a neonatal, maternal, and genital pathogen. *Rev. Infect Dis* 1983;5:123-136.
1347. Walle F, Toure F, Devalckenaere A, et al. Molecular identification of *Pasteurella dagmatis* peritonitis in a patient undergoing peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4681-4682.
1348. Waniger RA. Primary pneumonic tularemia with positive blood cultures. *Clin Microbiol Newslett* 1984;6:120-122.
1349. Warman ST, Reinitz E, Klein RS. *Haemophilus parainfluenzae* septic arthritis in an adult. *JAMA* 1981;246:868-869.
1350. Warren K, Goldstein E, Hung VS, et al. Use of retinal biopsy to diagnose *B. henselae* retinitis in an HIV-infect patient. *Arch Ophthalmol* 1998;116:937-940.
1351. Washburn LK, O'Shea M, Gillis DC, et al. Response to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in chronically ill premature infants. *J Pediatr* 1993;123:791-794.

1352. Wasserman D, Asbell PA, Friedman AJ, Bottone EJ. Capnocytophaga ochracea keratitis blepharoconjunctivitis. *Cornea* 1995;14:533-535.
1353. Wagon RW, Baker N, Lang S, Ment J. Eikenella corrodens infective endocarditis in a previously healthy non-drug user. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:890-891.
1354. Weber G, Abu-Shakra M, Hertzanu Y, et al. Liver abscess caused by Capnocytophaga species. *Clin Infect Dis* 1997;25:152-153.
1355. Weiser J N, Chong STH, Greenberg D, Fong W. Identification and characterization of a cell-envelope protein of *Haemophilus influenzae* contributing of phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. *Mol Microbiol* 1995;17:555-564.
1356. Weiss E, Dasch GA. Differential characteristics of strains of *Rochalimaea*: *Rochalimaea vinsonii* sp nov., the Canadian vole agent. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:305-314.
1357. Weiss E, Moulder JW, Genus II. *Rochalimaea* (Macchiavello 1947) Krieg 1961. 162. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:698-701.
1358. Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, et al. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. arupensis from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Barbesia microti* among naturally infected mice. *J Clin Microbiol* 1999;37:2598-2601.
1359. Welch DF, Hensel D. Evaluation of Bactigen and Phadebact for detection of *Haemophilus influenzae* type b antigen in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1982;16:905-908.
1360. Welch DF, Hensel DM, Pickett DA, et al. Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993;31:2381-2386.
1361. Welch DF, Pickett DA, Slater LN, et al. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:275-280.
1362. Welch DF, Solterman PM, Schneider NR. Five cases of *Haemophilus segnis* appendicitis. *J Clin Microbiol* 1986;24:851-852.
1363. Wells L, Rutter N, Donald F. *Kingella kingae* endocarditis in a sixteen-month old child. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:454-455.
1364. Wenger JD, Hollis DG, Weaver RE, et al. Infection caused by *Francisella philomiragia* (formerly *Yersinia philomiragia*), a newly recognized human pathogen. *Ann Intern Med* 1989;110:888-892.
1365. Westerman EL, McDonald J. Tularemia pneumonia mimicking legionnaires disease: isolation of organism on CYE agar and successful treatment with erythromycin. *South Med J* 1983;76:1169-1170.
1366. Westling K, Bygdeman S, Engkvist O, Jorup-Ronstrom C. *Pasteurella multocida* infection following cat bites in humans. *J Infect* 2000;40:97-98.
1367. Weyant RS, Bibb WF, Stephens DS, et al. Purification and characterization of a pilin specific for Brazilian purpuric fever-associated *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (H. aegyptius) strains. *J Clin Microbiol* 1990;28:756-763.
1368. Weyant RS, Burris JA, Nichols DK, et al. Epizootic feline pneumonia associated with Centers for Disease Control group EF-4 bacteria. *Lab Anim Sci* 1994;44:180-183.
1369. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* 1995;33:1-7.
1370. Weyant RS, Quinn FD, Utt EA, et al. Human microvascular endothelial cell toxicity caused by Brazilian purpuric fever-associated strains of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. *J Infect Dis* 1994;169:410-433.
1371. White CB, Lampe RM, Copeland RL, et al. Soft tissue infection associated with *Haemophilus aphrophilus*. *Pediatrics* 1981;67:434-415.
1372. Whitehouse RL, Jackson H, Jackson MC, Ramji MM. Isolation of *Simonsiella* sp. from a neonate. *J Clin Microbiol* 1987;25:522-525.
1373. Whitelaw AC, Shankland IM, Elisha BG. Use of 16S rRNA sequencing for identification of *Actinobacillus ureae* isolated from a cerebrospinal fluid sample. *J Clin Microbiol* 2002;40:666-668.
1374. Whitney AM, Farley MM. Cloning and sequence analysis of the structural pilin gene of Brazilian purpuric fever-associated *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. *Infect Immun* 1993;61:1559-1562.
1375. Wild BE, Pearman JW, Campbell PB, et al. Brazilian purpuric fever in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150:344-346.
1376. Willems A, Coopman R, Gillis M. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:111-117.
1377. Williams BL, Hammond BF. Capnocytophaga: new genus of gram-negative gliding bacteria. IV. DNA base composition and sequence homology. *Arch Microbiol* 1979;122:35-39.
1378. Williams BL, Hollis D, Holdemann LV. Synonymy of strains of Centers for Disease Control group DF-1 with species of Capnocytophaga. *J Clin Microbiol* 1979;10:550-556.
1379. Wilson ME. Prosthetic valve endocarditis and paravalvular abscess caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Rev Infect Dis* 1989;11:665-667.
1380. Wilson ME, Jonak-Urbanczyk JT, Bronson PM, et al. Capnocytophaga species: increased resistance of clinical isolates to serum bactericidal action. *J Infect Dis* 1987;156:99-106.
1381. Wilson R. Evidence of bacterial infection in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Semin Respir Infect* 2002;15:208-215.
1382. Wilson RW, Karchmer AW, Dajani AS, et al. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci, and HACEK microorganisms. *JAMA* 1995;274:1706-1713.
1383. Wine N, Lim Y, Fiener J. *Pasteurella multocida* epiglottitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:759-761.
1384. Winn RE, Chase WF, Lauderdale PW, et al. Septic arthritis involving Capnocytophaga ochracea. *J Clin Microbiol* 1983;19:538-540.
1385. Wirsing Von Konig CH, Finger H. Role of pertussis toxin in causing symptoms of *Bordetella parapertussis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:455-458.
1386. Wirsing Von Konig CH, Gounis D, Laukamp S, et al. Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children. *Eur J Clin Microbiol* 1999;18:341-345.
1387. Wolak T, Abu-Shakra M, Flusser D, et al. *Kingella endocarditis* and meningitis in a patient with SLE and associated antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2000;9:393-396.
1388. Wong DT, Thornton DC, Kennedy RC, Dolan MJ. A chemically-defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:742-744.
1389. Wong EY, Berkowitz RG. Acute epiglottitis in adults: the Royal Melbourne Hospital experience. *ANZ J Surg* 2001;71:740-743.
1390. Wong GWK, Oppenheimer SJ, Vaudry W. CSF shunt infection by unencapsulated *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 1993;17:519-520.
1391. Wong JD, Janda JM, Duffey PS. Preliminary studies on the use of carbon substrate utilization patterns for identification of *Brucella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:109-113.
1392. Wong MT, Dolan MJ, Lattuada CP Jr, et al. Neuroretinitis aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella (Rochalimaea) henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency type 1. *J Clin Infect Dis* 1995;21:352-360.
1393. Wong R, Tappero J, Cockerell CJ. Bacillary angiomatosis and other Bartonella species infections. *Semin Cutan Med Surg* 1997;16:188-199.
1394. Wood GE, Dutro SM, Totten PA. Target cell range of *Haemophilus ducreyi* hemolysin and its involvement in invasion of human epithelial cells. *Infect Immun* 1999;67:3740-3749.
1395. Woolfrey RR, Moody JA. Human infection associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:243-255.
1396. World Health Organization. WHO meeting on case definitions of pertussis. Minutes/EPI/PERT91.1. January 10-11. Geneva: World Health Organization. 1991:4-5.
1397. Wormser GP, Bottone EJ. *Cardiobacterium hominis*: review of microbiologic and clinical features. *Rev Infect Dis* 1983;5:680-691.
1398. Wu T-H, Gu X-X. Outer membrane proteins as a carrier of detoxified lipooligosaccharide conjugate vaccines for montypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1999;67:5508-5513.
1399. Wullenweber M. *Streptobacillus moniliformis*: a zoonotic pathogen: taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. *Lab Anim* 1995;29:1-15.
1400. Wust J, Gubler J, Mannheim W, et al. *Actinobacillus hominis* as a causative agent of septicemia in hepatic failure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:693-694.
1401. Yaari E, Yafe-Zimmerman Y, Schwartz SB, et al. Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adult. *Chest* 1999;115:1254-1258.
1402. Yagupsky P. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR660 blood culture system. *J Clin Microbiol* 1994;32:1899-1901.
1403. Yagupsky P, Dagan R. *Kingella kingae*: an emerging cause of invasive infections in young children. *Clin Infect Dis* 1997;24:860-866.
1404. Yagupsky P, Dagan R. Population-based study of invasive *Kingella kingae* infections. *Emerg Infect Dis* 2000;6:85-87.
1405. Yagupsky P, Dagan R, Howard CW, et al. High prevalence of *Kingella kingae* in joint fluid from children with septic arthritis revealed by the BACTEC blood culture system. *J Clin Microbiol* 1992;30:1278-1281.
1406. Yagupsky P, Merires M, Bahar J, Dagan R. Evaluation of novel vancomycin-containing medium for primary isolation of *Kingella kingae* from upper respiratory tract specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:1426-1427.
1407. Yagupsky P, Peled N, Katz O. Epidemiological features of invasive *Kingella kingae* infections and respiratory carriage of the organism. *J Clin Microbiol* 2001;40:4180-4184.
1408. Yagupsky P, Peled N, Press J. Use of BACTEC 9240 blood culture system for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *J Clin Microbiol* 2001;39:738-739.
1409. Yagupsky P, Peled N, Press J, et al. Rapid detection of *Brucella melitensis* from blood cultures by a commercial system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:605-607.
1410. Yagupsky P, Peled N, Pres J, et al. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and Isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1997;35:1382-1384.
1411. Yagupsky P, Peled N, Riesenberk K, Banal M. Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. *Scand J Infect Dis* 2000;32:31-35.
1412. Yagupsky P, Press J. Use of the Isolator 1.5 microbial tube for culture of synovial fluid from patient with septic arthritis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2410-2412.
1413. Yamamoto P, Kajiura S, Hirai Y, Watanabe T. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov., and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from human dental plaque. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:324-329.
1414. Yamazaki Y, Ebisu S, Okada H. Partial purification of a bacterial lecitin-like substance from *Eikenella corrodens*. *Infect Immun* 1988;56:191-196.
1415. Yaneza AL, Jivan H, Kumari P, Togoo MS. *Pasteurella haemolytica* endocarditis. *J Infect* 1991;23:65-67.
1416. Yayli G, Isler M, Oyar O. Medically treated splenic abscess due to *Brucella melitensis*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:133-135.

1417. Yi K, Murphy TF. Importance of an immunodominant surface-exposed loop on outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect. Immunol 1997;65:150-155.
1418. Yih WK, Silva EA, Ida J, et al. *Bordetella homensis*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. Emerg Infect Dis 1999;5:441-443.
1419. Ying W, Nguyen MQ, Jahre JA. *Brucella canis* endocarditis: case report. Clin Infect Dis 1999;29:1593-1594.
1420. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infect Dis 1991;13:159-72.
1421. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995;21:283-290.
1422. Young EJ, Tarry A, Genta RM, et al. Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: report of 2 cases and literature review. Clin Infect Dis 2000;31:904-909.
1423. Young SA, Anderson GL, Mitchel PD. Laboratory observations during an outbreak of pertussis. Clin Microbiol Newslett 1987;9:176-179.
1424. Yu GV, Boike AM, Hladik IR. An unusual case of diabetic cellulitis due to *Pasteurella multocida*. J Foot Ankle Surg 1995;34:91-95.
1425. Yuan A, Yang PCh, Lee LN, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pneumonia with chest wall involvement and rib destruction. Chest 1992;101:1450-1451.
1426. Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, et al. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1996;67:282-290.
1427. Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, et al. Cat scratch disease in Connecticut: epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. N Engl J Med 1993;329:8-13.
1428. Zbinden R, Hochli M, Nadal D. Intracellular location of *Bartonella henselae* cocultivated with Vero cells and used in an indirect fluorescent antibody test. Clin Diagn Lab Immunol 1995;2:693-695.
1429. Zbinden R, Michael N, Sekulovski A, et al. Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescent. Eur J Clin Microbiol 1997;16:648-652.
1430. Zbinden R, Sommerhalder P, Von Wamburg U. Co-isolation of *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella multocida* from cat-bite wounds. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:203-204.
1431. Zeaiter Z, Liang Z, Raoult D. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *fisZ* gene sequences. J Clin Microbiol 2002;40:3641-3647.
1432. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, et al. Serum is the preferred specimen form diagnosis of human brucellosis by PCR. J Clin Microbiol 2001;39:1661-1664.
1433. Zhao G, Galina L, Hanyanun W, et al. Human tonsillitis associated with porcine *Pasteurella multocida* ingestion. Lancet 1993;342:491.
1434. Zijlstra EE, Swart GR, Godfrey FJM, et al. Pericarditis, pneumonia, and brain abscess due to a combined *Actinomyces-Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. J Infect 1992;25:83-87.
1435. Zimmer-Galler IE, Pach IM. *Capnocytophaga canimorsus* endophthalmitis. Retina 1996;16:163-164.
1436. Zwahlen A, Winkelstein JA, Moxon ER. Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. J Infect Dis 1983;148:385-394.

*Legionella***Taxonomía y características del género *Legionella*****Espectro clínico y anatomopatológico de la legionelosis**

Factores predisponentes
Anatomía patológica y patogenia

Aspectos epidemiológicos y ecológicos de la legionelosis

Incidencia
Legionellaceae en el medioambiente
Hábitats naturales
Hábitats acuáticos creados por el hombre (artificiales)
Legionelosis en viajeros
Brotos intrahospitalarios de legionelosis

Diagnóstico de laboratorio

Selección, recolección y transporte de muestras clínicas
Examen directo de muestras clínicas
Exámenes macroscópico y microscópico de materiales teñidos
Examen microscópico de materiales teñidos

Inmunofluorescencia directa (IFD)
Detección de antígeno en orina y líquidos corporales

Detección de *Legionella* en muestras clínicas

Aislamiento de especies de *Legionella* en muestras clínicas
Biopsia, extirpación quirúrgica y tejido de necropsia
Líquido pleural y aspirados transtraqueales
Procedimiento de descontaminación por lavado ácido para esputo y otras muestras contaminadas
Hemocultivos

Identificación de especies de *Legionella*

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento
Inmunofluorescencia indirecta
Diagnóstico molecular

Estudios de microbiología ambiental

Aislamiento de *Legionella* de muestras ambientales
Tipificación de cepas de *Legionella*

Durante el verano de 1976, ocurrió un brote explosivo de neumonía de etiología desconocida entre las personas que asistieron a una convención de la American Legion en Filadelfia.⁶³ Se dijo que los individuos que sufrieron una enfermedad multisistémica (que incluía neumonía) tenían la enfermedad de los legionarios.²³ Se documentó un total de 182 casos; 29 de estos pacientes fallecieron. Para enero de 1977, el doctor Joseph McDade, de los Centers for Disease Control (CDC), había aislado del agente etiológico.¹⁰⁴ Por lo tanto, en 6 meses se resolvió un misterio clínico importante y se descubrió una nueva familia de bacterias: *Legionellaceae*. La historia de la enfermedad de los legionarios fue revisada en 1988¹⁶⁰ y existen varias evaluaciones más recientes.^{58,107,139} También se ha detallado la disponibilidad de sitios web.¹⁰

Taxonomía y características del género Legionella

En 1979, Brenner, Steigerwalt y McDade clasificaron la bacteria que produjo el brote de enfermedad de los legionarios en Filadelfia como *Legionella pneumophila*, en la familia *Legionellaceae*.²⁰ En la actualidad, se han aislado 50 especies y subespecies y un total de 71 tipos serológicos de *Legionella* publicados en forma válida de muestras humanas o de muestras ambientales (cuadro 10-1).^{78,162} Varias especies descritas recientemente son parásitos intracelulares estrictos de amebas de vida libre y pueden aislarse sólo mediante cocultivo con amebas.^{2,34} Estos patógenos de las amebas fueron reconocidos por primera vez por Rowbotham,¹²⁵ que los denominó patógenos de las amebas similares a *Legionella*. La más frecuente de estas especies parece ser *L. lytica* (antes *Sarcobium lyticum*).

Las especies de *Legionella* son bacilos gramnegativos no esporulados, estrechos, de 0,3 µm a 0,9 µm de ancho. Su longitud varía desde formas cortas, de 1,5 a 2 µm, hasta formas filamentosas más largas. En general, son cortos y delgados o cocobacilos cuando se los observa en extendidos directos de muestras clínicas, pero tienen una longitud más variable después del crecimiento en medios de cultivo, cuando las formas más largas de 20 µm no son infrecuentes. Las legionelas se tiñen mucho más fácilmente con las tinciones de Diff-Quik, Giemsa o Gram-Weigert que con la tinción de Gram tradicional en los preparados de improntas de tejido fresco, frotis de líquido de lavado broncoalveolar o esputo. Sin embargo, el agregado de fucsina básica al 0,05% a la contratinción con safranina en el procedimiento de Gram tiñe mejor las especies de *Legionella* y de otros numerosos bacilos gramnegativos que se tiñen poco.

Salvo por tres especies que son inmóviles, *L. oakridgensis*, *L. nautarum* y *L. londinensis*, el resto de las especies de *Legionella* se mueven por medio de uno o más flagelos polares o subpolares.¹⁶² Las legionelas son aerobias y tienen requerimientos nutricionales especiales. Necesitan L-cisteína y sales de hierro para su crecimiento. R. E. Weaver cultivó por primera vez *L. pneumophila* en agar de Mueller-Hinton con suplemento de IsoVitalax al 1% y hemoglobina al 1%. Las cepas pueden crecer muy lentamente en agar chocolate utilizado también para el aislamiento de gonococos.³⁵ El medio óptimo para el crecimiento es una variación en agar carbón-extracto de levadura desarrollado por James Feeley.⁵⁵ El extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios. El carbón activado elimina los radicales tóxicos de oxígeno producidos por la exposición de muchos medios a la luz.⁷⁷ El buffer ACES tiene un pK

Cuadro 10-1 Especies del género Legionella (cantidad de serogrupos)	
ESPECIES AISLADAS DE SERES HUMANOS Y DEL MEDIOAMBIENTE	ESPECIES AISLADAS ÚNICAMENTE DEL MEDIOAMBIENTE
<i>L. anisa</i>	<i>L. adelaidensis</i>
<i>L. bozemanii</i> (2)	<i>L. beliardensis</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. brunensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. cherrii</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. drozanskii</i>
<i>L. erythra</i> (2)	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. feelei</i> (2)	<i>L. fallonii</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. hackeliae</i> (2)	<i>L. gratiana</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. gresilensis</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. israelensis</i>
<i>L. longbeacheae</i> (2)	<i>L. jamestowneensis</i>
<i>L. lytica</i>	<i>L. londinensis</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. quinlivanii</i> (2)
<i>L. pneumophila pneumophila</i> (15)	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. pneumophila fraseri</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. pneumophila pasculli</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. sainthelensi</i> (2)	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
	<i>L. taurinensis</i>
	<i>L. waltersii</i>
	<i>L. worsleiensis</i>
	Genomoespecies

de 6,9, el óptimo para el crecimiento de especies de *Legionella*. El agregado de buffer ACES y α-cetoglutarato arroja el agar BCYEα.³⁸

El crecimiento en agar BCYEα sin ningún crecimiento en agar sangre es uno de los **indicios presuntivos** más útiles de que una cepa podría ser una especie de *Legionella*. Otro microorganismo gramnegativo que también crece en BCYEα, pero no en agar sangre común es *Francisella tularensis*. A diferencia de las especies de *Francisella*, que producen ácido a partir de hidratos de carbono, las especies de *Legionella* no fermentan ni oxidan hidratos de carbono. Algunos bacilos esporulados termofílicos y *Bordetella pertussis* también pueden crecer en agar BCYEα; las diferencias en morfología, características serológicas y ácidos grasos celulares ayudan a distinguirlos. Las especies de *Legionella* producen ácidos grasos de cadena ramificada característicos en sus paredes celulares.¹⁶² La mayoría de las especies son débilmente catalasa positivas y peroxidasa positivas. La prueba de hidrólisis de hipurato de sodio, que es positiva para *L. pneumophila* y negativa para la mayoría de otras especies de *Legionella* aisladas en muestras clínicas, proporciona un procedimiento presuntivo útil para la diferenciación entre *L. pneumophila* y las otras especies de *Legionella*. La caracterización fenotípica de las cepas de *Legionella* utilizando pruebas bioquímicas tiene sólo un valor limitado para la identificación presuntiva de especies. Sin embargo, la serotipificación mediante pruebas de anticuerpos inmunofluorescentes es una forma práctica de diferenciar presuntivamente

las especies de *Legionella*. La identificación definitiva puede requerir estudios de ácidos nucleicos y otros procedimientos de referencia quimiotaxonómicos.⁴⁶

Espectro clínico y anatomopatológico de la legionelosis

La enfermedad de los legionarios puede presentarse de manera esporádica, como una neumonía adquirida en la comunidad o en epidemias.^{22,54,53} Además de la enfermedad de los legionarios, hay una forma leve denominada fiebre de Pontiac.⁶⁹ La enfermedad también puede afectar regiones anatómicas extratorácicas. Por lo tanto, en este capítulo se utiliza el término legionelosis, que incluye la enfermedad de los legionarios, la fiebre de Pontiac y la afectación extrapulmonar por especies de *Legionella*, para referirse a cualquier infección causada por bacterias de la familia *Legionellaceae*. Cerca del 85% de los casos documentados de legionelosis fueron causados por *L. pneumophila*. Los serogrupos 1 a 6 de *L. pneumophila* por sí mismos han representado hasta el 75% de las legionelas de las que se comunica que causan enfermedad.¹¹⁸ Además de *L. pneumophila*, se han aislado muchas otras especies de muestras clínicas recogidas de seres humanos (véase cuadro 10-1). En una vigilancia internacional reciente de casos confirmados con cultivo, las especies más frecuentes no *pneumophila* fueron *L. longbeachae* y *L. bozemanii*.¹⁶³ *L. micdadei*^{89,93} y *L. dumoffii*^{145,82} también han sido responsables de enfermedad esporádica y epidémica en algunos lugares. Se pueden presentar múltiples especies o serogrupos en sistemas de agua, ambientales o potables, y el mismo paciente puede estar infectado por más de un serogrupo o especie al mismo tiempo.⁹⁶

La legionelosis ha sido reconocida principalmente como forma de neumonía. En los casos típicos, los primeros síntomas son sensación de agotamiento, mialgias y cefalea leve. Suele haber un comienzo rápido con tos seca, temperatura alta (p. ej., no es infrecuente 38,5 °C a 40 °C o más) y escalofríos. Muchos pacientes presentan dolor abdominal y síntomas gastrointestinales (p. ej., náuseas, vómitos y diarrea). En el cuadro 10-2 se resumen las manifestaciones clínicas. Para los investigadores es difícil distinguir entre las distintas etiologías de la neumonía

sobre la base de la anamnesis, el examen físico o las pruebas de laboratorio.¹²²

Al comienzo, las radiografías de tórax muestran infiltrados focales, que pueden progresar hasta una consolidación de los cinco lóbulos.^{51,106,142} Los infiltrados son bilaterales en dos tercios de los pacientes y pueden observarse cavidades abscedadas, sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos. Los hallazgos del laboratorio suelen incluir, en distintas combinaciones, leucocitosis moderada con desviación a la izquierda, proteinuria, hiponatremia, uremia, transaminasa glutámico oxalacética (también llamada aspartato aminotransferasa o AST) en suero elevada y eritrosedimentación alta. Como ya se dijo, la legionelosis también puede adoptar una forma leve y autolimitada de breve duración, conocida como fiebre de Pontiac, con fiebre alta, mialgias, malestar general y cefalea, pero con pocos o ningún hallazgo respiratorio y sin neumonía.^{56,60} En el cuadro 10-2 se comparan los aspectos clínicos de la enfermedad de los legionarios y la fiebre de Pontiac. Tanto la enfermedad neumónica como la no neumónica pueden ser el resultado de la exposición a la misma fuente ambiental.⁶⁸

En los últimos años, se ha ampliado el espectro clínico de la legionelosis. La enfermedad puede afectar cualquier aparato o sistema orgánico, con neumonía o sin ella. A continuación, damos ejemplos de algunas manifestaciones de afectación extrapulmonar. Se ha comunicado bacteriemia, pero faltan datos sobre su frecuencia.^{40,121} Casi el 50% de los pacientes con enfermedad de los legionarios muestra manifestaciones del sistema nervioso central, como cefalea, somnolencia, confusión, estupor y otras menos frecuentes, que incluyen ataxia, coma y convulsiones.⁸¹ Se ha comunicado una erupción macular, dolorosa y no pruriginosa, limitada a las superficies pretibiales de las piernas; sin embargo, las manifestaciones dérmicas son infrecuentes.⁷⁵ Se ha demostrado *L. pneumophila* serogrupo 1 en ganglios linfáticos, bazo, riñón y médula ósea, y ha sido documentada en miocarditis aguda,^{155,161} endocarditis de válvula protésica,¹⁰³ pericarditis¹⁰² e infecciones de fistulas de hemodiálisis.⁸⁶ Arnow y cols.⁷ comunicaron el aislamiento de *L. pneumophila* serogrupo 3, mezclado con múltiples especies de bacterias anaerobias, de un absceso perirrectal. Se demostró *L. pneumophila* serogrupo 4 mediante inmunofluorescencia indi-

Cuadro 10-2 Manifestaciones clínicas en dos tipos de legionelosis

	ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS	FIEBRE DE PONTIAC
Mortalidad	15%-30%	0%
Período de incubación	2-10 días	1-2 días
Síntomas	Fiebre, escalofríos, tos, mialgias, cefalea, dolor torácico, esputo y diarrea (y confusión u otros estados mentales en algunos casos)	Similar a la gripe: fiebre, escalofríos y mialgias (y tos, dolor torácico y confusión en algunos casos)
Pulmón	Neumonía y derrame pleural (absceso pulmonar en algunos casos)	Dolor pleurítico; sin neumonía, sin absceso pulmonar
Riñón	Insuficiencia renal (proteinuria, uremia y hematuria en algunos casos)	Sin manifestaciones renales
Hígado	Anomalías leves de la función pulmonar	Sin anomalías de la función hepática
Aparato digestivo	Diarrea acuosa, dolor abdominal, y náuseas y vómitos	Sin anomalías
Sistema nervioso central	Somonolencia, delirio, desorientación, confusión y obnubilación (pocas veces se documentan convulsiones)	Sin manifestaciones del sistema nervioso central
Modificado de las referencias ^{146,88} .		

recta en lesiones de pielonefritis aguda en un paciente que tenía tanto neumonía como pielonefritis asociadas con el microorganismo.³² *L. micdadei* fue el único microorganismo aislado de un absceso cutáneo de la pierna de una mujer de 62 años que había recibido prednisona y ciclofosfamida por una glomerulonefritis rápidamente progresiva.⁴ Sin embargo, las comunicaciones de manifestaciones extrapulmonares se han asociado más a menudo con *L. pneumophila* que con otras especies. Fang^{53,54} y Muder¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ y cols. han publicado revisiones de las manifestaciones de enfermedad producidas por especies de *Legionella* distintas de *L. pneumophila*.

La prevalencia elevada de anticuerpos contra legionelas en algunas poblaciones sugiere que puede ser frecuente la infección asintomática o subclínica. Esta presunción es reforzada por la documentación de infecciones no reconocidas (definidas por seroconversión) que ocurrieron incluso en un grupo de pacientes que habían sido sometidos a un trasplante renal.

Factores predisponentes

Tres factores son necesarios o aumentan la probabilidad de infección sintomática:

1. La presencia de legionelas virulentas en una fuente ambiental.
2. Un mecanismo eficiente para la diseminación de bacterias desde el medioambiente hacia los seres humanos.
3. La disminución de los mecanismos de defensa del huésped que son eficaces contra este microorganismo.

En general, las personas que tienen enfermedad de los legionarios son de edad mediana o mayores (edad media, unos 55 años); sin embargo, puede ocurrir a cualquier edad, aun en los niños.

La legionelosis debe incluirse en el diagnóstico diferencial de los pacientes inmunosuprimidos que presentan fiebre e infiltrados pulmonares; se desarrolla en los pacientes en los cuales la neumonía no responde a penicilinas, cefalosporinas o aminoglucósidos; o en cualquier paciente con neumonía grave, sobre todo cuando no existe ningún otro diagnóstico alternativo muy evidente. En los individuos que reciben hemodiálisis, receptores de trasplantes de órganos y otros pacientes quirúrgicos, por ejemplo, la enfermedad de los legionarios ha sido una causa importante de morbilidad.^{116,93}

Otros posibles trastornos predisponentes son diabetes mellitus, etilismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad cardiovascular. También se sugirió el tabaquismo en el brote de Filadelfia y en algunos brotes ulteriores. Un prerrequisito es la exposición a altas concentraciones de microorganismos virulentos del género *Legionella* en el medioambiente. Por lo tanto, ha ocurrido legionelosis con frecuencias más altas en las personas que viajaron a un sitio con hiperendemia progresiva (a menudo no reconocida).¹¹ En los últimos años, ése ha sido en ocasiones el vehículo del viaje, ya que han ocurrido epidemias repetidas veces en barcos cruceros, casi siempre asociadas con el uso de hidromasajes o baños de agua caliente.⁸⁰

Como resultado de los prerrequisitos señalados, los problemas relacionados con esta bacteria se presentan en los sitios donde se congregan personas ancianas o debilitadas. Aunque se carece de estudios que correlacionen el "giro cama" de los albergues turísticos con la frecuencia de legionelosis, no sería sorprendente que existiera esa correlación, dada la frecuencia con la cual los hidromasajes y los baños de inmersión han sido

señalados como fuentes de infección. Por cierto, las instalaciones de los centros asistenciales han constituido un problema importante, en parte gracias a la contribución involuntaria de los ingenieros que ubican las torres de refrigeración en las proximidades de las tomas de aire de respiraderos, un diseño indudablemente fortuito que es preocupante por su reiteración.³¹

Anatomía patológica y patogenia

Las características anatomopatológicas de la infección humana por varias especies de *Legionella* distintas de *L. pneumophila* son similares a las halladas en las infecciones por *L. pneumophila*. Una neumonía lobular multifocal muchas veces se vuelve confluyente y puede adoptar un aspecto lobular. Son frecuentes los abscesos pequeños; menos a menudo, se presentan abscesos grandes que pueden verse en la radiografía.

Desde el punto de vista histológico, se han observado neutrófilos, macrófagos y gran cantidad de espacios aéreos llenos de fibrilla y vasculitis séptica de pequeños vasos sanguíneos. Puede haber fibrosis pulmonar y función pulmonar disminuida como secuelas a largo plazo.²⁶ Las legionelas no se tiñen bien con hematoxilina y eosina en cortes con parafina fijados con formalina, pero pueden observarse si se presentan en cantidad. Los métodos de impregnación argéntica, como los de Dieterle, Steiner o Warthin-Starry, tiñen confiablemente los microorganismos.¹⁴⁸ Las técnicas de impregnación argéntica son inespecíficas y tiñen a casi todos los microorganismos, además de *Legionella*. La tinción de Gram tisular de Brown-Hopps también demuestra las bacterias, pero es esencial una atención cuidadosa a los detalles, además de controles apropiados.

Siempre que sea posible, se deben preparar improntas frescas de material de biopsia pulmonar, porque la visualización y el análisis de todas las bacterias son más fáciles en los frotis que en los cortes histológicos. Las legionelas se pueden demostrar con los procedimientos de Giemsa, Gram-Weigert y Gram, sobre todo si se agrega fucsina básica al 0,05% a la contratinción tradicional con safranina en el procedimiento de Gram (véase lámina en color 10-1). Los microorganismos son patógenos intracelulares facultativos y pueden hallarse dentro de los macrófagos y los neutrófilos o fuera de la célula.

Una característica definida de *L. micdadei* es la ácido-alcohol resistencia del material clínico, propiedad que se pierde después del cultivo en agar. Puede ser necesaria una decoloración modificada, como se utiliza para especies de *Nocardia*. Se han registrado algunos casos en los cuales se aisló *L. pneumophila* de una muestra en la cual se habían demostrado bacilos ácido-alcohol resistentes.¹² Sin embargo, es difícil asegurar que no se presentaba una infección simultánea por *L. micdadei*, ya que es más complicado aislar esta especie que *L. pneumophila*.

El conocimiento de la patogenia de la legionelosis ha progresado considerablemente.^{64 141 49,57,79} Las bacterias son patógenos intracelulares facultativos y se reproducen en forma predominante dentro de las células del sistema monocitos-macrófagos, que incluye sobre todo macrófagos pulmonares. En el medioambiente natural distintas amebas de vida libre son los macrófagos de la naturaleza. Las legionelas a menudo son fagocitadas por neutrófilos polimorfonucleares, pero no parecen reproducirse en estas células. Dentro de los macrófagos, las lesiones inhiben la fusión de fagolisosomas y la acidificación del fagosoma; se siguen multiplicando hasta que la célula del huésped se rompe y libera los microorganismos, que luego pueden infectar otras células fagocíticas. La patogenia detallada es tema de una investigación progresiva e intensa. La inmunidad

celular y no la humoral parece desempeñar un papel central en la defensa del huésped contra las legionelas.

Aspectos epidemiológicos y ecológicos de la legionelosis

Las especies de *Legionella* están difundidas tanto en el medioambiente natural como en el diseñado por el hombre. La enfermedad de los legionarios y la fiebre de Pontiac se pueden contraer por la exposición a una amplia variedad de fuentes ambientales, pero no hay ninguna evidencia convincente de un estado de portador en seres humanos o de transmisión persona a persona. Por lo tanto, no existe ninguna prueba de que los pacientes que tienen o han tenido una enfermedad de los legionarios sean "contagiosos". Más aún, no se ha probado que las especies de *Legionella* sean más peligrosas para el personal que las bacterias aisladas de rutina en el laboratorio de microbiología clínica. Las fuentes más probables de propagación son la inhalación de microorganismos aerosolizados desde fuentes ambientales o posiblemente la aspiración de microorganismos presentes en agua o en contenido orofaríngeo. Sigue siendo de interés la revisión temprana efectuada por Broome.²²

Incidencia

Si bien la legionelosis ha sido documentada en todo el mundo, la morbilidad asociada tanto con casos epidémicos como esporádicos está subcomunicada en las estadísticas de salud pública. No sólo la mayoría de los países carecen de un sistema de vigilancia orientado a rastrear la enfermedad, sino que los médicos y los laboratorios de microbiología pueden pasar por alto la infección debido a la falta de conciencia por parte de los primeros o porque los laboratorios no utilizan métodos diagnósticos correctos.⁷⁰

En general, se ha calculado que menos del 1-5% de los casos de neumonía son causados por especies de *Legionella*, pero es probable que esto sea una simplificación exagerada.³⁶ En los brotes de la enfermedad de los legionarios (por oposición a la fiebre de Pontiac), las tasas de ataque para la población de alto riesgo expuesta suelen ser bajas, pero se han comunicado hasta del 30%.⁶ Las especies de *Legionella* (6,7% de los agentes causales) se ubicaron como tercer agente etiológico (luego de *Streptococcus pneumoniae*, 15,3% y *Haemophilus influenzae*, 10,9%) de la neumonía adquirida en la comunidad en 359 pacientes internados en hospitales universitarios, comunitarios y de los Veterans Affairs examinados en un estudio multicéntrico de los Estados Unidos.⁵³ En otros países, la frecuencia de casos esporádicos de neumonía adquirida en la comunidad causados por especies de *Legionella* variaron del 2% en el Reino Unido al 3-4% en Alemania y el 10% en Francia.¹²⁶ La incidencia de fiebre de Pontiac en la población general se desconoce. Fuera de una circunstancia de brote, es probable que los casi esporádicos casos de fiebre de Pontiac no sean reconocidos. De todos modos, la definición de fiebre de Pontiac es parcialmente epidemiológica; la diferenciación de los casos no neumónicos esporádicos de "enfermedad de los legionarios" y fiebre de Pontiac es clínicamente imposible. Se han comunicado casos de las formas neumónica y no neumónica (fiebre de Pontiac) de la misma exposición a las bacterias ambientales, que reflejan sobre todo diferencias en las defensas del huésped en la cantidad de las bacterias inhaladas.

Cuando se evalúan estudios de incidencia, es importante reconocer el sesgo intrínseco introducido por los métodos ele-

gidos por los investigadores, por la factibilidad de diagnosticar algunas causas de neumonía y probablemente también por los intereses intrínsecos de quienes recogen los datos. En un estudio extenso reciente de neumonía adquirida en forma ambulatoria, las especies de *Legionella* estaban muy abajo en la lista de agentes etiológicos.¹⁶ En todos los estudios el agente causal más frecuente fue "desconocido".

Legionellaceae en el medioambiente

Como ya se mencionó, las especies del género *Legionella* están presentes en diversos hábitats naturales y creados por el hombre. Numerosos estudios se han centrado en la ecología de las especies que habitan en los espacios creados por el hombre, como las torres de enfriamiento que utilizan evaporación de agua y los sistemas de agua potable (de bebida) dentro de los edificios, los cuales probablemente sirven como "amplificadores" o diseminadores de legionelas originadas en ambientes naturales.

HÁBITATS NATURALES

Se han hallado especies de *Legionella* en fuentes naturales de agua en todo el mundo, incluida el agua subterránea.¹²⁰ Estas especies están distribuidas en lagos, charcas, arroyos y en manantiales tanto de aguas frías como tibias. Se las ha aislado de hábitats acuáticos con temperaturas que varían desde 5,7 °C hasta 63 °C⁶¹ y en aguas calientes de manantial utilizadas para hidroterapia.¹⁷ Parece existir una mayor concentración de especies de *Legionella* en aguas más calientes (30 °C a 45 °C) que en agua con temperaturas más frías.¹⁵¹ En Puerto Rico, se recuperaron legionelas de aguas marinas y de epífitos en los árboles.¹¹⁵

Aunque se afirmó que el suelo (p. ej., el polvo esparcido por el viento desde una excavación) tuvo una participación epidemiológica (pero que no fue estudiado desde el punto de vista microbiológico) como fuente de *Legionella* en uno de los primeros brotes de enfermedad de los legionarios, existen pocas comunicaciones de intentos de aislar especies de *Legionella* del suelo. *L. pneumophila* y *L. bozemanii* fueron aislados en muestras de suelos húmedos poco después del reconocimiento de los microorganismos.¹⁰⁵ Más recientemente, Steele y cols. aislaron *L. pneumophila*, *L. longbeachae* serogrupo 1 y *L. micdadei* en tierra de macetas en Australia.¹³⁷ *L. longbeachae* serogrupo 1 también fue aislado en suelos naturales y en aserrín de pino. Algunos estudios epidemiológicos y microbiológicos del sur de Australia relacionados con un brote de legionelosis debida a *L. longbeachae* serogrupo 1 sugirieron que el suelo, y no el agua, podría ser el hábitat natural de *L. longbeachae* serogrupo 1 y que el suelo podría ser la fuente de este microorganismo en la enfermedad humana. En este estudio, los trabajos de jardinería en el suelo, antes que la exposición a agua contaminada con *L. longbeachae*, parecieron ser el principal factor de riesgo ambiental.¹³⁶ Se necesitan muchas más investigaciones sobre la ecología de las especies de *Legionella* en los hábitats acuáticos y terrestres.

HÁBITATS ACUÁTICOS CREADOS POR EL HOMBRE (ARTIFICIALES)

Numerosos informes asociaron la presencia de *L. pneumophila* en el agua potable caliente de edificaciones con la aparición de legionelosis. Las legionelas parecen sobrevivir a los procedimientos habituales de cloración de las instalaciones de tratamiento de aguas municipales y, por lo tanto, no es inespe-

rada su presencia en el agua potable provista a hogares, edificios de departamentos, hoteles, hospitales y otros edificios.^{3,140} En algunos casos se han hallado grandes concentraciones de *Legionella* en el agua potable caliente, sobre todo cuando no excedía de 55 °C. Además de la temperatura del agua, la construcción de los sistemas de plomería parece desempeñar un papel importante; por ejemplo, ciertos tipos de resinas en las juntas; extremos muertos o fondos de saco, donde existe estasis, obstrucción o estancamiento del flujo de agua; y las biopelículas o capas de limo sobre la superficie de caños que contienen otras bacterias comensales, protozoos y algas pueden favorecer la presencia de legionelas.^{94,135} Muchos de estos estudios fueron realizados antes de reconocerse la importancia de los protozoos ambientales y no está claro si alguna de las asociaciones puede haber sido fortuita en lugar de causal. Se han definido algunos de los factores asociados con una mayor replicación de las bacterias en los hogares,²⁸ pero abordar el problema a nivel residencial es prácticamente imposible. Cabe señalar que la infección adquirida al parecer intrahospitalariamente, en realidad puede haber sido adquirida en el hogar del paciente.¹²⁹

En la sociedad moderna los mecanismos por los cuales las bacterias del agua pueden dispersarse por aerosoles y transmitirse al aparato respiratorio son muchos. En 1990, los CDC comunicaron un brote de enfermedad de los legionarios adquirida en la comunidad que afectó a 33 personas, que se relacionó con un atomizador ubicado en el depósito de un almacén.⁹⁷ La máquina generaba un aerosol de agua corriente (que presumiblemente contenía *L. pneumophila*) en gotitas inhalables (2-5 µm) sobre el mostrador de los productos. El sistema utilizaba transductores ultrasónicos ubicados en el reservorio de agua corriente del humidificador para crear la niebla.

Otras fuentes públicas de infección son las fuentes ornamentales.⁷⁶ Los baños con hidromasajes se han asociado con frecuencia con casos de legionelosis.^{52,71} La popularidad de estos baños, tan eficientes para diseminar bacterias a través del agua, se extiende al alta mar, de modo que los marineros de aguas fluviales no son los únicos en riesgo. Espectacularmente, la pesquía de un brote grande vinculado con una exposición de flores en Holanda condujo a las piscinas de hidromasajes que se utilizaron en las exhibiciones.³⁰ También se recuperó una cepa de *L. pneumophila* de un rociador utilizado en las exhibiciones, pero el genotipo de esta cepa era diferente de aquel de las dos piscinas de hidromasajes y del de los pacientes infectados. Estas experiencias destacan la importancia del cultivo bacteriano y del análisis molecular de cepas clínicas y ambientales durante la investigación de una epidemia.

Aunque en varias ocasiones se han aislado legionelas en cabezales de ducha y en el agua de las duchas, la evidencia epidemiológica de que las duchas o el uso del agua de las duchas conducen a la legionelosis ha sido algo débil.^{62,108} Las pruebas de apoyo informadas por Breiman y cols. a partir de una investigación de un brote de enfermedad de los legionarios en un hospital en Dakota de Sur fortaleció la hipótesis de que el agua de ducha vaporizada puede servir como vehículo para la propagación de *Legionella pneumophila* a los pacientes.⁹ Tal vez el caso más extraño de enfermedad de los legionarios asociada con agua fue una infección neonatal que se adquirió durante un nacimiento ocurrido en la tina de hidromasaje de una casa.¹¹²

Los factores que promueven el crecimiento de legionelas en los sistemas y equipos de plomería son poco conocidos a pesar de las numerosas publicaciones al respecto. Las legionelas son microorganismos con requerimientos nutricionales especiales que necesitan medios enriquecidos para crecer en el laboratorio y es poco probable que el agua potable aporte todos sus

requerimientos para el crecimiento y energéticos. Rowbotham fue el primero en comunicar que las especies de *Legionella* se multiplican en íntima asociación con amebas acuáticas y terrestres de vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* (véase cap. 22).¹²⁴ Otros autores han confirmado y ampliado estas observaciones, no sólo con *Acanthamoeba* y *Naegleria*, sino también con otras amebas, como *Hartmannella* y los ciliados *Tetrahymena*.^{59,113,150} Por lo tanto, las amebas o los ciliados fagocitan a las legionelas, como lo hacen otras bacterias en la naturaleza y luego las legionelas sobreviven y se multiplican en hábitats nutricionalmente deficientes mediante una vida parasitaria dentro de los protozoos. Además, se ha sugerido que las amebas, que forman quistes, podrían ofrecer una nueva protección a las legionelas dentro de los quistes contra los efectos del cloro.^{87,134} Los científicos han aprovechado esta asociación para aumentar la recuperación de legionelas del medioambiente y las cepas de una especie, *L. lytica*, sólo crecen intracelularmente en amebas.

Legionelosis en viajeros

Desde el brote de la enfermedad de los legionarios de 1976, que ocurrió en viajeros que iban a Filadelfia, se reconocieron casos epidémicos y esporádicos asociados con viajes en muchos países de todos los continentes.^{85,123} No está clara la verdadera incidencia de la enfermedad asociada con los viajes. Es probable que los casos sean subcomunicados no sólo debido al subdiagnóstico y a la falta de conocimiento de su importancia epidemiológica; también es concebible que se trate de las preocupaciones por el efecto adverso de la publicidad sobre el turismo. No obstante, todos los años ocurren casos agrupados y casos esporádicos relacionados sobre todo con los sistemas de agua de los hoteles contaminados con legionelas. No es sorprendente que los brotes puedan ser recurrentes y persistentes hasta que se detecte y se corrija la naturaleza del problema. También se han observado casos agrupados en los viajeros que han estado a bordo de cruceros.

Los casos aislados o agrupados de infección por *Legionella* asociados con viajes deben comunicarse a las oficinas de salud pública estatales y federales y conducir a investigaciones sobre la fuente y la magnitud del brote para evitar una mayor propagación entre los viajeros. Como se demostró por primera vez en la epidemia de Filadelfia de 1976 y se confirmó en repetidas oportunidades, es posible que la recolección de múltiples notificaciones individuales de enfermedad en un sitio común, como una institución de salud pública, lleve al reconocimiento del problema.

Al parecer, la enfermedad esporádica no ligada a viajes puede estar relacionada también con un foco epidémico no reconocido.¹⁴ Bhopal ha sugerido estrategias que pueden ser útiles para que las autoridades de salud pública detecten problemas en sus áreas de influencia.¹³

Un cambio reciente sobre el tema de la infección asociada con los viajes ha sido el reconocimiento de que quienes viajan en cruceros de vacaciones están expuestos al riesgo de contraer esta y otras infecciones.²⁵ Como ha sucedido con los complejos turísticos en "tierra firme", estas infecciones han sido originadas en los sistemas de agua contaminados, como las piscinas de hidromasajes.

Brotes intrahospitalarios de legionelosis

En las poblaciones hospitalizadas hay pacientes que pueden estar inmunodeprimidos y son muy vulnerables a las infeccio-

nes en general. Estos pacientes tienen el riesgo de adquirir legionelosis si están expuestos a microorganismos virulentos.

La fuente habitual de *Legionella* en los pacientes hospitalizados es el agua¹³¹ (principalmente el sistema de agua caliente), sobre todo de duchas o de baños.⁵⁰ Además, los pacientes pueden infectarse de las torres de refrigeración que forman parte del complejo sanitario o que están adyacentes a él.^{1,67} Otras fuentes documentadas son las sondas nasogástricas (con microaspiración de legionelas en agua contaminada), los humidificadores, el equipo de terapia respiratoria (p. ej., máscaras y nebulizadores manuales lavados con agua corriente contaminada), los hidromasajes y otras fuentes menos frecuentes. El diagnóstico temprano de legionelosis y la vigilancia epidemiológica de casos dentro del hospital son necesarios no sólo para un tratamiento rápido y eficaz sino para ayudar a instituir medidas de control para evitar los casos ulteriores. Debido a la alta mortalidad de la enfermedad de los legionarios intrahospitalaria (rango, 30-50%) sería prudente esforzarse por evitar la propagación de las especies de *Legionella* del medioambiente hospitalario a los pacientes que estén más predispuestos a adquirir la infección.

La enfermedad de los legionarios intrahospitalaria ha sido ligada también específicamente al uso de agua corriente para limpiar nebulizadores utilizados para la administración de medicación y a otro equipamiento de terapia respiratoria. En un informe de Mastro y cols., el agua corriente contaminada con *L. pneumophila* usada para lavar nebulizadores fue una fuente de contaminación importante que condujo a un brote intrahospitalario de enfermedad de los legionarios en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.¹⁰¹ En un número de casos agrupados particularmente ilustrativos, se observó que la enfermedad fue más frecuente en los pacientes que recibían corticosteroides y a su vez estaban expuestos a nebulizadores o humidificadores ambientales que utilizaban agua corriente.⁸

Es preocupante el hecho reciente de que algunos casos de enfermedad intrahospitalaria de los legionarios se hayan producido por microaspiración de agua contaminada con especies de *Legionella* en pacientes con sondas nasogástricas.^{15,41,100,99} Un problema diferente se constató en el Stanford University Medical Center cuando algunos pacientes posquirúrgicos que habían sido bañados con agua corriente desarrollaron infecciones por legionelas en las heridas. Las bacterias ingresaron directamente a través de las heridas,⁹⁵ mientras que en los otros casos se constató que la diseminación fue posterior a la introducción a través del aparato respiratorio.

Debido a estos sucesos y a la relativa facilidad con la cual se puede utilizar agua estéril en individuos de alto riesgo, es difícil justificar o defender el uso de agua corriente en estos casos.⁵

Diagnóstico de laboratorio

La base para el diagnóstico sigue siendo el cultivo, que es absolutamente específico y permite el aislamiento para el estudio epidemiológico y la tipificación molecular. La detección de antígeno urinario es una técnica auxiliar útil, sobre todo en los pacientes que no producen esputo suficiente para el cultivo. La detección de ácidos nucleicos todavía no ha alcanzado una comercialización amplia ni características prácticas, pero es probable que se convierta en un recurso diagnóstico importante en el futuro.¹¹⁰ El diagnóstico serológico requiere seroconversión y, por lo tanto, es retrospectivo; es útil para la investigación de epidemias, pero no tiene un papel primario en el diagnóstico de infecciones en pacientes individuales. Las limi-

taciones de las pruebas diagnósticas actuales han sido explicadas por Waterer y cols;¹⁵³ sin embargo, Marrie ha expuesto las razones para continuar intentando la confirmación de laboratorio ante la sospecha clínica.⁹⁸

Selección, recolección y transporte de muestras clínicas

El amplio espectro clínico y la morbimortalidad grave de la enfermedad de los legionarios destacan la necesidad de un diagnóstico de laboratorio rápido y preciso. Cuando hay sospecha clínica de legionelosis, se deben recoger muestras de las vías respiratorias bajas, tanto para cultivo como para pruebas de inmunofluorescencia directa (IFD). Las muestras apropiadas son esputo obtenido por expectoración, materiales recogidos mediante broncoscopio (p. ej., cepillado bronquial, biopsia, lavado o lavados), aspirado transtraqueal, material de biopsia a cielo cerrado y a cielo abierto, aspirados con aguja fina de pulmón y líquido pleural. En la mayoría de las situaciones es apropiado tomar cultivos para especies de *Legionella* sólo ante una solicitud específica. Sin embargo, sería conveniente incluir las legionelas en el espectro de patógenos que se investigan cuando se cultiva tejido pulmonar, tanto si se obtiene ante mórtem como post mórtem. Este cultivo de rutina puede servir como parte del sistema de advertencia de que estos patógenos asociados con el agua constituyen un problema en una institución particular.

El aislamiento primario de legionelas en medios sólidos ha sido exitoso a partir de biopsias pulmonares a tórax cerrado y a tórax abierto, líquido pleural y aspirados transtraqueales, muestras de lavado broncoalveolar y esputo. Se cuenta con un medio selectivo razonablemente semieficaz para el aislamiento primario de *L. pneumophila* en esputo y muestras bronquiales contaminadas.^{37,39,156}

Las muestras deben recogerse con cuidado para evitar los aerosoles y transportarse al laboratorio a temperatura ambiente en recipientes estériles a prueba de pérdidas, preferiblemente dentro de las 2 horas de la recolección. Las muestras que deben enviarse al laboratorio de referencia deben ser refrigeradas o conservadas en hielo húmedo si se prevé una demora de menos de 2 días. Las que van a almacenarse durante días o semanas pueden enviarse en hielo seco. Las muestras que van a ser remitidas a un laboratorio de referencia deben empaquetarse y enviarse de acuerdo con las reglamentaciones federales (véase cap. 1). Si se las va a remitir sólo para estudio anatomopatológico y se las fija en formalina neutra con buffer antes de su envío, no es necesario refrigerarlas o congelarlas durante el transporte.

Se ha aislado *L. pneumophila* de hemocultivos en algunas ocasiones utilizando medios convencionales con suplemento de L-cisteína y pirofosfato férrico, o utilizando medios aerobios y anaerobios radiométricos BACTEC (Becton Dickinson Instrument Systems, Sparks, MD) sin suplementos especiales.⁴⁵ El subcultivo a ciegas de los frascos para aerobios y anaerobios de BACTEC en BCYE α parece ser necesario para el aislamiento de legionelas. Como ya se dijo, también se pueden hallar legionelas (pocas veces) en localizaciones extrapulmonares. Sin embargo, no se ha establecido el valor práctico (o la relevancia clínica) de buscar especies de *Legionella* en hemocultivos o sitios extrapulmonares. Además de las muestras anteriores, se debe recoger orina (de preferencia una muestra matinal temprana) para la detección del antígeno de *Legionella*.

Se debe recoger una muestra sérica inicial de fase aguda como auxiliar de otras pruebas que hagan posible un diagnóstico más rápido. Se recoge una muestra sérica de seguimiento

dentro de las 2 a 6 semanas después de la recolección de la muestra de fase aguda, para poder demostrar una elevación de cuatro veces en el título de anticuerpos contra *Legionella*. Por necesidad, el diagnóstico será retrospectivo, pero puede ser el único medio para diagnosticar la infección en algunos pacientes, sobre todo en aquellos con mínima secreción de esputo.¹⁵⁶ Lamentablemente, la elevación diagnóstica de cuatro veces en el título de anticuerpos puede ser lenta y ocurrir en no más del 75-80% de los pacientes en los que finalmente se comprueba que tienen enfermedad de los legionarios.¹⁵⁶ Además, algunas personas que presentan seroconversión se mantienen asintomáticas (probablemente debido a la infección subclínica).

Examen directo de muestras clínicas

EXÁMENES MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO

DE MATERIALES TEÑIDOS

El examen macroscópico de muestras de pulmón puede ayudar al patólogo a seleccionar las mejores áreas para el cultivo o el examen histológico. Se deben preparar frotis directos de exudados o preparados de improntas (frotis por contacto sobre un portaobjetos) de material fresco de biopsia pulmonar. Los cortes por congelación de las muestras pulmonares también son útiles para el diagnóstico. Los cortes por congelación y los preparados de improntas deben colocarse en metanol para su fijación si se desea emplear tinción de Gram, hematoxilina y eosina, tinción de Giemsa, "Diff-Quik" o tinción ácido-alcohol resistente modificada de Kinyoun. La tinción de Giemsa es útil para observar legionelas y otras bacterias en preparados de improntas de material pulmonar o broncoscópico frescos. Sin embargo, también debe realizarse una tinción de Gram por su utilidad para el diagnóstico diferencial.

EXAMEN MICROSCÓPICO DE MATERIALES TEÑIDOS

La tinción de Gram puede utilizarse con distintas muestras (p. ej., aspirados transtraqueales, líquido pleural, aspirados de empiema torácico, punción pulmonar con aguja fina y preparados por improntas de material pulmonar). Es mejor la fijación con metanol que la fijación con calor; asimismo, se puede mejorar la intensidad de la tinción aumentando el tiempo de tinción con safranina a 10 minutos o más. Como alternativa, algunos investigadores han agregado carbolfucsina al 0.05% a la safranina para mejorar la intensidad de la tinción con la contratinción. La tinción de Gram-Weigert, "Diff-Quik" o Giemsa puede poner de manifiesto más microorganismos de los que se pueden ver con la tinción de Gram habitual. En los cortes histológicos embebidos en parafina y fijados con formalina, no es posible ver fácilmente *Legionella* en los preparados teñidos con hematoxilina y eosina, Gram, Brown-Brenn, Brown y Hopps o MacCallum-Goodpasture. La tinción de metenamina plata de Gomori (GMS) y la tinción del ácido peryódico de Schiff no son útiles para demostrar legionelas. Una tinción ácido-alcohol resistente modificada, como la realizada para las especies de *Nocardia*, es útil para demostrar *L. micdadei*¹¹¹ y posiblemente algunas cepas de *L. pneumophila*. Todas estas tinciones pueden realizarse en extendidos por impresión o cortes titulares, pero son más satisfactorias en frotis de gota fina. Un método histoquímico muy sensible para demostrar bacterias de todos los tipos es una de las tinciones de impregnación argéntica, creada originariamente para las espiroquetas. Al principio se utilizó una tinción de Dieterle modificada; los microorganismos se tiñen de negro a pardo oscuro. También funcionan otras técnicas de impregnación argéntica, como los métodos de Steinert y de Warthin-Starry. Estas tinciones argén-

ticas suelen realizarse en cortes histológicos y son cambiantes; la elección óptima es la tinción que mejor realiza el laboratorio local. Aunque son sensibles, los granos de plata depositados en estas tinciones oscurecen la morfología bacteriana y, por supuesto, no se puede determinar la reacción de Gram. En la lámina en color 10-1A, B y D se muestra la morfología de *L. pneumophila*.

INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA (IFD)

Los ensayos de inmunofluorescencia directa, creados por Cherry y cols. en los CDC,²⁷ se han utilizado con éxito para la detección rápida de especies de *Legionella* en muestras clínicas del aparato respiratorio. Comparados con los cultivos, la IFD tiene baja sensibilidad (25-70%).¹⁶² La especificidad ha sido alta, pero cuando existe baja prevalencia de infección por *Legionella*, los resultados falsos positivos son inaceptablemente frecuentes. Además de las reacciones cruzadas inmunológicas potenciales, la contaminación con bacterias ambientales parece haber causado algunos resultados falsos positivos, aun cuando se ejerza un cuidado escrupuloso al realizar la prueba. Por lo tanto, no se puede recomendar el uso de inmunofluorescencia para el diagnóstico directamente en muestras del paciente.

Sin embargo, la inmunofluorescencia es un método útil para la identificación de bacterias aisladas se comercializan antisueños polivalentes conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), así como sueros de control y otros reactivos para pruebas de IFD de *Legionella*. Genetic Systems (Seattle, WA) ofrece un conjugado de anticuerpos monoclonales que tiene la ventaja de disminuir la cantidad de resultados falsos positivos mientras retiene la capacidad de reaccionar con la mayoría de los serotipos de *L. pneumophila*.⁴³ Como nota de precaución, cabe señalar que el conjugado monoclonal de Genetic Systems para IFD no pudo detectar *L. pneumophila* en los tanques de almacenamiento de agua caliente y fría ni en muestras de hisopados de duchas y de un grifo de agua;¹⁴⁹ por lo tanto, no se puede recomendar para los estudios de IFD de agua potable u otras muestras de sistemas de agua artificiales y su realización en estudios de agua de hábitats naturales es incierta.

Al realizar la prueba de IFD, los anticuerpos específicos en forma de antisuero polivalente marcado con FITC (conjugado) dirigido contra el/los antígeno/s por detectar se adquieren en el comercio. Se deben seguir exactamente las instrucciones del fabricante del equipo. El antígeno (presente en la superficie de *Legionella* o dentro de estos microorganismos) se fija sobre un portaobjetos y luego se recubre con anticuerpos marcados con FITC. El antígeno se une a la globulina en el anticuerpo marcado con FITC y forma un complejo antígeno-anticuerpo (que no se elimina cuando se lo enjuaga suavemente con buffer) que es visible por la excitación del FITC con luz ultravioleta. Cuando el/los antígeno/s de una especie de *Legionella* ha reaccionado con anticuerpos conjugados con FITC, la exposición a la luz ultravioleta hace que el FITC emita longitudes de onda de luz más largas en la región amarillo-verde del espectro de colores, y se pueden ver las bacterias (utilizando un microscopio de fluorescencia) como bacilos amarillo verdosos de fluorescencia brillante.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO EN ORINA Y LÍQUIDOS CORPORALES

Los procedimientos para detectar antígenos *Legionella* en orina, creados por Kohler y cols. en el Indiana University Medical Center, son radioinmunoanálisis, ensayo inmunosorbente enzimático y aglutinación del látex.⁹² Los inmunoanálisis

comerciales para la detección de antigenuria causada por *L. pneumophila* serogrupo 1 tienen una sensibilidad de alrededor del 80-90% y una especificidad que se aproxima al 100%. En el pasado, se utilizaron radioinmunoanálisis, inmunoanálisis enzimáticos y ensayos de aglutinación de partículas. Actualmente, también existe un ensayo en bandas inmunocromatográficas (Binax NOW, Portland, Maine), que es muy útil, sobre todo en los pacientes que no producen un esputo suficiente para el cultivo. Las limitaciones incluyen la restricción a un único serogrupo, si bien es el patógeno humano más frecuente en el género, y la excreción prolongada de antígeno en algunos pacientes. En particular, es probable que los pacientes inmunosuprimidos que tienen una resolución tardía de la fiebre excreten antígeno durante más de 60 días.¹³³ Por lo tanto, la detección de antígeno urinario debe correlacionarse en forma cuidadosa con la historia clínica antes de adjudicar la infección actual a *Legionella*.⁹¹ También se describieron reacciones cruzadas ocasionales entre los serogrupos de *L. pneumophila*.⁹⁰

Detección de Legionella en muestras clínicas

Aislamiento de especies de Legionella en muestras clínicas

El cultivo bacteriológico de *Legionella* es la forma preferida (y por lo tanto el patrón de referencia) para el diagnóstico de la legionelosis.¹⁶⁵ Según Bridge y Edelstein, el cultivo es 1.5-3 veces más sensible que la prueba de IFD. No se aíslan de rutina especies de *Legionella* de la flora normal de las vías respiratorias altas, aunque la prueba de DFA para *L. pneumophila* fue positiva en algunos individuos sanos,²¹ si bien no se estableció la especificidad de la reacción de DFA.

El medio sólido no selectivo recomendado para el aislamiento de legionelas es el agar cabón-extracto de levadura con buffer (BCYE α), que contiene L-cisteína, pirofosfato férrico, buffer ACES (ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetanosulfónico), ácido α -cetoglutárico y carbón activado (BCYE α) y se comercializa con diferentes marcas de diversos fabricantes. Además de BCYE α , se recomienda utilizar uno o más medios selectivos para evitar el sobrecrecimiento exagerado de la flora normal y la posibilidad de que otros microorganismos inhiban el crecimiento de *Legionella*. Se han agregado antibióticos a la base BCYE α , lo que conduce a medios selectivos razonablemente eficaces. Un medio selectivo útil contiene base (BCYE α) con suplemento de cefamandol, polimixina B y anisomicina (BMPA α); un segundo medio contiene glicina, vancomicina, polimixina B y anisomicina (denominado medio "de Wadowsky-Yee modificado" o medio de MWY). El cefamandol en BMPA α puede inhibir las especies de *Legionella* que no producen β -lactamasa, mientras que el medio MWY no es tan selectivo como BMPA α . Los medios selectivos con base de BCYE α se encuentran ampliamente disponibles en el comercio. Como los medios selectivos pueden inhibir a algunas legionelas, se los debe utilizar junto con BCYE α no selectivo.

BIOPSIA, EXTIRPACIÓN QUIRÚRGICA Y TEJIDO DE NECROPSIA

Para inocular los medios BCYE α o BMPA α , se debe tocar suavemente con la superficie fresca de corte del pulmón en el primer cuadrante y se utiliza un ansa de inoculación estéril para transferir este inóculo a los otros cuadrantes para su aislamiento primario. Como alternativa, se puede utilizar un molinillo tisular estéril para homogeneizar trozos de 1 a 2 mm de tejido picado en 0,5 a 1 mL de un caldo estéril (como caldo triptica-soja o medio de tioglicolato enriquecido). Después de la

homogeneización, se inocula el medio de siembra aproximadamente con 0,1 mL del homogeneizado y se lo siembra en estría para su aislamiento. Además, se deben preparar portaobjetos para tinción de Gram de la misma muestra.

LÍQUIDO PLEURAL Y ASPIRADOS TRANSTRAQUEALES

El líquido pleural y los aspirados transtraqueales se siembran directamente en los medios selectivos y no selectivos como se hace para los homogeneizados tisulares. Se incuban las placas de BCYE α o BMPA α en una incubadora con CO₂ al 5-10% a 35 °C y se las examina diariamente durante 5 días; se las puede examinar mejor cada 2 a 3 días hasta durante 2 semanas. Se inoculan otros medios para las muestras de las vías respiratorias bajas (p. ej., agar sangre de carnero, agar chocolate y agar de MacConkey) y se los incuban de la forma habitual. Se procesa mejor la misma muestra utilizada para el cultivo haciendo frotis para la tinción de Gram.

PROCEDIMIENTO DE DESCONTAMINACIÓN POR LAVADO ÁCIDO PARA ESPUTO Y OTRAS MUESTRAS CONTAMINADAS

Los medios selectivos disponibles para el aislamiento primario de legionelas no son completamente selectivos y, por lo tanto, permiten el crecimiento intercurrente de algunos microorganismos no deseados (p. ej., especies de *Bacillus* o especies de *Pseudomonas*). Además, el crecimiento de legionelas en BCYE α puede ser inhibido por otras bacterias en las muestras clínicas, aun cuando se incorporen antibióticos en los medios selectivos. Se ha comunicado que el tratamiento de las muestras respiratorias contaminadas como esputo, lavados bronquiales y aspirados traqueales con una solución ácida de lavado antes de la inoculación de placas de BCYE α y BMPA α mejora el aislamiento de *Legionella*.²⁴ Se puede utilizar el protocolo explicado en el recuadro 10-1 para el procesamiento de las muestras que contienen flora normal. Sin embargo, cabe señalar que no existe ninguna otra comunicación que confirme ni refute la eficacia del tratamiento con ácido, de modo que se debe evaluar el trabajo extra involucrado en cada laboratorio. El tratamiento

Recuadro 10-1 Protocolo para la descontaminación por lavado ácido de esputo y otras muestras contaminadas

1. Antes de realizar el tratamiento con ácido de la muestra, preparar seis frotis para la prueba de IFD.
2. Inocular una placa de BCYE α y una placa de BMPA α con tres a cinco gotas de la muestra respiratoria no tratada y sembrar en estría para el aislamiento.
3. Agregar 0,5 mL de muestra respiratoria a 4,5 mL de solución ácida (KCl-HCl 0,2 M) en un tubo con tapa a rosca.
 - a. Sellar apretadamente el tubo y mezclar con cuidado agitando bajo una capucha de seguridad.
 - b. Dejar reposar la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Inocular un segundo conjunto de placas de BCYE α y BMPA α con tres a cinco gotas de la mezcla ácido-muestra preparada en el paso 3 y sembrar en estría para aislamiento. Marcar las placas con una "A" para identificar las placas inoculadas después del tratamiento con ácido.
5. Colocar las cuatro placas inoculadas en bolsas de plástico permeables al CO₂ (dos por bolsa) e incuban en CO₂ a 35 °C durante 2 semanas. Examinar cada 2 a 3 días para detectar crecimiento.

de las muestras con calor sólo mejoró en forma marginal el aislamiento de *Legionella* y no fue recomendado para su uso sistemático.⁴⁸

HEMOCULTIVOS

En ocasiones, la recolección de sangre para el cultivo de *Legionella* es útil en ciertas circunstancias clínicas. Se han utilizado tanto métodos de cultivo en caldo como de lisis-centrifugación. Se debe realizar un subcultivo a ciegas de los cultivos en caldo o la tinción con un método sensible como naranja de acridina, porque las legionelas no desencadenan regularmente indicadores de crecimiento en los sistemas comerciales. Los pacientes con hemocultivos positivos tuvieron concentraciones mucho más altas de legionelas en las muestras respiratorias que aquellos con hemocultivos negativos. No está clara la utilidad de realizar hemocultivos de rutina en los pacientes que no están tan gravemente enfermos.

Identificación de especies de *Legionella*

En los casos típicos, las colonias de *Legionella* aparecen en BCYE α después de 2 a 3 días de incubación en las áreas que han recibido un inóculo importante. Sin embargo, si sólo se presentan algunos microorganismos y si las placas han sido inoculadas ligeramente, pueden requerir varios días más para desarrollarse. Las colonias tienen un tamaño variable (puntiformes hasta 3 a 4 mm), son brillantes, convexas, circulares, ligeramente irregulares y tienen un margen entero (véase lámina en color 10-1C). Cuando se las examina a través de un microscopio de disección (7 $\times$ a 15 $\times$) parecen tener estructuras internas cristalinas o un aspecto moteado opalescente similar al de *Fusobacterium nucleatum* (véanse cap. 16 y lámina en color 10-1C y D). Algunas especies muestran una fluorescencia blanco azulada bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm) (véase lámina en color 10-1E); otras muestran una fluorescencia roja (cuadro 10-3). Las presentes colonias de *Legionella* deben subcultivarse en una placa de agar sangre de carnero al 5% común sin suplementos o BCYE α sin L-cisteína y en medio BCYE α que contiene L-cisteína. Los microorganismos que crecen en agar sangre de carnero al 5%, en BCYE α sin L-cisteína o en otros medios habituales (como agar de MacConkey) es probable que no sean *Legionella*. Se pueden aislar cepas ocasionales de especies de *Legionella* en agar chocolate enriquecido. Se deben caracterizar las cepas de bacilos gramnegativos con características típicas de las colonias de *Legionella* que crecen en medio BCYE α o BMP α después de 48 horas de incubación o más, pero no crecen en BCYE α que carece de L-cisteína o en agar sangre de carnero. La mayoría de estas cepas pertenecen a *L. pneumophila* serogrupo 1, pero existe variación geográfica en las especies y los serogrupos recuperados. La prueba de laboratorio más conveniente para confirmar *Legionella* ante un microorganismo sospechoso es la prueba IFD. Las colonias pueden ser evaluadas con los conjugados de anticuerpos fluorescentes mencionados antes para realizar el seroagrupamiento de la cepa aislada.

En ocasiones, se encuentran microorganismos que se asemejan a *Legionella*, pero que no reaccionan con los reactivos serológicos utilizados en la prueba de IFD. Todas las pruebas bioquímicas tienen un uso limitado (cuadro 10-3); la caracterización de los ácidos grasos celulares es útil si el laboratorio está preparado para realizar este análisis (cuadro 10-4). Sin embargo, para la mayoría de los laboratorios la conducta adecuada será remitir la cepa a un laboratorio de referencia para

determinar si representa un serogrupo para el cual no se dispone de reactivos o incluso una especie o un serogrupo que antes no fue reconocido. Cabe señalar que existen especies distintas de *Legionella* que requieren L-cisteína, no crecen en agar sangre y pueden asemejarse a *Legionella* en la morfología de las colonias y microscópica.¹⁶² Las pruebas utilizadas para la caracterización definitiva de las especies de *Legionella* en algunos laboratorios de referencia o de investigación comprenden pruebas serológicas, cromatografía gas-líquido de ácidos grasos celulares y estudios genéticos de ácidos nucleicos. Como ya se dijo, se demostró que la sonda de cDNA marcada con ¹²⁵I que se comercializa, diseñada para detectar rRNA de legionelas, diferencia entre los microorganismos de género *Legionella* y no *Legionella* que crecen en cultivo.¹⁴⁴ En la lámina en color 10-1 se muestran las características seleccionadas para el reconocimiento de laboratorio de las especies de *Legionella*.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

La mortalidad de los pacientes con legionelosis causada por *L. pneumophila* varía del 0% al 30%, según la circunstancia clínica y la población de pacientes. La eritromicina ha sido eficaz para reducir la tasa de letalidad e históricamente ha sido el fármaco de elección para la legionelosis. La mortalidad de la infección por *Legionella* se correlacionó tanto con la demora en la iniciación del tratamiento con eritromicina después de la hospitalización como con la demora total para administrar el antibiótico.⁷⁴

Como las especies de *Legionella* son patógenos intracelulares facultativos, que se reproducen dentro de los monocitos y los macrófagos, es muy probable que los antibióticos que son concentrados dentro de las células sean satisfactorios en el tratamiento. Los macrólidos más nuevos (p. ej., azitromicina y claritromicina) y las fluoroquinolonas (p. ej., ciprofloxacina y pefloxacina) son más activos in vitro y en modelos experimentales que la eritromicina, aunque la experiencia clínica con estos agentes sigue siendo limitada. Se sabe que la rifampicina es muy activa in vitro¹⁴⁴ y se podría administrar además de la eritromicina a algunos pacientes gravemente enfermos o que no responden a la eritromicina sola, pero no se debe administrar rifampicina aislada. Como alternativa, se ha recomendado doxiciclina combinada con rifampicina para pacientes moderada o gravemente enfermos. Otra posible opción es trimetoprima-sulfametoxazol con rifampicina o sin ella. Las penicilinas (p. ej., penicilina, carbenicilina, oxacilina); las cefalosporinas de primera generación (p. ej., cefalotina, cefazolina), de segunda generación (p. ej., cefamandol, cefoxitina) y presumiblemente las de tercera generación; los aminoglucósidos (p. ej., gentamicina, tobramicina, amikacina) y la vancomicina no son eficaces para el tratamiento. La prueba de sensibilidad a los antibióticos in vitro de las cepas aisladas de *Legionella* no ha sido estandarizada y no se correlaciona con la respuesta clínica a la antibióticoterapia en los pacientes. Por lo tanto, no se recomienda realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos in vitro cuando se isla *Legionella* en el laboratorio del diagnóstico del hospital porque los resultados no son interpretados fácilmente por el microbiólogo o el médico.

Inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se recomienda como auxiliar para el diagnóstico de legionelosis, sobre todo para pacientes que no pueden proporcionar muestras respiratorias suficientes (como esputo) para cultivo. La sensibili-

Cuadro 10-3 Características seleccionadas de especies de *Legionella* implicadas en enfermedades humanas*

ESPECIES DE <i>LEGIONELLA</i>	ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENCIA MODIFICADA EN EL TEJIDO	COLORACIÓN PARDA DE LOS MEDIOS QUE CONTIENEN TIROSINA	HIDRÓLISIS DE HIPURATO	LIQUEFACCIÓN DE GELATINA	PRODUCCIÓN DE β-LACTAMASA	OXIDASA	MOTILIDAD	AUTOFLUO- RESCENCIA
<i>L. amisa</i>	—	+	—	+	+	+	+	AB
<i>L. birminghamensis</i>	—	—	—	+	+	±	+	—
<i>L. bozemanni</i>	—	+	—	+	±	±	+	AB
<i>L. cincinnatiensis</i>	—	+	—	+	+	—	+	—
<i>L. dumoffii</i>	—	+ ^a	—	+	+	—	+	AB
<i>L. feeleyi</i>	—	+ ^(d)	±	±	—	—	+	—
<i>L. gormanii</i>	—	+	—	+	+	—	+	AB
<i>L. hackelii</i>	—	+	—	+	+	+	+	—
<i>L. jordanis</i>	—	+	—	+	+	+	+	—
<i>L. lansingensis</i>	—	—	—	—	—	+	+	—
<i>L. longbeachae</i>	—	+	—	+	±	+	+	—
<i>L. lytica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. maceachernii</i>	—	+	—	+	—	+	+	—
<i>L. micdadei</i>	+	— ^b	—	—	—	+	+	—
<i>L. oakridgensis</i>	—	+	—	+	+ ^(d)	±	—	—
<i>L. parisiensis</i>	—	+	—	+	+	+	+	AB
<i>L. pneumophila</i> subespecie <i>pneumophila</i>	— ^c	+	+ ^d	+	+	+/ [±]	+	—
<i>L. pneumophila</i> subespecie <i>fraseri</i>	—	+	±	+	+	+/ [±]	+	—
<i>L. pneumophila</i> subespecie. <i>pasculli</i>	—	+	+	+	+	+/ [±]	+	—
<i>L. sainthelensi</i>	—	+	—	+	+	+	+	—
<i>L. tuconsensis</i>	—	—	—	+	+	—	+	AB
<i>L. wadsworthii</i>	—	—	—	+	+	—	—	—

*Todas las especies son gramnegativas, muestran falta de crecimiento en agar sangre sin suplemento y requieren L-cisteína (presente en agar BCYEα) para el aislamiento primario (excepto para cepas adaptadas en laboratorio de *L. oakridgensis*, que pierden el requerimiento de L-cisteína). Son catalasa positivas o peroxidasa positivas. Ninguna reduce nitrato a nitrito, produce ácido a partir de D-glucosa ni produce ureasa. +: positivo; —: negativo; +^(d): reacción débil; ND: datos no disponibles; a: cepa negativa; d: débil; b: negativo en el aislamiento inicial; puede ser positivo luego de transferencia a agar BCYEα; c: raras cepas han sido aisladas de casos con bacilos ácido-álcali resistentes modificados en muestras clínicas; estas cepas no fueron divididas en subespecies; d: algunas cepas negativas; AB: autofluorescencia azulblancuzca. Adaptado de referencia ¹⁶².

Cuadro 10-4 Principales ácidos grasos celulares de las especies de *Legionella* aisladas en seres humanos*

ESPECIE	ÁCIDOS GRASOS CELULARES [†]
<i>L. anisa</i>	a-C _{15:0}
<i>L. birminghamensis</i>	a-C _{15:0} [‡] , i-C _{14h}
<i>L. bozemannii</i>	a-C _{15:0}
<i>L. cincinnatiensis</i>	i-C _{16:0} [‡] , i-C _{16h}
<i>L. dumoffii</i>	a-C _{15:0}
<i>L. feelei</i>	a-C _{15:0} [‡] , n-C _{16:1}
<i>L. gormanii</i>	a-C _{15:0}
<i>L. hackelii</i>	a-C _{15:0}
<i>L. jordanis</i>	a-C _{15:0}
<i>L. lansingensis</i>	a-C _{17:0} [‡] , a-C _{15h}
<i>L. longbeachae</i>	i-C _{16:0}
<i>L. maceachernii</i>	a-C _{15:0}
<i>L. micdadei</i>	a-C _{15:0}
<i>L. oakridgensis</i>	i-C _{16:0}
<i>L. pneumophila</i>	i-C _{16:0}
<i>L. saintelensis</i>	i-C _{16:0}
<i>L. tucsonensis</i>	a-C _{15:0} [‡] , n-C _{14h}
<i>L. wadsworthii</i>	a-C _{15:0}

*Se enumeran los principales ácidos grasos celulares (determinados mediante cromatografía gas-líquido) de las especies de *Legionella* aisladas de seres humanos. Estas bacterias son inusuales comparadas con las otras bacterias gramnegativas debido a sus cantidades relativamente grandes de ácidos celulares de cadena ramificada. El ácido más abundante de *L. pneumophila* y algunas cepas de *L. longbeachae* es i-C_{16:0}. Sin embargo, las cepas de *L. longbeachae* pueden tener i-C_{16:0} o C_{16:1} como ácido principal o los dos ácidos pueden estar presentes en cantidades aproximadamente iguales como los dos ácidos más abundantes. Por otra parte, el principal ácido graso de *L. bonzemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis* y algunos otros es un ácido saturado de 15 carbonos y cadena ramificada (a-C_{15:0}).

[†]Los números antes de los dos puntos representan la cantidad de átomos de carbono contenidos en cada uno de los diferentes ácidos grasos; los números después de los dos puntos es la cantidad de enlaces dobles; i- indica una rama metilo (-CH₃) en el átomo de carbono iso (próximo al último); a- indica una rama metilo en el átomo de carbono anteiso (segundo desde el último).

Adaptado de la referencia¹⁶².

dad de la prueba IFI es del 75-80% y la especificidad es del 106%.^{143,157,159} Sin embargo, los médicos deben esperar 2 a 6 semanas para que se produzca una elevación de cuatro veces en el título de anticuerpos en los pacientes. Los reactivos para las pruebas de serodiagnóstico para *Legionella* deben detectar anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA. En algunos pacientes, puede ocurrir una elevación en el título de IgM sin una elevación detectable en los títulos de IgG o IgA o puede ocurrir antes en el curso de la enfermedad que una elevación en el título de IgG.¹⁶⁴ Los anticuerpos IgM pueden persistir hasta durante un año, de modo que su presencia no puede utilizarse para el diagnóstico de infección reciente.

Como lo documentaron Wilkinson y cols., la prueba de IFI en suero utilizando antígenos contra *Legionella* puede dar reacciones cruzadas con el suero de pacientes que tienen otras determinadas infecciones.^{157,159} Los sueros de pacientes que tuvieron infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* asociadas con brotes y pacientes con fiebre Q dan reacciones cruzadas con *L. longbeachae* serogrupo 2 y *L. jordanis*. También, se observaron reacciones cruzadas entre sueros de pacientes que tenían tularemia asociada con brotes (*Francisella tularensis*) y antígeno de *L. jordanis*. Además, se han observado reacciones falsas positivas en pacientes con *Bacteroides fragilis*, *Proteus vulgaris*, especies de *Rickettsia* y especies de *Citrobacter*.⁷² Se pue-

den eliminar algunas reacciones cruzadas mediante absorción de antisueros con *E. coli*, aunque con cierta disminución en el título anti-*Legionella*.¹⁵⁸ Es posible eliminar las reacciones cruzadas con *Campylobacter* mediante la absorción de sueros con esa bacteria.¹⁸

El serodiagnóstico de una infección reciente por *Legionella* requiere seroconversión (aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos) hasta títulos recíprocos de 1:128 o mayores. Los títulos recíprocos elevados únicos de 256 o mayores pueden ser sugestivos durante un brote. Sin embargo, en casos esporádicos, un título de 1:256 o mayor no siempre indica una infección reciente porque estos títulos altos pueden persistir en personas sanas sin ninguna evidencia clínica simultánea de legionelosis. Como cuestión práctica es poco probable que el seguimiento necesario para demostrar seroconversión ocurra en la mayoría de los casos esporádicos.

Diagnóstico molecular

Dada la necesidad de una confirmación de laboratorio del diagnóstico de enfermedad de los legionarios y lo inadecuado de los métodos tradicionales, no es sorprendente que se investigue mucho para lograr un diagnóstico molecular. Hasta este momento ese potencial no se ha cumplido, pero los estudios continúan. Un primer intento por utilizar sondas de DNA para el diagnóstico clínico fue suspendido por problemas con la sensibilidad y la especificidad. Se han utilizado con éxito métodos de amplificación para detectar legionelas en muestras ambientales y el método comercial ha sido satisfactorio en muestras clínicas,¹⁵⁴ pero no ha sido aceptado por la Food and Drug Administration para muestras humanas. Más recientemente, la atención se ha centrado en los ensayos de amplificación en tiempo real (RT-PCR) para su uso en muestras clínicas.^{117,119,73} Estos ensayos aún están en desarrollo, pero parecen promisorios como herramientas para el diagnóstico rápido. Un indicio de que estas pruebas se encuentran en desarrollo es la notificación de que un ensayo comercial de amplificación de uso frecuente para la extracción de DNA no es apropiado para la detección de especies de *Legionella* en muestras clínicas.¹⁴⁷

Estudios de microbiología ambiental

Aislamiento de *Legionella* en muestras ambientales

Se ha observado repetidas veces la presencia creciente de especies de *Legionella* tanto en aguas naturales como artificiales, en ausencia de pacientes con enfermedad clínica, lo que argumenta en contra del cultivo microbiológico sistemático del agua. Por otra parte, se han acumulado muchas pruebas que citan el agua potable como fuente del microorganismo en numerosos pacientes que han tenido una infección por *L. pneumophila*. La provisión de agua caliente de los edificios ha sido implicada a menudo en la legionelosis; sin embargo, se necesitan más estudios sobre la magnitud de la contaminación por *Legionella* en los sistemas de agua potable doméstica y de agua caliente y la frecuencia de la asociación con la infección.⁴² Por ejemplo, se definieron los factores que aumentan la probabilidad de que las especies de *Legionella* colonicen los sistemas de agua domésticos de provisión de agua, pero estos factores no parecían aumentar la incidencia de legionelosis adquirida en la comunidad. La probabilidad de que gran cantidad de personas sanas estén expuestas a menudo a estos microorganismos en la naturaleza, en el hogar, en el lugar de trabajo y en edificios privados y públicos de todo tipo es alta, por lo que es posible que

muchas legionelas aisladas en fuentes naturales de agua y en el agua corriente no sean altamente virulentas, que la exposición al microorganismo sea de poca magnitud o que la mayoría de las personas no sean huéspedes susceptibles; o tal vez todas las alteraciones sean ciertas. Por lo tanto, la enumeración microbiológica de las especies de *Legionella* en el agua potable o de otro tipo (como la de las torres de refrigeración) no tiene ninguna relevancia clínica ni epidemiológica para la enfermedad en los seres humanos a menos que se documenten casos clínicos. Lamentablemente, no existen marcadores de virulencia adecuados para distinguir las cepas ambientales que son "patógenas" de aquellas que es poco probable que lo sean, ni hay pruebas apropiadas que predigan en qué huéspedes humanos se desarrollará la legionelosis o quiénes serán resistentes cuando estén expuestos a *Legionella* en el medioambiente. Más aún, no se puede medir con exactitud el grado ni la extensión de la exposición al microorganismo. Por lo tanto, la vigilancia microbiológica de las aguas ambientales es especialmente difícil de interpretar en ausencia de casos de la enfermedad (e incluso en presencia también de casos documentados). Asimismo, se recomienda la vigilancia clínica y epidemiológica de los pacientes (p. ej., por parte de enfermeras de control de infecciones hospitalarias) como parte de un programa para evitar la legionelosis hospitalaria.

En los brotes de legionelosis intrahospitalaria, la hipercloración del agua hospitalaria hasta un nivel de entre 2 y 6 mg/L de cloro residual libre y la elevación de la temperatura del agua caliente hasta más de 70 °C o una combinación de hipercloración y lavado con calor son métodos cuya eficacia para suprimir el crecimiento de *Legionella* ha sido probada.^{109,132,134} Para lograr el lavado por calor o la erradicación por medios térmicos, se hace circular el agua caliente en todo el sistema de agua del edificio a una temperatura de 70-75 °C. Se lavan con agua caliente todas las cabezas de duchas y los grifos con el objetivo de destruir las *Legionella* en estos sitios. Se han publicado en otros sitios protocolos de hipercloración y erradicación por medios térmicos.^{109,132,134} Lamentablemente, existe el riesgo de sufrir escaldaduras por el agua caliente y se deben tomar las precauciones necesarias para reducir esta posibilidad (p. ej., colocar señales de advertencia, calentar el agua durante períodos relativamente cortos cuando la mayoría de los pacientes están dormidos). (Las reglamentaciones de algunos estados exigen que la temperatura del agua en los hospitales sea inferior a 48,9 °C para evitar la escaldadura de los pacientes). La cloración continua (hasta lograr concentraciones de cloro de 1.5 partes por millón de cloro residual libre) puede ser excesivamente corrosiva y destructiva para algunos sistemas y equipos de plomería; también existe el riesgo de exposición tóxica al trihalometano. Si no se realiza de forma continua tratamiento con calor, cloración o ambos, el tratamiento debe ser recurrente porque la recolonización del agua es altamente probable y tiende a recurrir luego de suspendido el calor o la cloración. Se están investigando otros métodos, como esterilización con luz ultravioleta, ozonización, agregado de agentes amebicidas y de iones metálicos en pequeñas cantidades (p. ej., plata, cobre) como tratamientos alternativos de los sistemas de agua.

Si se documentan casos hospitalarios de infección por *Legionella*, se puede llevar a cabo una investigación microbiológica centrada especialmente en el muestreo ambiental para ayudar a determinar la fuente más probable. Se pueden implementar medidas de control por calor o cloración para eliminar o suprimir el microorganismo y los cultivos ambientales de seguimiento pueden ayudar a determinar la eficacia de estas

medidas. En los hospitales que presentan un brote o un problema hiperendémico de *Legionella*, se debe considerar la vigilancia microbiológica periódica del ambiente, combinada con medidas de control continuas o repetidas, a menos que se pueda mostrar que no han ocurrido casos de legionelosis.

Se recomiendan los métodos señalados en el protocolo de Barbaree y cols.⁹ para las personas que desean aislar e identificar especies de *Legionella* en el agua ambiental. En este protocolo, se recogen muestras de agua (1 a 2 L) y se concentran utilizando filtros de policarbonato de 0.2 µm (tamaño de los poros). Se realizan recuentos viables con tratamiento ácido previo en BCYEα o sin él y el medio que contiene base de BCYEα con suplemento de glicina, polimixina B, vancomicina y anisomicina.

Tipificación de cepas de *Legionella*

Debido a la amplia distribución de *L. pneumophila* serogrupo 1 en el medioambiente, el seroagrupamiento con los reactivos de IFD descritos antes ha tenido sólo utilidad epidemiológica limitada en la investigación de la fuente de diferentes cepas. Algunos investigadores han creado métodos para tipificar o subagrupar cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1. Se han investigado los análisis de subtipos dentro de *L. pneumophila* serogrupo 1 utilizando paneles de anticuerpos monoclonales,^{84,83} análisis estructural genético de *L. pneumophila* utilizando técnica de electroforesis enzimática multilocus^{47 130} y determinación del contenido de plásmidos¹¹⁴ de diferentes cepas de distintas fuentes. Las técnicas más recientes incluyen electroforesis de proteínas de la membrana externa de *L. pneumophila*¹³⁸ y un método de tipificación basado en el uso de sondas de DNA biotiniladas clonadas para el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).¹²⁸ Uno de los métodos de tipificación más promisorios es la determinación de perfiles de DNA polimorfo amplificado aleatorio de *Legionella pneumophila* mediante PCR; este método parece ser más rápido y menos costoso que la tipificación mediante RFLP. Se ha comunicado que la determinación de perfiles de DNA polimorfo amplificado aleatorio es más discriminatoria que la tipificación mediante RFLP de algunas cepas de *Legionella* y puede detectar diferencias entre ellas con diferentes tipos de RFLP.¹²⁷ La investigación de una epidemia o el análisis de casos aparentemente no relacionados puede reforzarse mediante la comparación del patrón molecular de las cepas aisladas de pacientes y del medioambiente. Aunque la secuenciación directa del ácido nucleico de las muestras puede ser factible para estudios epidemiológicos, se necesitan cepas aisladas, lo que destaca nuevamente la importancia del cultivo para el diagnóstico de estas infecciones. Es importante recordar que la demostración de cepas "idénticas" de los pacientes y de un sitio ambiental significa que el sitio ambiental está "en discusión" como fuente de la infección, pero no prueba la asociación. Es esencial un análisis epidemiológico cuidadoso y la consideración de todas las posibilidades. Lamentablemente, es posible que nadie aprecie algunas de estas posibles fuentes. Un ejemplo clásico de este fenómeno fue el reconocimiento de que el agua potable era la fuente de infecciones en el Veterans Affairs Hospital después de que se probó la falacia de las presunciones iniciales de que lo eran las torres de refrigeración.

En general, la caracterización de los ácidos nucleicos es más discriminatoria que el análisis de la estructura antigénica utilizando anticuerpos monoclonales. Es interesante señalar que los tipos antigénicos y las variantes genómicas no siempre concuerdan.²⁹ La prueba final para cualquier técnica de tipificación

Cuadro 10-5 Correlación de los patrones de anticuerpos monoclonales con el análisis epidemiológico

PATRÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	CEPAS CLÍNICAS	CEPAS AMBIENTALES
A	Casos epidémicos	Torres de refrigeración
B	Casos intrahospitalarios esporádicos	Agua potable del hospital
C	Caso comunitario esporádico	—

Adaptado de la referencia⁶².

es discriminar las cepas en grupo con sentido epidemiológico. Los patrones deben mostrar suficientes diferencias como para separar las cepas en grupos relacionados, pero no tantas como para discriminar grupos absurdos de cepas. Por una parte, cepas aparentemente similares podrían parecer diferentes si se utilizara otra herramienta de tipificación. Por otra, puede ser necesario un acuerdo de consenso para decidir cuántas y qué tipo de diferencias definen realmente las diferencias del mundo real con una técnica particular. Siempre que sea posible es óptimo analizar las cepas con más de una técnica.

En el mejor de los casos, el análisis molecular o antigénico puede racionalizar un problema epidémico o endémico. El análisis de un grupo de cepas clínicas y ambientales de un lugar en un período de años produjo tres agrupamientos de cepas, como se resume en el cuadro 10-5. Estas cepas fueron caracterizadas con un panel de anticuerpos monoclonales, reactivos relativamente no discriminatorios. Un grupo de investigadores europeos ha utilizado con éxito el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados.⁶⁶ Se han definido y validado los tipos de polimorfismo de *L. pneumophila* serogrupo 1 mediante pruebas de eficacia.⁶⁵ Los autores de un estudio reciente de ribotipificación automatizada, utilizando cepas de referencia, arribaron a la conclusión de que el procedimiento era útil para el análisis genómico, pero no lo suficientemente discriminatorio para utilizarlo para el análisis epidémico. Sin duda se requieren más investigaciones en esta tan importante área.

REFERENCIAS

1. Addiss DG, et al. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. Am J Epidemiol 1989;130:557-568.

2. Adeleke AA, et al. *Legionella drozanskii* sp. nov. *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1151-1160.

3. Alary M, Joly JR. Factor contributing to the contamination of hospital water distribution systems by legionellae. J Infect Dis 1992;165:565-569.

4. Ampel NM, et al. Cutaneous abscess caused by *Legionella micdadei* in an immunosuppressed patient. Ann Intern Med 1985;102:630-632.

5. Anaissie EJ, et al. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. Arch Intern Med 2002;162:1483-1492.

6. Anonymous. Epidemiology, prevention and control of legionellosis: memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1990;68:155-164.

7. Arnow PM, et al. Perirectal abscess caused by *Legionella pneumophila* and mixed anaerobic bacteria. Ann Intern Med 1983;98:184-185.

8. Arnow PM, et al. Nosocomial Legionnaires' disease caused by aerosolized tap water from respiratory devices. J Infect Dis 1982;146:460-467.

9. Barharee JM, et al. Protocol for sampling environmental sites for legionellae. Appl Environ Microbiol 1987;53:1454-1458.

10. Basetti S, Widmer AF. *Legionella* resources on the world wide web. Clin Infect Dis 2002;34:1633-1640.

11. Benin AL, et al. An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. J Infect Dis 2002;185:237-243.

12. Benu JS, et al. Acid-fast-positive *Legionella pneumophila*: a possible pitfall in the cytologic diagnosis of mycobacterial infection in pulmonary specimens. Diagn Cytopathol 2000;22:45-48.

13. Bhopal RS. A framework for investigating geographical variation in diseases based on a study of Legionnaires' disease. J Public Health Med 1991;13:281-289.

14. Bhopal RS, et al. Pinpointing clusters of apparently sporadic cases of Legionnaires' disease. BMJ 1992;304:1022-1027.

15. Blatt SP, et al. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. Am J Med 1993;95:16-22.

16. Bochud PY, et al. Community-acquired pneumonia: a prospective outpatient study. Medicine (Baltimore) 2001;80:75-87.

17. Bornstein N, et al. Exposure to *Legionellaceae* at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. Epidemiol Infect 1989;102:31-36.

18. Boswell TC, Kudesia G. Serological cross-reaction between *Legionella pneumophila* and campylobacter in the indirect fluorescent antibody test. Epidemiol Infect 1992;109:291-295.

19. Breiman RF, et al. Association of shower use with Legionnaires' disease: possible role of amoebae. JAMA 1990;263:2924-2926.

20. Brenner DJ, et al. Classification of the legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. Ann Intern Med 1979;90:656-658.

21. Bridge JA, Edelstein PH. Oropharyngeal colonization with *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1983;18:1108-1112.

22. Broome CV. Epidemiologic assessment of methods of transmission of legionellosis. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1983;255:52-57.

23. Broome CV, Fraser DW. Epidemiologic aspects of legionellosis. Epidemiol Rev 1979;1:1-16.

24. Buesching WJ, et al. Enhanced primary isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens by low-pH treatment. J Clin Microbiol 1983;17:1153-1155.

25. Castellani PM, et al. Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications. Clin Infect Dis 1999;28:33-38.

26. Chastre J, et al. Pulmonary fibrosis following pneumonia due to acute Legionnaires' disease: clinical ultrastructural and immunofluorescent study. Chest 1987;91:57-62.

27. Cherry WB, et al. Detection of *Legionnaires* disease bacteria by direct immunofluorescent staining. J Clin Microbiol 1978;8:329-338.

28. Codony F, et al. Factors promoting colonization by legionellae in residential water distribution systems: an environmental case-control survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:717-721.

29. Cordevan C, et al. Characterization of members of the legionellaceae family by automated ribotyping. J Clin Microbiol 2003;41:34-43.

30. Den Boer JW, et al. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. Emerg Infect Dis 2002;8:37-43.

31. Dondero TJ, Jr., et al. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. N Engl J Med 1980;302:365-370.

32. Dorman SA, et al. Pyelonephritis associated with *Legionella pneumophila*, serogroup 4. Ann Intern Med 1980;93:835-837.

33. Dowling JN, et al. Infections caused by *Legionella micdadei* and *Legionella pneumophila* among renal transplant recipients. J Infect Dis 1984;149:703-713.

34. Drozanski W. *Sarcobium lyticum* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small, free-living amoebae. Int J Syst Bacteriol 1991;41:82-87.

35. Dumoff M. Direct in-vitro isolation of the legionnaires' disease bacterium in two fatal cases: cultural and staining characteristics. Ann Intern Med 1979;90:694-696.

36. Edelstein PH. Legionnaires' disease. Arthritis Rheum 1979;22:806-806.

37. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol 1981;14:298-303.

38. Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. J Clin Microbiol 1982;16:697-699.

39. Edelstein PH. Laboratory diagnosis of infections caused by legionellae. Eur J Clin Microbiol 1987;6:4-10.

40. Edelstein PH. The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Semin Respir Infect 1987;2:235-241.

41. Edelstein PH. Legionnaires' disease. Clin Infect Dis 1993;16:741-747.

42. Edelstein PH. Legionnaires' disease. N Engl J Med 1998;338:200-201.

43. Edelstein PH, et al. Clinical utility of a monoclonal direct fluorescent reagent specific for *Legionella pneumophila*: comparative study with other reagents. J Clin Microbiol 1985;22:419-421.

44. Edelstein PH, et al. Retrospective study of Gen-Probe rapid diagnostic system for detection of legionellae in frozen clinical respiratory tract samples. J Clin Microbiol 1987;25:1022-1026.

45. Edelstein PH, et al. Isolation of *Legionella pneumophila* from blood. Lancet 1979;1:750-751.

46. Edelstein PH, et al. Laboratory diagnosis of Legionnaires disease. Am Rev Respir Dis 1980;121:317-327.

47. Edelstein PH, et al. Paleoepidemiologic investigation of legionnaires' disease at Wadsworth Veterans Administration Hospital by using three typing methods for comparison of legionellae from clinical and environmental sources. J Clin Microbiol 1986;23:1121-1126.

48. Edelstein PH, et al. Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. *J Clin Microbiol* 1982;16:1061-1065.
49. Engleberg NC. Genetic studies of *Legionella* pathogenesis. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP (eds): *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives* Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1993;63-68.
50. Ezzeddine H, et al. *Legionella* spp. in a hospital hot water system: effect of control measures. *J Hosp Infect* 1989;13:121-131.
51. Fairbank JT, et al. Legionnaires' disease. *J Thorac Imaging* 1991;6:6-13.
52. Fallon RJ, Rowbotham TJ. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol* 1990;43:479-483.
53. Fang GD, et al. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy: a prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* 1990;69:307-316.
54. Fang GD, et al. Disease due to the *Legionellaceae* (other than *Legionella pneumophila*): historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:116-132.
55. Feeley JC, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1979;10:437-441.
56. Fenstersheib MD, et al. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *Lancet* 1990;336:35-37.
57. Fields BS. *Legionella* and protozoa: Interaction of a pathogen and its natural host. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP (eds): *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives* Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1993; 129-136.
58. Fields BS, et al. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-526.
59. Fields BS, et al. Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. *J Infect Dis* 1993;167:1146-1150.
60. Fields BS, et al. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis* 2001;184:1289-1292.
61. Fliermans CB, et al. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:9-16.
62. Fraser DW, McDade JE. Legionellosis. *Sci Am* 1979;241:82-99.
63. Fraser DW, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977;297:1189-1197.
64. Friedman H, et al. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:273-279.
65. Fry NK, et al. Designation of the European Working Group on *Legionella* infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:722-728.
66. Fry NK, et al. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:773-780.
67. Garbe PL, et al. Nosocomial Legionnaires' disease: epidemiologic demonstration of cooling towers as a source. *JAMA* 1985;254:521-524.
68. Giroud JC, et al. Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis: the result of a common-source exposure to *Legionella pneumophila*. *Arch Intern Med* 1982;142: 545-547.
69. Click TH, et al. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 1978;107:149-160.
70. Goetz AM, et al. Nosocomial legionnaires' disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *Am J Infect Control* 1998;26:8-11.
71. Goldberg DJ, et al. Lochgailhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*. *Lancet* 1989;1:316-318.
72. Gray JJ, et al. Serological cross-reaction between *Legionella pneumophila* and *Citrobacter freundii* in indirect immunofluorescence and rapid microagglutination tests. *J Clin Microbiol* 1991;29:200-201.
73. Hayden RT, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2618-2626.
74. Heah CH, et al. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:286-290.
75. Helms CM, et al. Prethibial rash in *Legionella pneumophila* pneumonia. *JAMA* 1981;245:1758-1759.
76. Hladky WG, et al. Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *Am J Epidemiol* 1993;138:555-562.
77. Hoffman PS, et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:784-791.
78. Hookey JV, et al. Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:526-531.
79. Horwitz MA. Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating *Legionella pneumophila* pathogenesis. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP (eds): *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives* Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1993;55-62.
80. Jernigan DB, et al. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet* 1996;347:494-499.
81. Johnson JD, et al. Neurologic manifestations of Legionnaires' disease. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:303-310.
82. Joly JR, et al. Legionnaires' disease caused by *Legionella dumoffii* in distilled water. *Can Med Assoc J* 1986;135:1274-1277.
83. Joly JR, et al. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1986;23: 768-771.
84. Joly JR, Winn WR. Correlation of subtypes of *Legionella pneumophila* defined by monoclonal antibodies with epidemiological classification of cases and environmental sources. *J Infect Dis* 1984;150:667-671.
85. Joseph C, et al. An international investigation of an outbreak of Legionnaires disease among UK and French tourists. *Eur J Epidemiol* 1996;12:215-219.
86. Kalweit WH, et al. Hemodialysis shunt infections caused by *Legionella pneumophila*. *Ann Intern Med* 1982;96:173-175.
87. King CH, et al. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:3023-3033.
88. Kirby BD, et al. Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1980;59:188-205.
89. Knirsch CA, et al. An outbreak of *Legionella micdadei* pneumonia in transplant patients: evaluation, molecular epidemiology, and control. *Am J Med* 2000;108: 290-295.
90. Kohler RB, et al. Cross-reactive urinary antigens among patients infected with *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 4 and the Leiden 1 strain. *J Infect Dis* 1985;152:1007-1012.
91. Kohler RB, et al. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 1984;20:605-607.
92. Kohler RB, et al. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. *Ann Intern Med* 1981;94:601-605.
93. Korvick JA, Yu VL. Legionnaires' disease: an emerging surgical problem. *Ann Thorac Surg* 1987;43:341-347.
94. Lee TC, et al. Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems. *Arch Environ Health* 1988;43:53-62.
95. Lowry PW, et al. A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *N Engl J Med* 1991;324:109-113.
96. Luck PC, et al. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol* 1998;36:1160-1163.
97. Mahoney FJ, et al. Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. *J Infect Dis* 1992;165:736-739.
98. Mame TJ. Diagnosis of *Legionellaceae* as a cause of community-acquired pneumonia: "...continue to treat first and not bother to ask questions later"—not a good idea. *Am J Med* 2001;110:73-75.
99. Matrie TJ, et al. Colonisation of the respiratory tract with *Legionella pneumophila* for 63 days before the onset of pneumonia. *J Infect* 1992;24:11-86.
100. Marrie TJ, et al. Control of endemic nosocomial legionnaires' disease by using sterile potable water for high risk patient. *Epidemiol Infect* 1991;107:591-605.
101. Mastro TD, et al. Nosocomial Legionnaires' disease and use of medication nebulizers. *J Infect Dis* 1991;163:667-671.
102. Mayock R, et al. *Legionella pneumophila* pericarditis proved by culture of pericardial fluid. *Am J Med* 1983;75:534-536.
103. McCabe RE, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Legionella pneumophila*. *Ann Intern Med* 1984;100:525-527.
104. McDade JE, et al. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 1977;297:1197-1202.
105. Morris GK, et al. Isolation of the legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Ann Intern Med* 1979;90:664-666.
106. Muder RR, et al. Pneumonia caused by Pittsburgh pneumonia agent: radiologic manifestations. *Radiology* 1984;150:633-637.
107. Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis* 2002;35:990-998.
108. Muder RR, et al. Mode of transmission of *Legionella pneumophila*: a critical review. *Arch Intern Med* 1986;146:1607-1612.
109. Muraca PW, et al. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*: a review of application procedures and methodologies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990;11:79-88.
110. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003;16:64-69.
111. Myerowitz RL, et al. Opportunistic lung infection due to "Pittsburgh Pneumonia Agent." *N Engl J Med* 1979;301:953-958.
112. Nagai T, et al. Neonatal sudden death due to *Legionella* pneumonia associated with water birth in a domestic spa bath. *J Clin Microbiol* 2003;41:227-229.
113. Newsome AL, et al. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1985;50:449-452.
114. Nolte FS, et al. Plasmids as epidemiological markers in nosocomial Legionnaires' disease. *J Infect Dis* 1984;149:251-256.
115. Ortiz Roque CM, Hazen TC. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:2231-2236.
116. Palel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipient. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:86-124.
117. Raggam RB, et al. Qualitative detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002;191:119-125.
118. Reingold AL, et al. Legionella pneumonia in the United States: the distribution of serogroup and species causing human illness. *J Infect Dis* 1984;149:819-819.
119. Reischl U, et al. Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40:3814-3817.

120. Riffard S, et al. Occurrence of *Legionella* in groundwater: and ecological study. *Water Sci Technol* 2001;43:99-102.
121. Rihs JD, et al. Isolation of *Legionella pneumophila* from blood with the BAC-TEC system: a prospective study yielding positive results. *J Clin Microbiol* 1985;33:422-424.
122. Roig J, et al. Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumonias. *Chest* 1991;99:344-350.
123. Romini F, et al. Febrile illness in successive cohort of tourists at a hotel on the Italian Adriatic coast: evidence for a persistent locus of *Legionella* infection. *Am J Epidemiol* 1984;119:124-134.
124. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980;33:1179-1183.
125. Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other itiolates with amoebae. *J Clin Pathol* 1983;36:978-986.
126. Ruf B, et al. Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumoniae*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J Infect Dis* 1990;162:1341-1348.
127. Sandery M, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiling of *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* 1994;19:184-187.
128. Saunderson NA, et al. A method for typing strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *J Med Microbiol* 1990;31:45-55.
129. Sax H, et al. Legionnaires' disease in a renal transplant recipient: nosocomial or home-grown? *Transplantation* 2002;74:890-892.
130. Selander KK, et al. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 1985;163:1021-1037.
131. Shands KN, et al. Potable water as a source of Legionnaires' disease. *JAMA* 1985;253:1412-1416.
132. Snyder MB, et al. Reduction in *Legionella pneumophila* through heart flushing followed by continuous supplemental chlorination of hospital hot water. *J Infect Dis* 1990;162:127-132.
133. Sopana N, et al. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:845-848.
134. Slates SJ, et al. Chlorine, pH, and control of *Legionella* in hospital plumbing systems. *JAMA* 1989;261:1882-1883.
135. Slates SJ, et al. Survival and multiplication of *Legionella pneumophila* in municipal drinking water systems. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:979-986.
136. Steele TW, et al. Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:49-53.
137. Steele TW, et al. Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:2984-2988.
138. Stout JE, et al. Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* 1988;157:486-495.
139. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. *N Engl J Med* 1997;337:682-687.
140. Stout JE, et al. Potable water as a cause of sporadic cases of community acquired legionnaires' disease. *N Engl J Med* 1992;326:151-155.
141. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:567-613.
142. Tan MJ, et al. The radiologic manifestations of Legionnaire's disease: the Ohio Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Chest* 2000;117:398-403.
143. Thacker WL, et al. Comparison of slide agglutination test and direct immunofluorescence assay for identification of *Legionella* isolates. *J Clin Microbiol* 1983;18:1113-1118.
144. Thornsberry C, et al. In vitro activity of antimicrobial agents on Legionnaires disease bacterium. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;13:78-80.
145. Tompkins LS, et al. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. *N Engl J Med* 1988;318:530-535.
146. Tsai TF, et al. Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med* 1979;90:509-517.
147. Van Der ZA, et al. Qiagen DNA extraction kit for sample preparation for legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* 2002;40:1126.
148. Van Orden AE, Greer PW. Modification of the Dieterle approach stain. *Histotechnology* 1977;1:51-53.
149. Vickers RM, et al. Failure of a diagnostic monoclonal immunofluorescent reagent to detect *Legionella pneumophila* in environmental samples. *J Appl Environ Microbiol* 1990;56:2912-2914.
150. Wadowsky RM, et al. Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2677-2682.
151. Wadowsky RM, et al. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:1197-1205.
152. Wadowsky RM, et al. Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:1104-1110.
153. Waterer CW, et al. *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med* 2001;110:41-48.
154. Weir SC, et al. Detection of *Legionella* by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit. *Am J Clin Pathol* 1998;110:295-300.
155. White HJ, et al. Extrapulmonary histopathologic manifestations of Legionnaires' disease: evidence for myocarditis and bacteremia. *Arch Pathol Lab Med* 1980;104:287-289.
156. Wilkinson HW. Hospital-Laboratory Diagnosis of *Legionella* Infections 2nd ed. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, 1988.
157. Wilkinson HW, et al. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *J Clin Microbiol* 1981;13:139-146.
158. Wilkinon HW, et al. Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. *J Clin Microbiol* 1979;10:685-689.
159. Wilkinson HW, et al. Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of *Legionellaceae* and *Legionella*-like organisms by indirect immunofluorescence assay. *J Infect Dis* 1983;147:23-31.
160. Winn WC, Jr. Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:60-81.
161. Winn WC, Jr. Mycrowsitz RL. The pathology of the *Legionella* pneumonias: a review of 74 cases and the literature. *Hum Pathol* 1981;12:401-422.
162. Winn WC, Jr. *Legionella*. In Garrity CM (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2005.
163. Yu VL, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002;186:127-128.
164. Zimmerman SE, et al. Immunoglobulin M antibody titers in the diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 1982;16:1007-1011.
165. Zuravleff JJ, et al. Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. *JAMA* 1983;250:1981-1985.

Especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*

Taxonomía de la familia *Neisseriaceae* y de la familia *Moraxellaceae*

Características generales del género *Neisseria*

Importancia clínica de las especies de *Neisseria*

Neisseria gonorrhoeae

Epidemiología

Infecciones causadas por *N. gonorrhoeae*

Neisseria meningitidis

Epidemiología

Infecciones causadas por *N. meningitidis*

Profilaxis meningocócica y vacunas
meningocócicas

Otras especies de *Neisseria*

Importancia clínica de *Moraxella catarrhalis*

Aislamiento de especies de *Neisseria*

Neisseria gonorrhoeae

Frotis directos teñido con Gram

Recolección de la muestra

Transporte de la muestra

Medios de cultivo selectivos: inoculación
e incubación

Neisseria meningitidis

Seguridad en el laboratorio

Frotis directos teñidos con Gram y pruebas
directas para antígenos capsulares

Recolección y transporte de la muestra

Aislamiento e incubación

Identificación de especies de *Neisseria*

Morfología de las colonias

Tinción de Gram y prueba
de la oxidasa

Prueba de Superoxol®

Diferenciación de otros
microorganismos
en medios selectivos

Criterios presuntivos para
la identificación de *N. gonorrhoeae*

Pruebas de identificación
para especies de *Neisseria*

Pruebas para la utilización
de hidratos de carbono

Medio CTA convencional con hidratos
de carbono

Prueba rápida de utilización de hidratos
de carbono

Prueba RIM-*Neisseria*® (método rápido
de identificación de *Neisseria*)

Otros métodos de utilización de hidratos
de carbono

Pruebas cromogénicas
de enzima sustrato

Gonochek II®

BactiCard *Neisseria*®

Métodos inmunológicos para
la confirmación del cultivo
de *N. gonorrhoeae*

Inmunofluorescencia directa
con anticuerpos monoclonales

Pruebas de coaglutinación

Prueba GonoGen II®

Sistemas de identificación
multipruebas

Prueba de sondas de DNA para la confirmación del cultivo de *N. gonorrhoeae*

Pruebas de amplificación e hibridación de ácidos nucleicos para *N. gonorrhoeae*

Métodos moleculares para la detección de *N. meningitidis*

Características del cultivo de las especies de *Neisseria*

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria meningitidis

Otras especies de *Neisseria*

Neisseria lactamica

Neisseria cinerea

Neisseria flavescens

Neisseria subflava biovariedades, *Neisseria mucosa* y *Neisseria sicca*

Neisseria polysaccharea

Subespecies de *Neisseria elongata*

Neisseria gonorrhoeae subespecie *kochii* ("*Neisseria kochii*")

Especies de *Neisseria* no humanas y atípicas

Características del cultivo e identificación de *Moraxella catarrhalis*

Sensibilidad de las especies de *Neisseria* a los antibióticos

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria meningitidis

Sensibilidad a los antibióticos de *Moraxella catarrhalis*

La gonorrea fue reconocida ya en tiempos de Galeno (siglo II a.C.), quien la denominó con las palabras griegas *gonor* ("semen") y *rhoia* ("flujo"), para sugerir que la enfermedad estaba relacionada con el flujo de semen. También se encontraron referencias a esta infección en el Antiguo Testamento y en historias escritas de varias culturas. Aunque bien reconocida como una enfermedad de transmisión sexual en el siglo XIII, la gonorrea no se distinguió de la sífilis hasta mediados del siglo XIX. En 1897, Albert Neisser, de la Universidad de Breslau, Alemania, observó por primera vez *Neisseria gonorrhoeae*, el agente etiológico de la gonorrea, en exudados purulentos del aparato genital y de la conjuntiva. El aislamiento posterior del microorganismo, la inoculación en voluntarios humanos y su reaislamiento por Bumm en 1885 permitieron establecer la relación causal entre el microorganismo y la enfermedad (véanse los postulados de Koch, cap. 5).

La meningitis cefalorraquídea epidémica fue conocida a principios del siglo XIX, pero el agente causal no se describió hasta 1884, cuando Marchiofava y Celli lo observaron en exudados meníngeos. En 1887, Weichselbaum aisló el microorganismo, ahora llamado *Neisseria meningitidis*, en un cultivo puro y describió por primera vez sus características y su papel etiológico en seis pacientes con meningitis aguda. Otros trabajos realizados por Kiefer en 1896 y por Albretch en 1901 establecieron la existencia del estado portador meningocócico en individuos sanos.⁹⁷

Durante el período transcurrido desde 1929 hasta fines de 1943, grandes brotes de enfermedad meningocócica en Chile y ciudades de los Estados Unidos (p. ej., Detroit y Milwaukee) concentraron la atención científica en este microorganismo. Con los brotes ulteriores entre los reclutas militares en los Estados Unidos y otros países se comenzó a adquirir un mejor conocimiento de la epidemiología, la patogenia, la quimioprofilaxis, y las perspectivas para el desarrollo de vacunas.⁶⁸⁰ A finales de 1930, se encontró que las sulfonamidas servían para erradicar el estado de portador meningocócico, lo que proporcionó una forma de evitar la diseminación de la enfermedad.

Durante principios de la década de 1960, comenzó a aparecer resistencia de los meningococos a las sulfonamidas, junto con la enfermedad epidémica en dos instalaciones militares en California. Estos brotes estimularon la creación de vacunas de polisacáridos eficaces contra meningococos de los serogrupos A y C. En la actualidad, la meningitis epidémica de *N. meningitidis* serogrupo A se presenta como un problema serio en regiones de África y la enfermedad meningocócica todavía se observa en poblaciones militares semicerradas.^{27,427,611} Recientemente, han ocurrido epidemias de enfermedad meningocócica en Noruega, Canadá, y en los países de la ex Unión Soviética, y han surgido en Arabia Saudita enfermedades asociadas con el serogrupo W-135 de *N. meningitidis*.^{215,513,606} Tanto en los Estados Unidos como en Europa, la enfermedad meningocócica por el serogrupo C ha aumentado en la comunidad y en las universidades y colegios, lo que se tradujo en un incremento importante de su incidencia en adolescentes y adultos jóvenes.^{222,287,290,535} Las técnicas moleculares han permitido a los investigadores analizar los factores de virulencia meningocócicos y entender la "epidemiología molecular" de los serogrupos, serotipos y subserotipos, meningocócicos y la virulencia clonal.^{427,513,535,611}

N. gonorrhoeae y *N. meningitidis* continúan siendo patógenos temibles y versátiles que constituyen una preocupación tanto para los médicos como para los profesionales del laboratorio clínico. Aunque los métodos para el aislamiento y la identificación de las especies de *Neisseria* a partir de muestras clínicas no han cambiado demasiado, las técnicas nuevas para la detección directa de *N. gonorrhoeae* basadas en la amplificación de ácidos nucleicos y en sondas de ácidos nucleicos han modificado bastante el acceso del laboratorio al diagnóstico de enfermedad gonocócica. La resistencia a los agentes antimicrobianos continúa siendo una preocupación importante en el nuevo milenio, en particular con la aparición de gonococos resistentes a las fluoroquinolonas en todo el mundo.³⁵⁴ *N. meningitidis* ha cobrado mayor importancia en estos años con la autorización de vacunas contra otros agentes causantes de

meningitis (p. ej., *Haemophilus influenzae* tipo b). El reconocimiento, el tratamiento y el manejo de la enfermedad meningocócica en una comunidad requieren la cooperación de médicos, profesionales de laboratorio clínico y epidemiólogos para concertar las intervenciones más convenientes. Al igual que los gonococos, las cepas raras de *N. meningitidis* han adquirido información genética para producir β -lactamasa, mientras que otras han desarrollado “sensibilidad disminuida” a algunos β -lactámicos debido a la adquisición de proteínas de unión a la penicilina alteradas.^{189,482} A veces, la recuperación de especies de *Neisseria* recién reconocidas y “no patógenas” de pacientes inmunodeprimidos también debe ser considerada por los microbiólogos para acceder a la detección e identificación de especies de *Neisseria* y bacterias “tipo neisseria” en muestras clínicas.

Taxonomía de la familia *Neisseriaceae* y de la familia *Moraxellaceae*

En la edición de 1984 del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, la familia *Neisseriaceae* incluía cuatro géneros: *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* y *Acinetobacter*.⁸⁷ En ese momento, el género *Neisseria* consistía en 11 especies consideradas “neisseriae verdaderas” y tres especies animales, llamadas en grupo “neisseriae falsas” (*N. caviae*, *N. ovis* y *N. cuniculi*), consideradas *species incertae sedis*.⁶⁹¹ El género *Moraxella* fue subdividido en dos subgéneros: el subgénero *Moraxella* y el subgénero *Branhamella*.⁸⁶ En el género *Moraxella* subgénero *Moraxella* se ubicaron seis especies: *M. (M.) lacunata*, *M. (M.) bovis*, *M. (M.) nonliquefaciens*, *M. (M.) atlantae*, *M. (M.) phenylpyruvica* y *M. (M.) osloensis*, y en el subgénero *Branhamella* se colocaron cuatro especies: *M. (B.) catarrhalis*, *M. (B.) caviae*, *M. (B.) ovis* y *M. (B.) cuniculi*.^{86,87} “*Moraxella urethralis*” fue considerado un microorganismo de filiación incierta. La familia también incluyó tres especies de *Kingella* (*K. kingae*, *K. denitrificans* y *K. indologenes*) y grupos fenotípicos *Acinetobacter*.⁸⁷ *Psychrobacter immobilis* fue agregado a la familia *Neisseriaceae* en 1986.³³⁴

En 1988, usando varias técnicas moleculares nuevas para la taxonomía bacteriana, Stackebrandt y cols. describieron *Proteobacteria* y sus subgrupos RNA filogenéticos.⁶¹⁷ La aplicación de técnicas moleculares (p. ej., hibridación de [rRNA] RNA DNA-ribosómico, hibridación de DNA-DNA, análisis de secuencia 16S rRNA) condujo a varios cambios en la taxono-

mía de la familia *Neisseriaceae*.^{186,554} Las “neisseriae verdaderas”, especies de *Kingella* y “*Moraxella urethralis*” fueron asignadas al β -subgrupo de *Proteobacteria* y se recomendó la eliminación de *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Branhamella* y las falsas neisserias de la familia *Neisseriaceae*. A continuación, “*M. urethralis*” fue reclasificada como *Oligella urethralis*, la variedad tipo del género *Oligella*.⁵⁵³ Otro trabajo genético también estableció que los géneros *Eikenella*, *Simonsiella* y *Alysiella* y los grupos EF-4A, EF-4B, M-5 y M-6 de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) pertenecen asimismo a la enmendada familia *Neisseriaceae*.³³⁴ Los grupos M-5 y M-6 de los CDC, considerados en principio especies “de tipo moraxella” han sido reclasificados como *N. weaveri* y *N. elongata* subespecie *nitroreducens*, respectivamente.^{25,268,299} El género *Kingella* permanece en la familia *Neisseriaceae* e *K. indologenes* pertenece ahora al género *Suttonella* en la familia *Cardiobacteriaceae* como *Suttonella indologenes* (véase cap. 9). *Psychrobacter immobilis* también fue excluida de la familia *Neisseriaceae* por el trabajo de Rossau y cols.⁵⁵⁴ En la próxima edición del *Manual de Bergey*, la *Neisseriaceae* es la única familia en el orden propuesto “Neisseriales” dentro del β -subgrupo de *Proteobacteria*, junto con *Eikenella*, *Kingella* y varios otros géneros de origen animal y ambientales.²⁴⁸

El estado taxonómico de *M. (B.) catarrhalis*, la otra especie *Moraxella* y la neisseria falsa han sido objeto de debate y desacuerdo entre los microbiólogos y los taxonomistas durante años.⁸⁸ En 1991, Rossau y cols. delinearon un grupo rRNA familiar nuevo dentro del γ -subgrupo de *Proteobacteria*.⁵⁵⁵ Este grupo contenía el grupo *Moraxella-Psychrobacter* y el género *Acinetobacter*. El primer grupo fue dividido en el “subgrupo *Moraxella lacunata*” (que contiene las moraxelas clásicas: *M. lacunata* subespecies *lacunata*, *M. lacunata* subespecies *liquefaciens*, *M. boris*, *M. liquefaciens*, las neisserias falsas y *M. catarrhalis*), el “subgrupo *Moraxella osloensis*”, el “subgrupo *Moraxella atlantae*” y el “subgrupo *Psychrobacter-Moraxella phenylpyruvica*”. Estos investigadores propusieron una familia –*Moraxellaceae*– nueva para este grupo rRNA.⁵⁵⁵ El mismo año, Catlin propuso la familia *Branhamaceae* para incluir el género *Branhamella* y el género *Moraxella*.¹²⁵ Este género *Branhamella* propuesto abarcaba *B. catarrhalis* y las neisserias falsas, mientras que el género *Moraxella* incluía todas las especies de *Moraxella* (*M. boris*, *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens*) y especies tipo moraxella (*M. osloensis*, *M. phenylpyruvica* y *M. atlantae*). El género *Acinetobacter* no fue incorporado en la propuesta de Catlin. (Véase recuadro 11-1).

Recuadro 11-1 Clasificación de especies dentro de la familia *Neisseriaceae* y la familia *Moraxellaceae* en el dominio Bacteria^{236,487}

Clase	Orden	Familia	Género	Especies
β -proteobacteria	“Neisseriales”	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> biovariedades, <i>N. mucosa</i> , <i>N. flavescens</i> , <i>N. cinerea</i> , <i>N. polysacchara</i> , <i>N. elongata</i> subespecies, <i>N. weaveri</i> , <i>N. canis</i> , <i>N. macacae</i> , <i>N. denitrificans</i> , <i>N. iguanae</i> , <i>N. dentium</i>
γ -proteobacteria	“Pseudomonadales”	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella</i>	Grupo I– Cuatro grupos: “Grupo <i>M. lacunata</i> ”: subespecies <i>M. lacunata</i> ; “Grupo <i>M. nonliquefaciens</i> ”: <i>M. nonliquefaciens</i> ; “Grupo <i>M. bovis</i> ”: <i>M. bovis</i> , <i>M. ovis</i> ; “Grupo <i>M. catarrhalis</i> ”: <i>M. catarrhalis</i> , <i>M. cuniculi</i> , <i>M. caviae</i> Grupo II– <i>M. osloensis</i> , <i>M. atlantae</i> Grupo III– <i>M. phenylpyruvica</i>

La propuesta de la familia *Moraxellaceae* ha sido respaldada con la aplicación del análisis de secuencias del rDNA 16S.⁵⁰³ Estos datos indican que los miembros de la familia *Moraxellaceae* constituyen un taxón monofilético que forma una línea distinta de descendencia dentro del γ -subgrupo del *Proteobacteria*. El género *Moraxella* se compone de cuatro grupos designados de I hasta IV. Los grupos de II hasta IV incluyen *M. osloensis* y *M. atlantae* (grupo II), *M. phenylpyruvica* y el género *Psychrobacter* (grupo III) y el género *Acinetobacter* (grupo IV). El grupo I se compone de cuatro "grupos", que incluyen el "grupo *M. lacunata*" (subespecies *M. lacunata*), el "grupo *M. nonliquefaciens*" (*M. nonliquefaciens*), el "grupo *M. bovis*" (*M. bovis* y *M. ovis*) y el "grupo *M. catarrhalis*". El último grupo incluye el diplococo *M. catarrhalis* y el primero, las falsas neisserias *M. cuniculi* y *M. caviae*. A pesar de la familiaridad del nombre "*Branhamella catarrhalis*" para los microbiólogos clínicos, *Moraxella catarrhalis* ha sido aceptada como la nueva designación para este microorganismo. *M. catarrhalis* y las "moraxella cócicas" se tratan en este capítulo junto con las especies de *Neisseria* debido a sus similitudes bioquímicas y morfológicas. Las otras especies de *Moraxella* se consideran con los bacilos gramnegativos no fermentadores en el capítulo 5.

Características generales del género *Neisseria*

Los miembros del género *Neisseria* son microorganismos gramnegativos baciliformes o con forma de cocos que por lo general se encuentran en pares o cadenas cortas. Las especies de diplococos tienen caras adyacentes aplanadas, que les dan una apariencia de "grano de café". Todas las especies del género *Neisseria* habitan en la superficie de las mucosas de huéspedes de sangre caliente. Estos microorganismos son inmóviles, no forman esporos y la mayoría de las especies crecen de modo óptimo a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Son capnófilos y se desarrollan mejor en ambientes húmedos. Las especies de *Neisseria* producen ácido a partir de hidratos de carbono en forma oxidativa y esta característica constituye parte de la identificación de referencia de estas especies. Por lo general, las especies de *Neisseria* (excepto las tres subespecies *N. elongata* y *N. weaveri*) son los cocos verdaderos de la familia *Neisseriaceae*. Las subespecies *N. elongata* y *N. weaveri* son bacilos gruesos medianos a grandes, que a veces se encuentran en pares o en cadenas cortas.^{25,89,299}

Todas las especies del género son oxidasas positivas y (excepto *N. elongata* subespecie *elongata* y *N. elongata* subespecie *nitroreducens*) son catalasas positivas.^{89,268} Los miembros del género que se encuentran en los seres humanos son *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava* (que incluye las biovariedades *subflava*, *flava* y *perflava*), *N. mucosa*, *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea* y subespecies de *N. elongata*. "*N. kochii*", una cepa rara que algunos autores consideran una subespecie de *N. gonorrhoeae*, está fenotípica y genéticamente relacionada con *N. gonorrhoeae*.⁴²⁶ Entre las especies animales, se encontraron *N. canis* y *N. weaveri* como parte de la flora normal del aparato respiratorio de perros. *N. denitrificans* está presente en las vías respiratorias altas de cobayos y *N. macacae*, *N. dentiae* y *N. iguanae* se encontraron en la boca de macacos de la India (*Macaca mulatta*) vacas y lagartos iguánidos, respectivamente.^{25,51,86,88,299,691} La importancia clínica, las características de los cultivos y los procedimientos para la diferenciación de estos microorganismos se tratan más adelante en este capítulo.

La mayoría de las especies de *Neisseria* humanas son habitantes normales de las vías respiratorias altas y no se consideran patógenos, aunque a veces se los puede aislar en procesos infecciosos, en particular durante el curso de una enfermedad subyacente y de inmunosupresión. *N. gonorrhoeae* siempre se considera un patógeno, sin tener en cuenta el lugar del aislamiento. *N. meningitidis* causa enfermedad importante y a menudo grave, pero también puede colonizar la nasofaringe humana sin producir enfermedad. Aunque la mayoría de las especies de *Neisseria* no tienen requerimientos nutricionales especiales de crecimiento, las especies patógenas y *N. gonorrhoeae* en particular, son más exigentes desde el punto de vista nutricional. *N. gonorrhoeae* no crecerá en ausencia del aminoácido cisteína y de una fuente de energía utilizable (glucosa, piruvato o lactato). Algunas cepas muestran requerimientos de aminoácidos, pirimidinas y purinas como resultado de vías biosintéticas alteradas o defectuosas.⁵⁹⁹ La demostración de estos requerimientos de crecimiento constituye la base de un método de tipificación de cepas de aislamientos gonocócicos llamado *auxotipificación* (tratado más adelante en este capítulo).¹²⁴

Las neisserias son aerobias, pero crecen en condiciones anaerobias si está presente un aceptor de electrones alternativo (p. ej., nitritos) en bajas concentraciones.^{352,353} Aunque las especies saprófitas de *Neisseria* pueden usar aminoácidos para el crecimiento, *Neisseria* patógena requiere glucosa u otra fuente de energía para el metabolismo mediante el ciclo de Krebs (véase cap. 5). El desarrollo de especies de *Neisseria* también se estimula con CO₂ y humedad. El CO₂ atmosférico acorta la fase de retraso porque se asimila rápidamente para la biosíntesis inicial de proteínas y ácidos nucleicos. En el laboratorio clínico el uso de medios enriquecidos e incubación de los cultivos en una atmósfera con CO₂ al 5-7% cumple con los requerimientos necesarios para que estos microorganismos presentes en las muestras clínicas se desarrollen en cultivo.

N. gonorrhoeae y *N. meningitidis* pueden intercambiar información genética mediante transformación y conjugación (véase cap. 5). Las neisserias tienen la capacidad de transformarse por acción del DNA plasmídico o cromosómico durante todo su ciclo de crecimiento y tomar el DNA aislado para incorporarlo posteriormente al cromosoma en las regiones con secuencias homólogas de nucleótidos. Para que esta transformación ocurra, son necesarias la expresión funcional de PilE (la proteína pilus mayor) y PilC (la proteína pilus menor) y la presencia de un factor habilitante (factor de "competencia"), lo que sugiere que ambos están involucrados en el reconocimiento o la captación del DNA transformador (véase recuadro 11-2).^{216,557,558} Las especies de *Neisseria* probablemente intercambien DNA in vivo por transformación a partir del ácido nucleico de las células, liberado por mecanismos autolíticos. La transformación puede derivar en características fenotípicas alteradas. Por ejemplo, se ha sugerido la adquisición transformacional de un gen dihidropteroato sintasa mutado como el mecanismo para la resistencia de los meningococos a las sulfonamidas.⁵²⁰ También sucede la transferencia de DNA plásmido pero no de DNA cromosómico por conjugación. La conjugación en los gonococos y los meningococos requiere la presencia de plásmidos conjugativos grandes de 24,5 a 25,2 MDa para que suceda la movilización de DNA (véanse recuadros 11-2 y 11-3). Estos plásmidos conjugativos existen sólo en cepas de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *N. cinerea* y pueden ser transferidos a células receptoras junto con genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos. No se identificaron bacteriófagos gonocócicos o meningocócicos, de modo que la transferencia de elementos genéticos por transducción no ocurre.

Resumen 11-2 Factores de virulencia y antígenos asociados con virulencia de *Neisseria gonorrhoeae*

Factores de virulencia	Comentarios
Lipooligosacáridos	Como otras bacterias gramnegativas, las especies de <i>Neisseria</i> tienen una membrana interna citoplasmática, una capa delgada de peptidoglucano y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS), proteínas y fosfolípidos (fig. 11-1). A diferencia de muchas otras bacterias gramnegativas (p. ej., las <i>Enterobacteriaceae</i>), los LPS gonocócicos y meningocócicos carecen de las cadenas laterales repetidas del antígeno somático "O", por fuera del núcleo de polisacárido; por lo tanto, esas estructuras se llaman más exactamente lipooligopolisacáridos (LOS).²⁷² Los polisacáridos nucleares del LOS gonocócico sufren variación antigénica en la estructura molecular con una frecuencia bastante elevada (10^{-2} a 10^{-3}), lo que deriva en la exposición en la superficie celular de diferentes epítomos de LOS nucleares distintos todo el tiempo.^{34,582} Las estructuras terminales en el LOS gonocócico se vuelven sialiladas in vivo por el agregado de ácido neuramínico del ácido citidina-5'-monofosfato-<i>N</i>-acetil-neuramínico (CMP-NANA).⁴⁹³ La variación estructural de LOS influye en la adherencia bacteriana y en la resistencia a los efectos bactericidas del suero humano normal.³⁸¹ El LOS gonocócico también estimula una respuesta inflamatoria rápida, activa el complemento, estimula la producción de citocinas e induce la lisis de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y de las células epiteliales.⁴⁹⁴ La inducción del factor de necrosis tumoral α (TNFα) por el LOS gonocócico puede causar algunos de los daños en el tejido observados en la enfermedad inflamatoria pélvica.²⁷¹ Los gonococos también liberan fragmentos de peptidoglucano por autólisis in vivo e in vitro; estos fragmentos son tóxicos para la mucosa del aparato genital y otros tejidos e intensifican la respuesta inflamatoria observada en las infecciones gonocócicas.²³⁵
Fimbrias (pili)	Los pili y otras superficies de <i>N. gonorrhoeae</i> han sido investigados durante años en el intento de identificar estructuras inmunogénicas para el desarrollo de vacunas gonocócicas.⁶⁶¹ <i>N. gonorrhoeae</i> y <i>N. meningitidis</i> poseen pili o fimbrias, que median de modo parcial en la fijación de los microorganismos a las superficies mucosas (véase cap. 5).²⁹² Los pili gonocócicos están compuestos por subunidades de la proteína pilina que tienen un peso molecular de 16.5 a 21.5 kDa.⁵⁸⁶ Los pili gonocócicos tienen tres regiones distintas: una región de 53 residuos aminoácidos, conservada, adyacente a la membrana externa que funciona en conjunto, una región semivariable central y una región carboxiterminal variable. Los gonococos con pili se adhieren a las células sensibles para iniciar la infección: anticuerpos dirigidos contra los pili gonocócicos pueden inhibir la adherencia.⁶⁹⁵ Los pili gonocócicos funcionan durante parte de un proceso de fijación en dos etapas ayudando a superar la repulsión electrostática entre la superficie de la mucosa cargada negativamente y las células bacterianas con carga similar.²⁹² La formación del pili y la unión de <i>N. gonorrhoeae</i> mediada por pili son prerequisites para la infección gonocócica in vivo. Los pili gonocócicos sufren variación de fase y variación antigénica. In vitro, la variación de fase entre el estado con pili (P⁺ y P++) y sin pili (P⁻) sucede con una frecuencia elevada; en esta situación, los genes <i>pilE</i> (genes estructurales para proteínas de pilus) pueden no estar expresados (las proteínas de pilus no se producen) o las proteínas de pilus no pueden ensamblarse en pili funcionales y se excretan en el medio. La variación de fase reversible resulta de fabricar desvíos en la región que codifica el péptido señal de pilC1 y pilC2, genes que codifican las proteínas que reúnen los pili.³³⁰ Los pili gonocócicos también sufren variación genética. La mayoría de las variedades de <i>N. gonorrhoeae</i> contienen una única copia de <i>pilE</i>, que contiene el gen de la subunidad principal de pilina expresado y asociado con promotores y al menos 20 copias de <i>pilS</i>, transcripcionalmente silente, genes pilina incompletos que contienen secuencias que varían y que carecen de la región promotor y secuencias 5' codificantes. La recombinación entre los genes pili expresados y silentes se traduce en nuevos tipos antigénicos de pili. En una sola variedad en un tiempo dado, sólo un único gen pilus es funcional y se expresa sólo en un tipo de pilus. El número total de tipos de pilus que puede resultar de la recombinación entre los 20 o más genes <i>pilS</i> sugiere que la colección de tipos de pilus es teóricamente grande. La expresión del gen <i>pil</i> cuantitativa en gonococos también responde a la regulación transcripcional por proteínas transductoras de señal que están codificadas por <i>pilA</i> y <i>pilB</i> y que se forman en respuestas a estímulos del medioambiente, como los niveles de nitrógeno. Otras proteínas asociadas con pilus (p. ej., PilV) se expresan en niveles bajos con respecto a la proteína estructural principal de pilus (PilE) e interactúan con proteínas que reúnen pilus PilC.⁷¹⁹ Los estudios en voluntarios humanos han probado que la variación antigénica en los pili suceden durante la infección clínica, con distintas variantes pilina aisladas durante el curso de la infección.⁵⁹⁶ Los pili intervienen en la fijación gonocócica a varios tipos de células, como las células epiteliales vaginales y bucales, eritrocitos, células amnióticas, neutrófilos y células espermáticas. Los pili también impiden la fagocitosis gonocócica por los NPM.
Proteínas de la membrana externa PorI-PorA/PorB	Las paredes celulares de <i>N. gonorrhoeae</i> contienen proteínas que se ubican en la superficie de la membrana externa o que abarcan la membrana externa (proteínas integrales) (fig. 11-1). Las proteínas de la membrana externa gonocócica (OMP) demuestran o imparten muchas actividades biológicas, entre ellas la producción de respuestas inmunitarias humoral y mediada por células, la disminución de asociación leucocitaria y la resistencia a los efectos bactericidas del suero humano normal.⁶¹³ Algunas de estas proteínas son específicas de tipo, de variedad y de especie y han sido explotadas como posibles antígenos para el desarrollo de vacunas.⁶⁶¹ La proteína porina, o proteína I, ahora llamada Por, es una proteína de 34 a 36 kDa, termoestable, asociada con LOS. Los gonococos expresan una de las dos formas de proteínas relacionadas desde el punto de vista estructural, pero inmunológica y químicamente distintas, llamadas PorA (PIA) y PorB (PIB). Existe una única copia del gen estructural para esta proteína en el cromosoma, lo que sugiere que los genes para PorA y PorB son alelos.¹¹⁵ Una cepa de <i>N. gonorrhoeae</i> tiene PorA o PorB pero nunca ambas. Las proteínas Por son proteínas integrales y funcionan como canales específicos para aniones a través de la membrana externa gonocócica.⁶¹³ La proteína Por puede funcionar en la interacción célula-célula por colapso del potencial de membrana en contacto con las células epiteliales y puede influir en la muerte intracelular de microorganismos en los PMN mediante el impedimento de la fusión fagosoma-lisosoma y la disminución del estallido oxidativo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos de Por son la base de los esquemas de tipificación gonocócica serológica.^{586,613} Los anticuerpos anti-Por también se usan en pruebas de coagulación comerciales (GonoGen I[®] y Phadebact GC[®]) para identificación de <i>N. gonorrhoeae</i>. Se ha desarrollado un sistema para la tipificación de regiones variables del gen <i>porB</i> que usa sondas de oligonucleótidos que pueden detectar diferencias en <i>porB</i> entre los aislamientos pertenecientes a la misma serovariedad.

(Continúa)

Recuadro 11-2 Factores de virulencia y antígenos asociados con virulencia de *Neisseria gonorrhoeae* (cont.)

Factores de virulencia	Comentarios
Proteínas Opa (Proteína II, P.II)	<i>N. gonorrhoeae</i> expresa las proteínas (Opa) de opacidad de la membrana externa que aumenta la adherencia mediada por pilus a las superficies mucosas. ²⁸⁹ Ciertas proteínas Opa también facilitan la invasión celular a la mucosa por <i>N. gonorrhoeae</i> . ^{233,370,440,468} Estas proteínas son termolábiles y tienen pesos moleculares de 24 a 28 kDa. ⁶³³ Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> tienen 11 a 12 genes <i>Opa</i> completos en el cromosoma; cada uno tiene su región promotor propia y se transcribe en mRNA de manera continua. ⁶³ Una variedad gonocócica puede expresar cuatro o cinco genes <i>Opa</i> diferentes en forma simultánea o no expresar ninguno. La regulación del gen <i>Opa</i> depende de la presencia de una secuencia de cinco nucleótidos (CTCTT) que se encuentren en triplicado (o múltiplos de tres) en el extremo 3' del gen estructural inmediatamente adyacente al codón "inicio" ATG. ⁶²⁶ En una célula gonocócica pueden estar presentes 7 a 28 repeticiones de esta secuencia pentamérica. Cuando estas repeticiones se encuentran en triplicado (o múltiplos de tres), los genes <i>Opa</i> se transcriben y traducen en bloque, lo que conduce a la expresión simultánea de varios genes <i>Opa</i> diferentes. Otros múltiplos de la repetición pentamérica derivan en la transcripción que está fuera del bloque cuando se traduce, así las proteínas Opa no se producen. La variabilidad del número de copias de esta secuencia de cinco nucleótidos se genera durante la replicación del DNA. ^{160,161} Además, los dominios hipervariables dentro de cada gen <i>Opa</i> pueden recombinar con dominios homólogos en otros loci <i>Opa</i> , lo que conduce a la evolución de genes <i>Opa</i> y proteínas nuevos. Las colonias gonocócicas que expresan proteínas Opa son opacas en ciertos medios de cultivo transparentes, mientras que las variedades Opa negativas producen colonias claras. Las proteínas Opa también pueden variar durante una infección uretral no complicada y están influidas por el ciclo menstrual. ³²⁶ Los aislamientos endocervicales de mujeres que estén menstruando o de lugares normalmente estériles (p. ej., sangre, líquidos articulares) a menudo carecen de proteínas Opa. La variación antigénica de las proteínas Opa durante las infecciones naturales permite que los gonococos evadan a los efectores de la respuesta inmunitaria.
Proteína Rmp (Proteína III, P.III)	Una tercera proteína gonocócica, llamada proteína III o Rmp (proteína modificable por reducción) tiene un peso molecular de 30 a 31 kDa, está muy asociada con LOS y Por, muestra una pequeña variación intravariedad y es homóloga a una proteína de la membrana externa de <i>Escherichia coli</i> , llamada OmpA. ^{265,526} Los anticuerpos dirigidos contra Rmp en la superficie celular bloquean la unión de los anticuerpos anti-LOS y anti-Por. La unión de estos anticuerpos disminuye en gran medida los efectos bactericidas del suero humano normal sobre los gonococos. ⁵²⁶
Proteína H.8	Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> también tienen dos proteínas H.8, llamadas así porque tienen epítomos que reaccionan con el anticuerpo monoclonal H.8. ¹¹² Aunque la función de estas proteínas que contienen cobre se desconoce, proteínas similares en otros microorganismos están involucradas en el transporte electrónico. ³⁴³ Las proteínas H.8 están presentes en todos los gonococos y meningococos y en las cepas de <i>N. lactamica</i> y <i>N. cinerea</i> . ¹¹² Los pacientes con IGD y con infecciones meningocócicas tienen anticuerpos contra esos antígenos de membrana externa H.8. ⁶⁸
Otras Proteínas de la membrana externa	Se describieron muchas otras proteínas de membrana externa en <i>N. gonorrhoeae</i> . A diferencia de las ya tratadas, estas otras se producen sólo en condiciones de carencia de hierro o anaerobiosis. ⁷⁰⁹ Se describieron varias proteínas reguladas por hierro (FRP), incluida una proteína de unión férrica de 37 kDa (Fbp), más otras cuyo peso molecular oscila de 60 a más de 100 kDa. ⁴⁴² Se observaron Fbp de 37 kDa similares tanto en gonococos como en meningococos. ⁴⁴¹ También se ha encontrado en gonococos y meningococos otra proteína que transporta hierro, FrpB. ^{61,69} Estas pequeñas proteínas de membrana externa reguladas por hierro son receptores para la transferrina, lactoferrina o hemoglobina que unen sus respectivos ligandos y, durante la infección con las proteínas integrales de la membrana externa, transportan hierro hacia el interior de la célula. ⁷⁰⁹
IgA1 Proteasa	Todos los gonococos producen una IgA1 proteasa, que hidroliza las moléculas de IgA1 (pero no IgA2) en la región bisagra (véase cap. 3). Esta enzima actúa como un factor de virulencia por inactivación de la IgA1 en las superficies de las mucosas, con lo que se permite la fijación inicial y la posterior invasión. ⁴⁵⁷ IgA1 también promueve la supervivencia intracelular de los gonococos por modificación enzimática de una proteína intracelular llamada LAMP1 que está involucrada en la fusión fagosoma/lisosoma. ⁴³ Otra investigación ha documentado que esta exoenzima puede desencadenar la liberación de citocinas proinflamatorias de los monocitos humanos y puede activar los linfocitos T CD4(+) y CD8(+), lo que conduce a la producción de interferón gamma (IFN- γ) y TNF. ⁶⁶⁶ La proteasa se sintetiza como una proteína precursora de 169 kDa que se escinde enzimáticamente para formar la IgA1 proteasa madura de 106 kDa y una proteína exportable asociada con la membrana de 45 kDa.
Plásmidos	Los determinantes de virulencia llevados por plásmidos en <i>N. gonorrhoeae</i> están asociados con la resistencia a los antibióticos. Aunque se describieron varios otros, los dos plásmidos principales que transportan los genes estructurales para las β -lactamasas TEM-1 tienen pesos moleculares de 3,2 MDa y 4,4 MDa. ²⁹ El plásmido de 3,2 MDa fue importado de África alrededor de 1976 y se encontró en principio en África, Europa y el este de los Estados Unidos, mientras que el plásmido de 4,4 MDa probablemente se originó en Asia y se transportó a grandes ciudades en el oeste de los Estados Unidos a fines de la década de 1970. Las regiones del gen son homólogas a TnA, un transposón de resistencia a la ampicilina encontrado en la familia <i>Enterobacteriaceae</i> . Sin embargo, más del 60% de las secuencias de transposón encontradas en los plásmidos gonocócicos son homólogas a las secuencias de nucleótidos encontradas en los plásmidos de especies de <i>Haemophilus</i> . Los plásmidos de β -lactamasas gonocócicas pueden ser transferidos por conjugación si la célula donante también tiene el plásmido conjugativo de 24,5 MDa o de 25,2 MDa. Los últimos plásmidos también transportan tetM, que desde el punto de vista fenotípico produce un elevado nivel de resistencia a las tetraciclinas (las concentraciones inhibitorias mínimas [CIM] ≥ 16 μ g/mL). Estos plásmidos autotransferibles pueden transferirse por conjugación a otro gonococo, meningococo, <i>neisseria</i> saprófita y a algunas especies de <i>Haemophilus</i> . La mayoría de las cepas gonocócicas también llevan un plásmido "críptico" de 2,6 MDa de función desconocida.

Recuadro 11-3 Factores de virulencia y antígenos asociados con la virulencia de *Neisseria meningitidis*

Factores de virulencia y antígenos	Comentarios
Polisacáridos capsulares	Las cepas de <i>N. meningitidis</i> con frecuencia son capsuladas y se describieron 13 serogrupos capsulares diferentes, designados serogrupos A, B, C, D, H, I, K, L, W125, X, Y, Z y 29E. Con la excepción del polisacárido del serogrupo A, estas moléculas están compuestas por derivados del ácido <i>N</i>-acetil-neuramínico (ácido siálico). El polisacárido capsular del grupo A está compuesto por unidades repetidas de α-<i>N</i>-acetil-manosamina-1-fosfato. En los otros serogrupos importantes, se sintetiza un precursor del polisacárido capsular, ácido citosina-monofosfato-<i>N</i>-acetil-neuramínico (CMP-NANA), por el operón <i>sia</i> de tres genes. Un cuarto gen del operón de la biosíntesis de la cápsula es responsable de las polisialiltransferasas que son únicas para cada serogrupo capsular meningocócico.^{635,636} Otro operón conservado entre los serogrupos meningocócicos —el operón <i>ctr</i> de cuatro genes— codifica proteínas necesarias para exportar el polisacárido capsular de la célula.⁶³⁴ Los aislamientos sistémicos de <i>N. meningitidis</i> por lo general son densamente capsulados, mientras que las cepas transportadas en la nasofaringe tienen menos material capsular o son no capsuladas (no agrupables). Los meningococos no agrupables se originan por subregulación de la producción de la cápsula. Esto sucede por el agregado de una secuencia de inserción (p. ej., <i>IS1301</i>) en el primer gen del operón <i>sia</i> o por recombinación/inactivación genéticas de los loci de polisialiltransferasa específica de serogrupo entre especies meningocócicas.^{282,636} El desvío capsular (el cambio de un serogrupo por otro) también se ha demostrado in vivo e in vitro y sucede por mal apareamiento de hebras deslizadas en el gen polisialiltransferasa (<i>siaD</i>).²⁸³ Los polisacáridos capsulares meningocócicos impiden la muerte del microorganismo por la acción de células fagocíticas y mejora su supervivencia durante la invasión al SNC y al torrente circulatorio. Los polisacáridos capsulares meningocócicos no intervienen en la adherencia a las células epiteliales y las células capsuladas se adhieren a las células de las mucosas menos fácilmente que las células no capsuladas.⁶²⁵
Lipooligosacáridos	Como el LOS gonocócico, el LOS de <i>N. meningitidis</i> carece de antígenos O repetidos y consiste en una región nuclear interna conservada compuesta por ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y heptosa unidos al lípido A.²⁷² Los residuos de hidratos de carbono nucleares externos (glucosa, galactosa, <i>N</i>-acetilglucosamina y ácido <i>N</i>-acetilneuramínico) están unidos a las heptosas del núcleo interno. En <i>N. meningitidis</i>, algunos de los residuos heptosas están unidos a cadenas de oligosacáridos de composición variable: estos residuos forman la base para la inmunotipificación de las cepas meningocócicas. Se describieron al menos 12 inmunitipos LOS, designados L1 hasta L12.⁴¹² La presencia del hidrato de carbono lacto-<i>N</i>-neotetrosa en el LOS se estableció como un determinante de virulencia meningocócica. Las mitades de lacto-<i>N</i>-neotetrosa en posiciones terminales en los LOS se asemejan a los componentes estructurales de los glucoesfingolípidos presentes en muchos tipos de células humanas, incluido el antígeno del eritrocito I humano.⁴¹¹ Ocho de los 12 inmunitipos LOS de <i>N. meningitidis</i> contienen la estructura de lacto-<i>N</i>-neotetrosa.⁶⁶⁵ En modelos animales, las cepas recuperadas de infecciones sistémicas expresan este determinante incluso cuando la capa usada originalmente para establecer la infección no lo hacía. Los aislamientos meningocócicos sistémicos humanos también expresan este determinante, mientras que puede no hacerlo la misma cepa aislada de la nasofaringe del paciente.³²⁸ Las mitades de lacto-<i>N</i>-neotetrosa terminales en los LOS también son sustratos para las 2,3-sialiltransferasas endógenas.²⁵⁵ La sialilación de estos residuos enmascara su presencia y deriva en la subregulación de la activación del complemento y la inhibición de la actividad bactericida del suero. El LOS meningocócico también estimula la liberación de TNF-α, que causa daño posterior en la célula huésped.
Fimbrias (pili)	Los aislamientos frescos de meningococos tienen pili: los pili intervienen en la fijación de los microorganismos a las células mucosas de la nasofaringe.⁵⁰⁷ In vivo, los microorganismos en el LCR tienen pili, pero no se sabe si éstos cumplen un papel en la capacidad del meningococo para atravesar la barrera hematoencefálica o para interactuar con tejidos meníngeos.²⁹² Los pili de <i>N. meningitidis</i> se dividen en pili clase 1 y pili clase 2; los pili clase 1 se asemejan mucho a los de <i>N. gonorrhoeae</i>, mientras que los pili clase 2 están compuestos por proteínas subunitarias más pequeñas que comparten determinantes conformacionales con los pili clase 1 y los gonocócicos.⁶⁹⁶ Los pili están compuestos por subunidades de la proteína pilina de 15 a 20 kDa codificadas por el locus <i>pilE</i>. El dominio C-terminal de las proteínas <i>pilE</i> contiene regiones variables que son responsables de la variación antigénica de la pilina.⁴⁶⁷ La formación estable de pili en los meningococos requiere la participación de dos proteínas de 110 kDa, llamadas PilC1 y PilC2, que se encuentran en los extremos de los pili funcionales y en la superficie de la membrana externa.^{466,558} La expresión de la proteína PilC1 es necesaria para la adherencia, porque las cepas que carecen de locus <i>pilC1</i> y expresan sólo PilC2 no se adhieren a las células epiteliales a pesar de tener los pili intactos.⁵²¹ En contacto con las células epiteliales, la expresión del gen <i>pilC1</i> se sobreexpresa, lo que conduce a la síntesis de pilus adicionales.⁶³⁹ Una vez que sucede la adherencia mediada por pilus, otra proteína (PilT) inicia un contacto más íntimo bacteria-superficie celular.⁵¹⁸ Otros loci (p. ej., <i>pilG</i>, <i>pilQ</i>) codifican proteínas involucradas en la exportación de la proteína pilina y en la formación del pilus.^{659,660} La proteína cofactor de membrana (CD46), una glucoproteína que participa en la regulación del complemento y que se encuentra en muchos tipos celulares, ha sido identificada como un receptor del pilus meningocócico.³³⁶
Proteínas de la membrana externa PorA y PorB	Las proteínas de la membrana externa (OMP, por sus siglas del inglés) de <i>N. meningitidis</i> se dividen en cinco clases sobre la base del peso molecular: clase 1 (44 a 47 kDa), clase 2 (40 a 42 kDa), clase 3 (37 a 39 kDa), clase 4 (33 a 34 kDa) y clase 5 (26 a 30 kDa).²⁴² Estas proteínas difieren en su sensibilidad a la hidrólisis enzimática y desnaturalización térmica. Todas las cepas de <i>N. meningitidis</i> tienen OMP de clase 2 o de clase 3 que constituye la proteína predominante de la membrana externa. Las proteínas de clase 1 y de clase 2 son porinas y también son responsables de la especificidad de serotipo. Las proteínas de clase 1 y de clase 5 se encuentran en la mayoría de los meningococos, aunque se han señalado diferencias cualitativas y cuantitativas en su expresión. El sistema de tipificación serológica que se usa para estudios epidemiológicos de meningococos se basa en el antígeno polisacárido de grupo junto con diferencias antigénicas entre las proteínas de clase 2 o 3 y los determinantes LOS presentes.^{33,242} Los determinantes antigénicos encontrados en las proteínas 1 y 5, si están presentes, se usan para designar subserotipos. Por ejemplo, un meningococo del serotipo C:2b:P1.3:P5.2:L3.7 es un meningococo del serogrupo C que expresa una proteína de clase 2 serotipo "b", una proteína de clase 1 serotipo 3, una proteína de clase 5 serotipo 2 y LOS tipos 3 y 7.²⁴²

(Continúa)

Recuadro 11-3 Factores de virulencia y antígenos asociados con la virulencia de *Neisseria meningitidis* (cont.)

Factores de virulencia y antígenos	Comentarios
Proteínas Opa y Opc	Las proteínas porina meningocócicas son el resultado de la expresión de dos genes llamados <i>porA</i> y <i>porB</i>. La proteína PorA se produce en todos los meningococos y es una porina de clase 1 (catión-selectiva); aislamientos individuales pueden variar en las cantidades de proteína PorA presentes en la membrana externa. PorB codifica proteínas PorB clase 2 o clase 3. Estas son porinas anión-selectivas que constituyen el componente porina principal en la membrana externa meningocócica. Las proteínas clase 2/clase 3 de <i>N. meningitidis</i> son análogas a las proteínas PorA(PIA)/PorB(PIB) de <i>N. gonorrhoeae</i>. Las proteínas Por B pueden insertarse por sí mismas en las membranas de las células diana y de los fagolisosomas e inducen apoptosis, con lo que facilitan la infección e invasión del huésped.⁴⁵⁸ Las proteínas Opa de clase 5 también se encuentran en la membrana externa de <i>N. meningitidis</i>. Sin embargo, en vez del repertorio de 12 genes Opa como en los gonococos, se han identificado sólo tres a cuatro genes Opa en los diferentes aislamientos de meningococos.⁴⁴⁰ Las proteínas Opa meningocócicas también facilitan la adherencia bacteriana a las células epiteliales y a los neutrófilos. Aislamientos de distintos lugares anatómicos (p. ej., sangre, LCR, nasofaringe) también pueden expresar proteínas Opa diferentes.⁶⁵⁶ Las moléculas de adhesión CD66 humanas son receptores para las proteínas Opa meningocócicas.⁶⁹⁷ Opc es otra proteína de clase 5 de unión a heparina y vitronectina. Opc funciona en la adherencia a las mucosas y en la invasión de células endoteliales y también es una diana para los anticuerpos bactericidas.¹⁸⁵
Proteínas de adquisición/unión al hierro	Como los gonococos, <i>N. meningitidis</i> ha desarrollado mecanismos particulares para la adquisición de hierro. Los tres sistemas de transporte de dos componentes, llamados TbpA/TbpB, LbpA/LbpB y HpuA/HpuB están involucrados en la adquisición de hierro de la transferrina, lactoferrina y hemoglobina/haptoglobina humanas, respectivamente.^{387,388,502,546,627} Los sistemas TbpA/TbpB funcionan de modo óptimo durante la infección inicial y la invasión, porque la lactoferrina es la principal fuente de hierro en las superficies mucosas, mientras que el sistema HpuA/HpuB se expresa de manera máxima durante la bacteriemia, cuando los complejos haptoglobina/hemoglobina representan la forma de hierro más abundante. Los meningococos también tienen una proteína de superficie llamada HmbR que puede extraer hemo de la hemoglobina unida a la superficie y transportarlo al interior de la célula.³⁸² Todas estas proteínas son OMP integrales.
IgA1 Proteasa	Todos los meningococos producen una IgA 1 proteasa similar a la encontrada en <i>N. gonorrhoeae</i>. Se postula que sirve como un factor de virulencia mediante la anulación de la inmunidad de las mucosas. Los anticuerpos contra IgA 1 proteasa se producen y son detectables durante la enfermedad meningocócica y aparecen también durante la portación nasofaríngea asintomática.⁹⁶
Plásmidos	Los plásmidos no son comunes en <i>N. meningitidis</i>. Sin embargo, las cepas de <i>N. meningitidis</i> resistentes a la tetraciclina contienen el mismo plásmido que lleva tetM de 25,2 MDa que el encontrado en <i>N. gonorrhoeae</i> resistente a la tetraciclina. Los plásmidos que codifican β-lactamasa de <i>N. gonorrhoeae</i> también pueden ser transferidos a <i>N. meningitidis</i> in vitro por el plásmido de 24,5 o de 25,2 kDa encontrado en algunos gonococos.⁵⁴² La adquisición meningocócica del gen β-lactamasa también es posible que ocurra in vivo, en especial cuando ambos microorganismos están presentes en el mismo lugar o muestra.¹⁸⁹ Backman y cols. secuenciaron los plásmidos de dos cepas de <i>N. meningitidis</i> β-lactamasa positivas aisladas en España.⁴⁴ El plásmido de 5 597 pares de bases fue el mismo en ambos aislamientos y fue virtualmente idéntico al plásmido β-lactamasa de 5 597 pares de bases encontrado en <i>N. gonorrhoeae</i>.

Las especies patógenas de *Neisseria* tienen varios factores y características que contribuyen a la virulencia. Las cepas de *N. meningitidis* aisladas en infecciones graves suelen tener cápsulas de polisacáridos por fuera de la membrana externa de la superficie celular bacteriana; se describieron 13 serogrupos capsulares diferentes (véase más adelante). Las cápsulas vuelven a los microorganismos resistentes a la fagocitosis, en particular en ausencia de anticuerpos opsonizantes.³³ Varios antígenos proteicos de la membrana externa encontrados tanto en *N. gonorrhoeae* como en *N. meningitidis* también tienen funciones asociadas con la virulencia (fig. 11-1; véanse recuadros 11-2 y 11-3). Los gonococos y los meningococos producen, además, una proteasa de inmunoglobulina A (Ig A1) capaz de hidrolizar la IgA 1 secretoria y humoral en los fragmentos Fab y Fc, que neutralizan los efectos de IgA secretoria y anulan la resistencia de la mucosa a la infección.⁴⁵⁷ Las condiciones atmosféricas y nutricionales también contribuyen a la virulencia de los gonococos y los meningococos. La colonización y la infección ulterior de las superficies mucosas por estos microorganismos requieren hierro y ambos tienen métodos enzimáticos regulados genéticamente para liberarlo a partir de transferrina y lactoferrina, haciendo accesible el hierro libre para el metabolismo bacteriano (véanse recuadros 11-2 y 11-3). Los

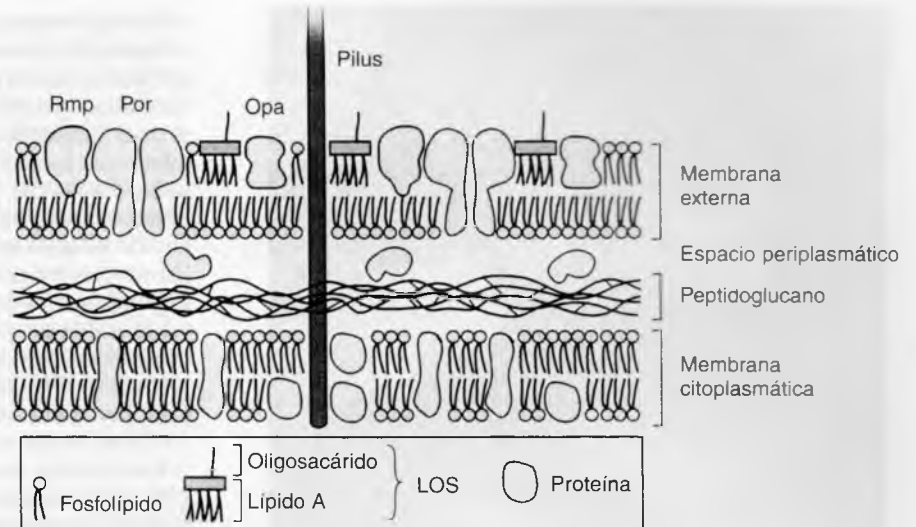
requerimientos de las diferentes cepas gonocócicas y meningocócicas de ciertos aminoácidos específicos u otros nutrientes también pueden limitar su capacidad de causar determinados síndromes clínicos. Las cepas de *N. gonorrhoeae* también pueden crecer en anaerobiosis en presencia de nitrito como aceptor de electrones.^{352,353} En estas condiciones, también se expresan proteínas de la membrana externa nuevas y diferentes reguladas genéticamente.¹⁵⁶ Esta propiedad puede contribuir a la virulencia gonocócica porque permite la proliferación del microorganismo en ambientes anaerobios, como el endocervix, el recto, el aparato genital y la faringe, y también explicaría su papel fundamental en la enfermedad inflamatoria pelviana, caso en el cual se lo puede recuperar en cultivos junto con bacterias anaerobias estrictas.

Importancia clínica de las especies de *Neisseria* *Neisseria gonorrhoeae*

EPIDEMIOLOGÍA

N. gonorrhoeae es el agente causal de la gonorrea, una infección bacteriana de gran importancia para la salud pública. En los Estados Unidos, la incidencia de gonorrea aumentó de

Figura 11-1 Esquema de la estructura de la superficie de *N. gonorrhoeae*, que muestra los componentes principales que contribuyen a la patogenicidad y a la resistencia a los antibióticos. Opa, Por y Rmp son las designaciones de las principales proteínas de la membrana externa (véase el texto). LOS significa lipooligosacárido.



manera constante durante la década de 1960 y principios de los años 1970, con la incidencia más elevada —más de 460 casos por 100 000 habitantes— que ocurrió en 1975.⁶¹⁴ La “gonorrea epidémica” que sucedió durante esos años se atribuyó a varios factores, entre ellos, el incremento de la población de adultos jóvenes en riesgo, la importación de variedades gonocócicas menos sensibles que acompañó el retorno de los soldados que prestaron el servicio militar en la guerra de Vietnam, el aumento del uso de métodos anticonceptivos sin barrera (la píldora anticonceptiva y los dispositivos intrauterinos), el mejoramiento de los métodos de detección y seguimiento de contactos.^{303,614} En las décadas de 1980 y 1990, la incidencia de gonorrea declinó de modo sostenido. Esta declinación se debió en gran parte a los cambios en las conductas sexuales, en particular entre varones homosexuales o bisexuales, en respuesta al SIDA y a la detección más eficaz de casos y contactos. En 1994, se informó por primera vez que los casos de infección por *Chlamydia trachomatis* excedían los de infección gonocócica.¹⁹¹ Sin embargo, la tendencia decreciente de la incidencia de infecciones gonocócicas entre varones homosexuales y bisexuales se ha revertido en los últimos años. Los datos del Proyecto de vigilancia de aislamientos gonocócicos (*Gonococcal Isolate Surveillance Project*) de los CDC muestran que la proporción de infecciones en varones homo/bisexuales aumentó de 4.5% en 1992 a 13.2% en 1999.²³⁸ La incidencia de gonorrea todavía es alta en los adolescentes sexualmente activos (con edades desde 10 hasta 19 años) y los adultos jóvenes (con edades desde 20 hasta 24 años) de todas las razas, y los índices más altos están entre los varones y las mujeres de 15 a 24 años.⁶¹⁴ Índices desproporcionadamente altos de infección gonocócica también se encuentran en la población afroamericana urbana, en particular en las mujeres de 15 a 19 años. La transmisión de la gonorrea está relacionada con un grupo social o “núcleo” de “transmisores de alta frecuencia”, que sirven como reservorio de la infección.^{101,612} Los factores de riesgo social (el nivel socioeconómico bajo, la residencia urbana, la falta de educación y de acceso a la atención sanitaria, el estado civil soltero, la raza/etnia, la homosexualidad masculina, la prostitución, los antecedentes de otras enfermedades de transmisión sexual [ETS]) y de conductas de riesgo (relaciones sexuales sin protección, parejas múltiples, parejas de alto riesgo, consumo de drogas) han sido identificados como dianas

para la intervención y los programas de control de las ETS. En los Estados Unidos, la infección gonocócica se ha convertido cada vez más en una enfermedad del pobre y del desprotegido y, como con la infección por HIV, las asociaciones epidemiológicas han advertido una relación entre gonorrea, el uso de crack de cocaína y drogas intravenosas, y el intercambio de sexo por dinero o drogas.⁵⁸⁹ Desde el punto de vista global, la mayor incidencia de gonorrea y sus complicaciones se encuentra en los países en vías de desarrollo, como los de África y América latina.

El riesgo de adquirir gonorrea es multifactorial y se relaciona con la frecuencia y los sitios de exposición. Para los varones heterosexuales, el riesgo de adquirir infección uretral de una mujer infectada es casi del 20% con una única exposición y de más del 80% con cuatro exposiciones.³⁰⁰ Debido a consideraciones anatómicas, el riesgo de infección del aparato genital femenino con una única exposición a un varón infectado es mucho mayor. La transmisión de la infección rectal también es bastante eficaz y estudios recientes entre varones homosexuales y bisexuales han demostrado que la infección uretral luego del sexo oral con una pareja infectada puede representar hasta el 26% de las infecciones uretrales diagnosticadas en esta población.³⁷² En las mujeres, el uso de métodos anticonceptivos hormonales está asociado con un mayor riesgo de infección gonocócica, mientras que los métodos de barrera, como condones o diafragmas usados con geles y espumas espermicidas, (p. ej., nonoxinol 9), ejercen un efecto protector contra la infección.^{403,404}

INFECCIONES CAUSADAS POR *N. GONORRHOEA*

En los varones, *N. gonorrhoeae* causa uretritis aguda con disuria y secreción uretral (fig. 11-2).^{303,614} El período de incubación entre la adquisición del microorganismo y la aparición de los síntomas oscila entre 1 y 14 días o más, con un promedio de 2 a 7 días. Estas infecciones son asintomáticas durante el estadio prodrómico y, a la inversa, 95-99% de los hombres con infección gonocócica uretral experimentarán una secreción alguna vez. La secreción es purulenta en el 75% de los casos, turbia en el 20% y mucosa en alrededor del 5%; la consistencia de la secreción en la presentación está afectada por el tiempo de incubación y si el paciente ha orinado recientemente.



Figura 11-2 Secreción uretral purulenta característica de infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

Casi el 2,5% de los hombres que consultan a centros de enfermedades de transmisión sexual están completamente asintomáticos, y se estima que la prevalencia de gonorrea urogenital asintomática en la población masculina general puede ser de hasta el 5%. Este patrón de enfermedad a menudo está asociado con infecciones por ciertas serovariedades gonocócicas Por IA y auxotipos de *N. gonorrhoeae* con arginina, hipoxantina y uracilo (AHU) y otros (véase más adelante).^{102,356,360,453} Si no se tratan, la mayoría de los casos de gonorrea se resuelven espontáneamente, pero en menos del 10% de los pacientes la infección ascendente puede derivar en epididimitis gonocócica, epididimoorquitis, prostatitis, abscesos periuretrales y constricción uretral. Estas complicaciones se observan rara vez en la práctica clínica en los Estados Unidos.

En las mujeres, la infección gonocócica primaria está presente en el endocérnix y la infección uretral simultánea ocurre en el 70-90% de los casos. Después de un período de incubación de 8-10 días, las pacientes pueden presentar con secreción cervicovaginal anormal o sangrado intermenstrual y dolor abdominal o pélvico; esto último sugiere la presencia de enfermedad de los genitales internos.⁶³⁷ La presencia de disuria indica compromiso uretral importante. La infección gonocócica del epitelio pavimentoso vaginal de mujeres pospuberales no es común y en las que han tenido histerectomías, la uretra es el sitio primario más frecuente de infección. Aunque a menudo se ha establecido que la mayoría de las mujeres con infección gonocócica son asintomáticas, esto no es verdad. Esta aseveración se basaba en que muchas mujeres infectadas fueron detectadas durante exámenes de cribado masivo en lugares como clínicas de planificación familiar, y no se tenía en cuenta que muchas mujeres consultaban a los médicos o a los servicios de emergencia por diversos síntomas del aparato genital (p. ej., secreción vaginal, dispareunia, menorragia) o pélvicos.⁶¹⁴ Los síntomas de infección endocervical no complicada a veces se asemejan a los de otras afecciones, como cistitis o infecciones vaginales, y la sintomatología de endocervicitis gonocócica

suele estar enmascarada por la coinfección con *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* o *Candida albicans*. Aunque el aparato genital puede parecer normal, un examen endocervical cuidadoso revela áreas de mucosa cervical friables que sangran al limpiarlas. Sin embargo, sólo 10-20% de las mujeres infectadas tienen secreción endocervical mucopurulenta. La infección de las glándulas de Bertolino y de Skene puede observarse en casi un tercio de las mujeres con infección genital. La manipulación cuidadosa de estas áreas puede a veces permitir la obtención de material purulento para examen directo y cultivo. La gonorrea endocervical también puede complicar el embarazo y es un cofactor reconocido para aborto espontáneo, corioamnionitis, rotura prematura de membranas y parto prematuro.^{303,637} Los recién nacidos de madres con infecciones genitales están expuestos a padecer conjuntivitis gonocócica ("oftalmía neonatal") o infección gonocócica faríngea.

La infección gonocócica ascendente puede suceder en el 10-20% de las mujeres infectadas y derivar en enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) aguda que se manifiesta con salpingitis (infección de las trompas de Falopio), endometritis y abscesos tuboováricos, que pueden causar cicatrices en las trompas de Falopio, embarazos ectópicos, esterilidad y dolor pélvico crónico.^{303,614} Los síntomas de EIP gonocócica son dolor pélvico bilateral, secreción cervical anormal y sangrado, dolor durante el movimiento, fiebre y leucocitosis periférica. La EIP causada por *N. gonorrhoeae* por lo general sucede temprana, más que tardíamente, en la infección y a menudo poco después del comienzo o durante la menstruación. Se observa fiebre, leucocitosis, eritrosedimentación elevada y proteína C reactiva en alrededor de dos tercios de las pacientes, mientras que los escalofríos, las náuseas y los vómitos son variables en la EIP. En las mujeres con salpingitis, también puede producir una perihepatitis llamada síndrome de Fitz-Hugh-Curtis, caracterizado por la propagación directa de los microorganismos desde las trompas de Falopio hasta el hígado y el peritoneo, que provoca dolor en el hipocondrio derecho y el hallazgo laparoscópico de adherencias entre el hígado y la pared abdominal anterior.^{614,637} La aparición de EIP está influida por diversos factores, entre ellos el diagnóstico y tratamiento de otras infecciones genitales (p. ej., infección por *C. trachomatis*, vaginosis bacteriana), EIP anterior; el uso de anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, duchas vaginales; las características de las cepas infectantes y el estado inmunitario del huésped. La obstrucción de las trompas de Falopio, que conduce a la esterilidad, sucede en el 10-20% de las mujeres después de un episodio único de EIP gonocócica aguda y en el 50-80% de aquellas con tres episodios o más. Entre las mujeres con embarazos ectópicos, más del 80% tiene antecedentes de EIP.²⁰² En las mujeres embarazadas, la infección gonocócica está asociada con un aumento del riesgo de complicaciones, como parto prematuro, rotura prematura de membranas fetales, aborto espontáneo y mortalidad infantil. Las complicaciones debidas a las infecciones gonocócicas son menos comunes después del primer trimestre de embarazo.

N. gonorrhoeae también puede causar infecciones anorrectales y faríngeas. La infección gonocócica orofaríngea se observa en varones homosexuales y bisexuales y en mujeres heterosexuales, que adquieren la infección por contacto sexual orogenital con una pareja infectada. La gonorrea faríngea también se observa en ocasiones en varones heterosexuales, como resultado de la práctica de sexo oral con una pareja infectada. Más del 90% de las infecciones gonocócicas orofaríngeas son asintomáticas y se diagnostican mediante el cultivo del microorganismo de la garganta.⁴⁸ Las infecciones anorrectales suce-

den en varones homosexuales y bisexuales que practican relaciones sexuales anales receptivas sin protección. Las mujeres también adquieren infecciones rectales por coito anal receptivo, pero la mayoría de las infecciones rectales en las mujeres se deben a contaminación perianal con secreciones cervicovaginales infectadas. Las infecciones gonocócicas rectales son a menudo asintomáticas, pero algunos individuos pueden experimentar proctitis aguda con dolor anorrectal moderado y prurito, secreción mucopurulenta, sangrado, tenesmo y estreñimiento 5 a 7 días después de la infección.⁵⁴⁷ El examen anoscópico del canal anal por lo general revela una mucosa rectal edematosa y eritematosa y secreción purulenta en las criptas anales.⁷¹⁵ La infección por *Chlamydia*, la infección por el virus del herpes simple y otras infecciones de transmisión sexual están incluidas en el diagnóstico diferencial de la infección gonocócica anorrectal.

En un pequeño porcentaje (un 0,5-3%) de individuos infectados, los gonococos pueden invadir el torrente circulatorio y provocar una infección gonocócica diseminada (IGD).^{433,552} Esta infección se caracteriza por fiebre poco elevada (rara vez por encima de 39 °C), lesiones cutáneas hemorrágicas, tenosinovitis, poliartralgias migratorias y artritis franca. Las mujeres parecen tener un riesgo mayor para la IGD, en particular durante la menstruación y durante el segundo y el tercer trimestre del embarazo. Las lesiones cutáneas suelen ser dolorosas y aparecen como una pápula que evoluciona hacia una pústula necrótica sobre una base eritematosa (fig. 11-3). Por lo común, se presentan unas pocas como 5 o más de 30 lesiones y la mayoría de ellas están en las extremidades (dedos de los pies y de las manos).⁴³³ (Véase lámina en color 11-1B). Los cultivos de las lesiones cutáneas y de los líquidos sinoviales de los pacientes con IGD pueden ser negativos, lo que sugiere que los procesos inmunes (p. ej., el depósito de complejos antígeno-anticuerpo) contribuyen a la patogenia de la IGD. A veces aparecen erupciones petequiales, papulares o maculares extendidas. Mastrolonardo y cols. informaron una IGD en una mujer de 24 años que consultó por lesiones vesiculares, hemorrágicas y necróticas extensas en las nalgas y los miembros inferiores.⁴²² En el 30-40% de los casos, los microorganismos del torrente circulatorio pueden localizarse en una articulación o más y causar una artritis gonocócica destructiva y purulenta.¹⁷⁰ El compromiso de la articulación es casi siempre asimétrico e involucra las articulaciones de la rodilla, el codo, la muñeca, los dedos de la mano y el tobillo.⁷²⁰ Rara vez están comprometidas otras articulaciones.³⁸¹ El líquido sinovial infectado contiene entre 50.000 y 200.000 células/mm³, el 90% de ellas, neutrófilos polimorfonucleares.^{170,235} La tinción de Gram y el cultivo de los aspirados de la articulación son positivos sólo en el 10-30% de los casos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se aplicó para la detección de gonococos en el líquido sinovial.^{392,459}

Las complicaciones de la IGD son daño articular permanente, endocarditis y rara vez, meningitis.^{530,706} La endocarditis gonocócica es una entidad clínica rara, con menos de 60 casos informados en la literatura desde 1938. Puede desarrollarse en alrededor del 1-2% de los pacientes con infección diseminada, suele comprometer la válvula aórtica y sigue un curso destructivo y rápido.⁷⁰⁶ En 1996, Thompson y Brantley informaron un caso de endocarditis gonocócica en un varón de 23 años que necesitó el empleo de prótesis valvular como resultado de una insuficiencia aórtica grave y prolapso de las valvas aórticas.⁶⁵² En 1997, se diagnosticó el primer caso de endocarditis gonocócica asociada con lupus eritematoso sistémico en una mujer de 24 años con síntomas inespecíficos de tos, dolor de pecho,



Figura 11-3 Lesión cutánea característica de infección gonocócica diseminada en un dedo de la mano. Estas lesiones suelen ubicarse en las extremidades.

fiebre y malestar sin signos ni síntomas de IGD.⁶⁵⁵ Los electrocardiogramas transesofágicos y transtorácicos mostraron una gran vegetación en la válvula pulmonar y los hemocultivos fueron positivos para *N. gonorrhoeae*. La pericarditis y los derrames pericárdicos también son complicaciones de la IGD y el síndrome de dificultad respiratoria del adulto se informó en asociación con bacteriemia gonocócica.^{56,159,717} La meningitis gonocócica es una complicación rara de la infección diseminada que tiene los rasgos típicos de la meningitis causada por otros microorganismos.⁵³⁰ Dentro de las entidades clínicas que se asemejan a la IGD están el síndrome de Reiter, la artritis inducida por cristales y piógena, la artritis sifilítica y tuberculosa, la artritis reumatoide, la enfermedad de Lyme y la fiebre reumática.⁵⁵² Se han observado ataques repetidos de IGD en individuos con ciertas deficiencias del complemento.^{211,552} La enfermedad diseminada puede aparecer después de la infección en sitios genitales o extragenitales. Los estudios de cepas recuperadas de casos de IGD han mostrado que esas cepas más invasivas tienen características atípicas, como requerimientos nutricionales especiales (p. ej., requerimientos de arginina, hipoxantina y uracilo para crecer [variedades AHU]), categorización definida de serovariedad Por IA, resistencia a la acción bactericida del suero humano normal y sensibilidad extrema a la penicilina.^{207,356,453,585} Con la declinación en la prevalencia de la serovariedad Por IA/AHU en los últimos años, el incremento del número de IGD se ha asociado con otras clases de auxotipo/serovariedad.^{102,645}

En los últimos años han aparecido en la literatura médica informes de presentaciones o infecciones gonocócicas inusuales. Las infecciones gonocócicas oculares, vistas por primera vez en recién nacidos que adquirirían el microorganismo durante el pasaje por el canal de parto infectado (oftalmía neonatal), se han informado en adultos que se infectan mediante secreciones genitales.⁷⁰⁴ El personal de laboratorio que trabaja con cultivos también puede infectarse accidentalmente si no toma

los recaudos para protegerse los ojos.⁴¹⁰ La infección ocular causa celulitis periorbital, secreción purulenta profusa, inyección conjuntival, edema y eritema de los párpados, y queratitis de la estroma y epitelial. Los tratamientos inadecuados de las infecciones oculares pueden conducir a queratitis ulcerativa, perforación de la córnea y ceguera.⁷⁰⁴ Se han publicado informes de infección gonocócica cutánea primaria, resultante de la inoculación de una lesión preexistente, que incluye un caso de mastitis gonocócica en un varón.^{74,592} Se han comunicado abscesos gonocócicos en el cuero cabelludo de recién nacidos como una complicación de la monitorización fetal intrauterina.⁴⁰ Se pueden observar presentaciones atípicas y cursos clínicos en pacientes con enfermedades subyacentes, como la infección por HIV. Jacoby y Mady describieron un caso de sepsis gonocócica aguda en una mujer de 35 años HIV-positiva que incluyó acidosis e hipotensión profundas, hallazgos que no suelen observarse en pacientes con IGD.³¹⁶ Risher y McFadden comunicaron un caso de un aneurisma micótico de la aorta ascendente por *N. gonorrhoeae* en una mujer de 38 años con lupus eritematoso sistémico que necesitó terapia antimicrobiana prolongada con resección quirúrgica de las válvulas afectadas.⁵⁴⁰ Strongin y cols. informaron sobre un varón homosexual de 27 años HIV-positivo con artritis gonocócica de la cadera y de una sola articulación esternoclavicular.⁶³⁰ Brook y cols. describieron un "minibrote" de *N. gonorrhoeae* invasor de tejidos entre dos contactos sexuales masculinos y tres femeninos que derivó en infección asintomática en uno de los hombres, EIP en una de las mujeres, IGD en otra mujer y linfadenopatía inguinal en dos de los pacientes.⁹⁵ En 1994, Bodsworth y cols. comunicaron el primer caso de infección gonocócica de la "neovagina" de un transexual masculino a femenino.⁷¹ Por último, Burnett y cols. informaron un caso muy poco común de infección gonocócica de una derivación ventriculoperitoneal en una mujer de 17 años.¹⁰³ Los autores propusieron que el extremo peritoneal de la derivación, que producía el mayor crecimiento del microorganismo, pudo haberse contaminado con gonococos durante la menstruación, cuando la sangre podía refluir a través de las trompas de Falopio y entrar en la cavidad peritoneal.

Históricamente, las infecciones gonocócicas en los niños sólo incluían la oftalmía neonatal, que es la gonorrea ocular transmitida al recién nacido durante el pasaje a través del cuello uterino.³⁸⁹ Casi todos los casos de gonorrea en niños durante el período neonatal son el resultado de la contaminación ocular, aunque se han informado infecciones más graves por gonococos en recién nacidos.²¹⁴ La transmisión de la gonorrea desde los adultos hacia los niños por fómites (p. ej., toallas compartidas) se propuso como un modelo de transmisión en los niños mayores. Sin embargo, ahora se reconoce que las infecciones gonocócicas, incluidas la conjuntivitis y otras enfermedades de transmisión sexual en los niños más allá del período neonatal inmediato, son indicadores de abuso sexual.^{30,54,153,544} Con un acercamiento multidisciplinario cuidadoso es posible obtener historias de contactos sexuales de los niños mayores. Cuando se identifica a un niño con gonorrea, la investigación de ambos adultos tutores y de otros hermanos suele revelar la infección en adultos y otros niños.¹⁸ Las infecciones gonocócicas infantiles se asemejan a las de los adultos, pero con algunas diferencias notables. *N. gonorrhoeae* causa vaginitis, más que cervicitis, en las niñas prepúberes. El epitelio de la vagina prepúberal está compuesto por células epiteliales cilíndricas, el tipo de células que *N. gonorrhoeae* infecta de preferencia. Con la aparición de la pubertad, estas células se reemplazan por un epitelio pavimentoso estratificado que no es vulnerable a la

infección gonocócica. Las niñas con infección gonocócica genital suelen tener secreción vaginal. La infección uretral en los niños varones, si se presenta, se asemeja a la observada en los adultos. Las infecciones gonocócicas faríngeas y rectales, como en los adultos, son por lo común asintomáticas en los niños.

Neisseria meningitidis

EPIDEMIOLOGÍA

N. meningitidis es un patógeno primario que causa un conjunto de procesos infecciosos, que van desde la sepsis oculta con rápida recuperación hasta la enfermedad mortal fulminante.³³ En ciertos pacientes sólo se manifiestan algunos aspectos de este espectro clínico, mientras que en otros puede progresar a través del espectro con alarmante rapidez. Un factor de virulencia importante de todos los aislamientos de *N. meningitidis* asociados con enfermedad es la cápsula de polisacáridos. Se han reconocido 13 serogrupos de polisacáridos capsulares meningocócicos (A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, W135 y 29E); la mayoría de las infecciones son causadas por microorganismos pertenecientes a los serogrupos A, B, C, Y y W135. Un porcentaje variable de cepas aisladas en portadores nasofaríngeos no pueden expresar un antígeno polisacárido capsular detectable (no agrupable). Por ejemplo, en un estudio reciente de transmisión meningocócica entre estudiantes universitarios en el Reino Unido, 43,9% de las 904 cepas aisladas en portadores fueron serológicamente no agrupables.¹⁶ Las cepas meningocócicas pueden estar subdivididas en 20 serotipos adicionales basados en los antígenos de clase 2 y 3 OMP (PorB), 10 serotipos basados en los antígenos de clase 1 OMP (PorA) y 13 inmunitipos basados en la estructura del lipooligosacárido (LOS) (véase recuadro 11-3). Aunque estos métodos serológicos son útiles para determinar el parentesco de las cepas en forma local y para definir el entorno clínico, ninguno de ellos permite discriminar y definir el parentesco genético de variedades meningocócicas para propósitos epidemiológicos globales. A causa de la elevada frecuencia de variación antigénica en las proteínas de la membrana externa y al fenómeno de "cambio capsular", se han creado otros métodos para definir, identificar y rastrear genéticamente las cepas de *N. meningitidis* patógenas en forma global.⁶³⁶ Técnicas como la tipificación multilocal por electroforesis de isoenzimas (tipificación ET) y la tipificación multilocal de secuencias han ayudado a científicos y epidemiólogos a identificar un número de grupos clonales definidos desde el punto de vista genético que causan tanto la enfermedad endémica y esporádica, como la epidémica.^{129,597} Estos **grupos ET** pueden, además, dividirse en **subgrupos clonales**. Por ejemplo, entre más de 500 cepas del serogrupo A epidémicas coleccionadas en África desde la década de 1960, se han reconocido 84 tipos electroforéticos (ET) que son divisibles en nueve subgrupos. Tres de esos subgrupos han sido responsables de todas las epidemias importantes ocurridas en la región.^{278,427} Complejos ET individuales incluirán cepas que llevan antígenos de serogrupos diferentes. Por ejemplo, mientras el complejo ET-37 incluye la mayoría de las cepas del serogrupo C y el complejo ET-5 contiene la mayoría de las cepas del serogrupo B, ambos complejos también abarcan otros serogrupos. Se describieron, además, métodos moleculares para la tipificación epidemiológica meningocócica. Por ejemplo, la secuenciación del gen del antígeno de serogrupo meningocócico por PCR del gen sialiltransferasa puede usarse para confirmar los métodos de agrupamiento serológico y determinar el agrupamiento genético de cepas "no agrupables" desde el punto de vista serológico que con-

tienen genes capsulares "inactivos".^{81,222} Otros métodos de genética molecular (p. ej., huellas de DNA, análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, electroforesis en gel de campo pulsado, ribotipificación, análisis de PCR basados en elementos repetitivos, PCR amplificada al azar, secuenciación del gen *porA*, y análisis de la endonucleasa del amplicón por PCR) también se han creado para controlar la epidemiología de las cepas patogénicas de *N. meningitidis* en el mundo.^{52,276,277,347,368,495,535,629,658,723,726}

El análisis clonal de *N. meningitidis* reveló muchas características interesantes relacionadas con la virulencia y la enfermedad. Los clones virulentos se distinguen por sus velocidades de transmisión elevadas y por causar altas tasas de enfermedad por introducción en una población predispuesta. Se encuentran clones avirulentos en portadores asintomáticos y rara vez causan enfermedad, incluso cuando se transmiten con una velocidad similar a la de los clones virulentos.⁶⁷¹ La presencia de clones virulentos acoplados con altas tasas de transmisión, una población sensible, ciertos factores del huésped (p. ej., tabaquismo, inmunidad de las mucosas, coinfecciones virales, deficiencias del complemento adquiridas o congénitas) y factores de la conducta y del medioambiente (hacinamiento, contactos cercanos, exposición al humo del cigarrillo) conducen a tasas elevadas de transmisión y a menudo a la aparición explosiva de la enfermedad.^{126,227,733} Finalmente, los grupos clonales virulentos circulantes sufren diversificación genética mediante transformación y varias presiones medioambientales selectivas; estos clones pueden desaparecer o resurgir más tarde.¹²⁶

Varios clones patogénicos mundiales de *N. meningitidis* compuestos por diferentes serogrupos, serotipos, subserotipos e inmunotipos causan tanto la enfermedad endémica como la epidémica.¹²⁶ La enfermedad meningocócica endémica sucede en tasas de 1 a 3 casos por 100 000 personas en los Estados Unidos y de 10 a 25 casos por 100 000 personas en los países en vías de desarrollo.⁶⁸⁰ En los últimos años, la incidencia anual de enfermedad meningocócica en los Estados Unidos ha sido de 0,8 a 1 por 100 000 habitantes; los recién nacidos, los ancianos y los inmunodeprimidos tienen el mayor riesgo.³¹⁵ Las tasas de ataque son las más altas entre los niños de 3 meses a 1 año de edad y entre adolescentes mayores y adultos jóvenes. En ciertas regiones de África subsahariana denominadas el "cinturón de la meningitis", la enfermedad meningocócica causada en principio por las cepas del serogrupo A ocurre todo el año, con incidencias de hasta 1 000 casos por 100 000 habitantes.^{278,534} Desde fines de la década de 1960, se diseminaron varios clones de *N. meningitidis* del serogrupo A por China, India y Medio Oriente, que culminaron en un gran brote de enfermedad debido a una cepa del serogrupo A subgrupo III-1 entre musulmanes que hacían la peregrinación anual a la Meca (Hajj) en 1987.^{451,478,534} Durante el año siguiente y hasta fines de 1996, este mismo clon se diseminó y causó epidemias en Sudán, Uganda, Kenya, Etiopía, Arabia Saudita, Chad, Nigeria, Nepal y Sudáfrica.^{273,427,449,451,506} Las cepas del serogrupo B pertenecientes al complejo ET-5 han causado brotes esporádicos en Inglaterra, Dinamarca, Noruega y los Países Bajos desde mediados de 1970 y se han documentado cepas similares en todo el Lejano Oriente (p. ej., China, Japón, Tailandia), Sudamérica (p. ej., Brasil, Chile), el Caribe (p. ej., Cuba), Canadá y los Estados Unidos (p. ej., Oregón).^{38,39,127,133,571,572,583,584,606} Las cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B pertenecientes a otros tipos clonales (ET-24 y ET-25) también surgieron en Europa durante la década de 1980 y se diseminaron a Finlandia, Noruega e Islandia durante la década siguiente, con brotes en el Reino Unido y Bélgica.⁶⁹⁰

Ciertos clones, como el complejo ET-37, han sido la causa de brotes esporádicos en Brasil, China, Sudáfrica y los Estados Unidos.¹²⁶ El complejo ET-37 incluye cepas que expresan los serogrupos B, C, Y y W-135. Durante la década de 1980, las cepas del serogrupo B perteneciente a este complejo fueron reconocidas en China y en Sudáfrica, mientras que las del serogrupo C se aislaron en otras regiones de África y Europa.¹²⁶ A fines de la década de 1980 y durante la de 1990, las cepas del serogrupo C dentro del complejo ET-37 se establecieron en los Estados Unidos, Canadá y otros países. Estas cepas causaron un grupo de enfermedades esporádicas en Iowa, Illinois, Los Ángeles, Ontario y Saskatchewan, Canadá, y también se han aislado en el Reino Unido, Italia, Dinamarca y Brasil.^{1,39,205,313,421,536,548,559,629} Al mismo tiempo, apareció un complejo variante de ET-37, llamado complejo ET-15, y a principios de 1990 emergieron las cepas del grupo C dentro de este complejo variante como la causa principal de las enfermedades esporádicas en los Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Australia y Europa Oriental.^{39,290,313,536} En los Estados Unidos, estas cepas estaban asociadas con brotes en escuelas e institutos correccionales.^{98,642,735} También durante la primera mitad de la década de 1990, aparecieron cepas de *N. meningitidis* del serogrupo Y en los Estados Unidos y ciertos clones complejos (p. ej., ET-508 y otros) que llevan este antígeno de serogrupo ahora son la causa de casi el 30% de las enfermedades meningocócicas endémicas en ese país. En Chicago, la prevalencia de cepas del serogrupo Y aumentó de 6% en 1991 a 71% en 1995.⁵¹⁹ El equilibrio de la enfermedad en los Estados Unidos está causado por las cepas ET-37 y ET-15 del serogrupo C, las del complejo ET-5 del serogrupo B y las del serogrupo W-135.^{126,519,657}

En el nuevo milenio, los brotes meningocócicos continúan afectando los países en vías de desarrollo y los patrones de enfermedad en los Estados Unidos reflejan cambios significativos en la epidemiología meningocócica doméstica. Por primera vez, se aislaron las cepas del serogrupo W-135 patógenas de más de 300 musulmanes que concurren al Hajj del año 2000, que concluyó en marzo de 2000.^{137,572} Un examen de cuatro aislamientos en peregrinos que volvían a los Estados Unidos encontró que esos meningococos pertenecían a ET-927, un grupo muy relacionado desde el punto de vista genético con el complejo ET-37.⁵¹³ Estas cepas se demostraron, además, en cuatro pacientes franceses con vínculos epidemiológicos con el Hajj del año 2000.⁵⁷² Estas cepas también mostraron patrones similares en la electroforesis en gel de campo pulsado y distintos de otras cepas del serogrupo W-135.⁵¹³ En los Estados Unidos, los cambios en la epidemiología meningocócica durante la década de 1990 incluyeron un aumento de la incidencia de infecciones con serogrupos C adquiridas en la comunidad, y un aumento de la enfermedad entre adolescentes y adultos jóvenes tanto durante la escuela secundaria como en la universidad.^{135,288,550,735} Algunos brotes han ocurrido en ciudades universitarias y se han asociado con la concurrencia a bares y discos, el consumo de alcohol y cigarrillos y la residencia en albergues estudiantiles.^{165,310,311} Un estudio reciente en colaboración documentó que los estudiantes estadounidenses de primer año de la universidad que residían en albergues universitarios tenían una tasa de incidencia anual de enfermedad meningocócica de 5,4 por 100 000, que es cinco veces la tasa nacional y sólo la supera en incidencia la del grupo etario de niños menores de 2 años.⁹⁹ Se han observado numerosos casos en estudiantes que no eran del primer año y en los que vivían fuera de las instalaciones universitarias.^{287,288} Las razones para el aumento de la incidencia de enfermedad grupo C entre adolescentes y

residentes de albergues estudiantiles universitarios en particular, no se conocen. En respuesta a estos cambios en los patrones de incidencia y a la capacidad de evitar la enfermedad grave del serogrupo C con vacunas disponibles en la actualidad, el Advisory Committee on Immunization Practices (Comité Consultivo en Prácticas de Inmunización) de los Estados Unidos ha recomendado que se brinden inmunizaciones meningocócicas en el ingreso a la universidad a los estudiantes que viven en residencias universitarias, mientras que otros aconsejan hacer accesible la vacunación meningocócica a todos los estudiantes universitarios aún no graduados.^{134,136,243,287,288}

INFECCIONES CAUSADAS POR *N. MENINGITIDIS*

N. meningitidis puede ser portada de modo asintomático en la orofaringe y la nasofaringe por un porcentaje variable de individuos y la tasa de portación está relacionada con varios factores, como edad, clase socioeconómica y presencia de enfermedad real en la comunidad.¹²¹ La portación de meningococos en la nasofaringe puede ser transitoria, intermitente o persistente.¹⁶ En general, las tasas de portación tienden a ser casi del 8-20%; los niños mayores y los adultos jóvenes tienen tasas más altas (20-40%) que los niños pequeños.^{128,481} La duración del estado de portador también puede variar con el individuo y con el serogrupo de la cepa colonizante. Durante los períodos en que la enfermedad está presente en la comunidad, las tasas de portación pueden no ser diferentes de las observadas cuando se están informando enfermedades no clínicas, pero se ha notado que la proporción de individuos que portan las variedades más virulentas aumenta.³³ Al contrario de lo que se ha afirmado durante años, la tasa de portación meningocócica no parece ser estacional, aunque la mayor parte de las enfermedades meningocócicas en los países en vías de desarrollo tiende a ocurrir durante el invierno tardío o principios de la primavera. Las condiciones de vida en hacinamiento facilitan la diseminación respiratoria de los meningococos y afecta tanto la transmisión del microorganismo como la ocurrencia de la enfermedad evidente, lo cual ha sido ampliamente demostrado por los grandes brotes ocurridos en las bases militares durante años, donde gran cantidad de adultos jóvenes susceptibles viven juntos en cuarteles cerrados por períodos prolongados. Entre tales poblaciones cerradas, las tasas de portación se pueden aproximar al 100%. Las cepas portadas pueden ser encapsuladas (agrupables) o no encapsuladas (no agrupables) y derivan en la formación de anticuerpos específicos de serogrupo y anticuerpos de amplia reacción cruzada contra varios antígenos de la membrana externa. Incluso individuos que están colonizados con cepas no agrupables desarrollan altos títulos de anticuerpos contra cepas agrupables, debido tal vez a la presencia de determinantes antigénicos compartidos. En un estudio de 38 individuos que portaban cepas no agrupables en la nasofaringe, 2-52% de los varones desarrollaron anticuerpos específicos de grupo, según el serogrupo analizado.⁵²⁵ En la mayoría de los huéspedes, la colonización meningocócica de las vías respiratorias altas deriva en la formación de anticuerpos bactericidas del suero específicos de serogrupo dentro de los 7 a 10 días.³³ Esta respuesta no elimina el estado de portador, pero puede proteger al huésped de la enfermedad sintomática.

En algunos individuos, la variedad meningocócica que se establece en las vías respiratorias altas progresa para entrar en el torrente circulatorio e iniciar una enfermedad sistémica. Parece que la enfermedad invasiva de *N. meningitidis* sucede en personas que están recién infectadas con una cepa contra la cual el individuo carece de anticuerpos específicos de serogru-

po meningocócicos bactericidas. En un estudio entre personal militar, Edwards y cols. encontraron que el 86% de los 31 pacientes tenían cultivos negativos de nasofaringe durante las dos semanas anteriores al comienzo de la enfermedad y que cuatro pacientes tuvieron cultivos negativos el día anterior al inicio de la enfermedad.²⁰⁶ Sin embargo, en un informe reciente, se documentó un intervalo de 7 semanas ocurrido entre el contagio nasofaríngeo del microorganismo y el inicio de la enfermedad meníngea.⁴⁷¹ La infección viral o micoplásmica simultánea de las vías respiratorias altas también puede facilitar la invasión sistémica por el microorganismo porque tanto los brotes esporádicos como los epidémicos de enfermedad meningocócica han sido asociados con brotes de infecciones respiratorias por virus y micoplasmas.⁴⁵⁰ El riesgo de enfermedad meningocócica también es mayor en los portadores con deficiencias de los componentes finales del complemento (p. ej., C5, C6, C7, C8 y C9) o en el sistema de la properdina.^{228,229,605} Otras afecciones subyacentes, como falla hepática, lupus eritematoso sistémico, mieloma múltiple y asplenia pueden predisponer también a enfermedad meningocócica grave.³³

La patogenia de la enfermedad meningocócica no se conoce bien y, aunque se ha informado mucho acerca de la epidemiología descriptiva del microorganismo y sus estados de enfermedad, se sabe muy poco acerca de la dinámica de la producción de la enfermedad.^{439,671} Los seres humanos son el único huésped natural para *N. meningitidis* y el microorganismo se disemina por las gotitas del aparato respiratorio. Los meningococos colonizan la mucosa respiratoria superior y pueden luego invadir el torrente circulatorio. La fijación inicial a la mucosa nasofaríngea está mediada aparentemente por la interacción de los pili con la proteína cofactor de membrana (CD46).³³⁶ La variación antigénica a nivel del pilus regula la elusión de factores del huésped no específicos durante la adherencia inicial a la mucosa epitelial.⁴⁶⁷ Los factores medioambientales, como el hábito de fumar, y las infecciones virales concurrentes de las vías respiratorias altas aumentan el riesgo de colonización debido a alteraciones en la mucosa o a la anulación de la inmunidad local.^{450,619} Luego, las proteínas de la membrana externa (OMP) de clase 5 se unen al receptor C46 y las proteínas Opa se unen a los receptores de proteoglicano heparansulfato sobre las células endoteliales y fagocíticas, respectivamente.⁴³⁹ Esto estimula la liberación de citocinas por estas células, con la endocitosis ulterior de los microorganismos por las células epiteliales.^{624,671} Más tarde, las proteínas PorB se insertan en la membrana del fagosoma e impiden la fusión con los lisosomas.⁴³⁹ Así, los meningococos pueden evitar los mecanismos inmunitarios humorales y sobrevivir en los leucocitos mononucleares en el subepitelio.⁵²² El principal factor de virulencia meningocócica asociado con la invasión del torrente circulatorio es la cápsula de polisacáridos. En ausencia de anticuerpos opsonizantes, la cápsula impide la fagocitosis de los microorganismos y protege también contra la bacteriólisis mediada por complemento. Además, ciertas clases de OMP de clase 1 de *N. meningitidis* pueden reducir la expresión de varios receptores de complemento en los neutrófilos, con lo cual se inhibe la ingestión de los microorganismos.⁶⁶ La invasión del torrente circulatorio por los meningococos también se correlaciona con la liberación sistémica de diversas citocinas inflamatorias (p. ej., interleucina-1, interleucina-6, factor de necrosis tumoral α) que contribuyen a la patogenia de la meningococemia y del shock séptico meningocócico.^{93,94,680,699} Algunas de estas citocinas pueden aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permitir la entrada de los meningococos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Además, la invasión meningocócica

de las células endoteliales con edema resultante e inducción de apoptosis puede liberar microorganismos hacia el interior del LCR y de otros espacios cerrados.

Los meningococos pueden causar meningitis endémica y epidémica, y los serogrupos A, B y C provocan el 90% de los casos mundiales. En la actualidad, *N. meningitidis* es la segunda causa importante de meningitis adquirida en la comunidad en los Estados Unidos.^{120,204} La manifestación clínica más grave de la enfermedad meningocócica es la meningitis acompañada por sepsis meningocócica aguda. Las presentaciones clínicas de la enfermedad pueden ser bastante variadas e incluyen meningoencefalitis, meningitis con meningococemia o sin ella, meningococemia sin meningitis y bacteriemia sin complicaciones sépticas.^{33,120,340,570} El inicio de la meningitis meningocócica aguda es repentino, con fiebre y escalofríos, mialgias y artralgias.¹²⁰ Los signos clásicos de meningitis, como confusión, cefalea, fiebre y rigidez de la nuca, se pueden observar en casi la mitad de los pacientes.³³ Los vómitos también pueden ser una parte de la presentación clínica, en particular en los niños. La meningococemia y la diseminación de los microorganismos se anuncian por la aparición rápida de exantema que se observa en alrededor del 50-60% de los pacientes, y que comienza como una erupción macopapular rosada que luego se vuelve petequial. Al principio, las petequias aparecen en las mucosas (p. ej., la conjuntiva) y luego se extienden hacia el tronco y los miembros inferiores. Estas lesiones son indicadores de complicaciones hemorrágicas y coagulopatías causadas por el microorganismo. La enfermedad rápidamente progresiva fulminante puede derivar en la formación de máculas y pápulas que progresan para formar áreas purpúreas o equimóticas con hemorragia y necrosis cutánea.⁵⁷⁰ La **púrpura fulminante** se desarrolla en cerca del 10% de los pacientes con meningococemia y causa áreas extensas de destrucción tisular secundaria a la coagulopatía; el control intensivo de los parámetros de la coagulación y el reemplazo de los factores de la coagulación pueden beneficiar a algunos pacientes.⁵¹⁶ El compromiso neurológico difuso, más que los signos y los síntomas focales, y el compromiso miocárdico se observan con más frecuencia en la meningitis meningocócica que en otros tipos de meningitis bacterianas. Las anomalías cardíacas, incluida la pericarditis purulenta con taponamiento, son complicaciones de la enfermedad meningocócica que suelen aparecer durante la convalecencia.³⁰⁶ El informe de un caso de sepsis por un meningococo del grupo B desencadenó un infarto agudo de miocardio en un hombre de 42 años con arterias coronarias sanas.²³⁰

El shock meningocócico fulminante a menudo domina el cuadro clínico de meningitis meningocócica y sepsis meningocócica aguda.³³ El paciente se vuelve insensible, con ausencia de reflejos tendinosos superficiales y profundos y sensorio deprimido. Debido a la vasoconstricción periférica, se pueden notar cambios gangrenosos en las extremidades. La presencia de shock, bajo recuento de leucocitos, exantema y estado mental alterado se asocian con mala evolución.⁶⁴⁹ La mortalidad del shock séptico meningocócico también está asociada con niveles bajos de sodio sérico y un exceso de bases negativo, lo que refleja anomalías metabólicas generalizadas, y los niveles bajos de plaquetas y de proteína C reactiva están asociados con la duración de las petequias y la púrpura y pronostican coagulación intravascular diseminada (CID) inminente.³⁶⁶ La muerte puede sobrevenir como resultado de la CID. En estos casos, la necropsia revela miocarditis terminal o lesiones de la CID, con microtrombos y trombosis en muchos órganos. Se ha documentado una necrosis avascular del hueso debida a trombosis en los vasos sanguíneos intraóseos secundaria a la CID en

casos de enfermedad meningocócica grave.¹⁰⁸ El hallazgo clásico de necrosis hemorrágica aguda de las glándulas suprarrenales representa el rasgo característico del síndrome de Waterhouse-Friederichsen.⁹ A pesar de contar con excelentes agentes terapéuticos, la meningitis con sepsis causada por *N. meningitidis* todavía puede tener una mortalidad superior al 30%. Casi el 10% de los sobrevivientes de la infección tendrán sordera sensorioneural.⁴²⁵

N. meningitidis también puede causar infección en el torrente circulatorio (meningococemia) sin meningitis.³³ Los pacientes con bacteriemia meningocócica sin sepsis, por lo común presentan fiebre, cefalea, malestar general y leucocitosis periférica. También puede haber síntomas de infección respiratoria, pero no síntomas y signos meníngeos. Se aíslan meningococos en los hemocultivos, pero el paciente está clínicamente bien en ese momento, y no se administra ningún tipo de terapia. En los casos de meningococemia crónica el paciente está casi siempre sintomático, con fiebre escasa, exantema y, a veces, artritis. Esta presentación clínica es muy similar al síndrome de dermatitis-artritis gonocócica. También se describieron manifestaciones cutáneas menos comunes, como eritema nudoso, en asociación con meningococemia crónica.⁷¹³ Esta forma de enfermedad meningocócica, con meningitis o sin ella, se repite en algunos pacientes, quienes con frecuencia han heredado deficiencias subyacentes de C3, properdina, C5, C8 y otros componentes tardíos del complemento.^{146,228,229} Los individuos con afecciones subyacentes asociadas con estados hipocomplementémicos, como lupus eritematoso sistémico, están expuestos a enfermedad meningocócica grave y se ha documentado meningococemia crónica en pacientes infectados por HIV.^{10,41,223} En un caso informado, la meningococemia sucedió como complicación de una endoscopia digestiva alta. El microorganismo probablemente fue introducido en el torrente circulatorio desde las vías respiratorias altas mediante una lesión provocada en la mucosa por el pasaje del endoscopio a través de la boca hacia el tubo digestivo.¹⁹ La sepsis por *N. meningitidis* también se ha comunicado como una complicación del parto prematuro en una mujer de 19 años, aunque no se realizaron los estudios complementarios.⁴⁷⁴

N. meningitidis también puede causar otras infecciones, algunas de las cuales resultan por diseminación hemática. Esta diseminación puede infectar otros órganos y llevar a complicaciones como osteomielitis, artritis, celulitis, pericarditis, endoftalmitis y peritonitis bacteriana espontánea.^{32,252,306,383,409} En ocasiones, *N. meningitidis* se aísla en sitios distantes del cuerpo sin evidencia clínica de meningitis, meningococemia u otro foco de infección meningocócica. Por ejemplo, Baevsky informó un caso de pericarditis meningocócica primaria con taponamiento en un varón de 18 años que se complicó por el desarrollo de CID y daño renal y hepático debido a hipotensión inducida por taponamiento cardíaco.⁴⁵ En otro caso informado, se aisló *N. meningitidis* del serogrupo B en el líquido articular aspirado de la rodilla de un niño de 13 años sano sin evidencia de infección meningocócica.¹⁷¹ Por último, *N. meningitidis* es uno de los microorganismos de una larga lista que han sido recuperados de pacientes con peritonitis y bacteriemia complicada por diálisis peritoneal ambulatoria continua.¹⁶²

La neumonía meningocócica es infrecuente, pero se presenta en principio como una neumonía adquirida en la comunidad indistinguible clínicamente de otras neumonías bacterianas agudas.^{33,718} La patogenia de la neumonía puede involucrar la diseminación hematológica o la aspiración seguida de invasión directa del parénquima pulmonar. Esta infección sucede en personas de mediana edad a mayores con enfermedades preexis-

tentes, entre ellas, infecciones virales del aparato respiratorio, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad arterial coronaria, diabetes, infección por HIV y lupus eritematoso sistémico.^{524,718} En un estudio de 68 reclutas militares con neumonía meningocócica probada por cultivos de aspirados transtraqueales, fueron hallazgos comunes fiebre, estertores e infiltrados lobulares.³⁶⁵ Los pacientes tuvieron una enfermedad moderada, pero no hubo casos mortales. En una revisión de más de 25 años de 58 casos de neumonía meningocócica adquirida en la comunidad se encontraron hemocultivos positivos en el 79,3% de los pacientes, aunque los síntomas y las secuelas asociadas con meningococemia no se desarrollaron en estos casos.⁷¹⁸ Los cultivos de esputo fueron positivos en 15 (83,3%) de los 18 casos en los que se recolectaron muestras de esputo, y 5 de los 58 pacientes murieron a causa de la infección. El diagnóstico de neumonía meningocócica se distorsiona por la presencia del microorganismo en la nasofaringe, que provoca la contaminación orofaríngea de las muestras de esputo. Además de la neumonía, se informó supraglotitis bacteriémica fulminante en asociación con infecciones meningocócicas de los serogrupos B, C e Y.^{424,472,588,604} Estas infecciones se caracterizan por angina, disfagia, tejidos supraglóticos inflamados y celulitis cervical. Cinco de seis pacientes descritos con esta afección requirieron intubación o traqueotomía de urgencia, lo que indica que la supraglotitis meningocócica es una infección fulminante potencialmente mortal.

La conjuntivitis meningocócica primaria se ha reconocido como una entidad clínica distinta.^{28,510} La mayoría de los casos suceden como parte de la infección sistémica con *N. meningitidis* y la enfermedad meningocócica sistémica asociada con infección conjuntival se presenta en el 10-18% de los pacientes.^{50,210} La conjuntivitis primaria causada por *N. meningitidis* se informó en recién nacidos, niños mayores y adultos. En dos tercios de los casos, la infección se limita a un solo ojo. En una revisión de 84 casos de conjuntivitis meningocócica primaria, 17,8% de ellos tuvieron enfermedad meningocócica sistémica (meningitis o meningococemia); entre estos pacientes, la mortalidad fue del 13,3%.⁵⁰ La infección sistémica sucede con más frecuencia en los enfermos que recibieron terapia antimicrobiana tópica en vez de sistémica; en efecto, el riesgo de enfermedad sistémica fue casi 20 veces mayor en los pacientes que recibieron terapia tópica que en los que recibieron terapia sistémica. Las complicaciones de la infección que estuvieron limitadas al ojo fueron úlceras de córnea, queratitis, hemorragia subconjuntival e iritis. En un informe de tres casos de conjuntivitis meningocócica primaria en el Reino Unido, se mencionó que un hermano menor del caso inicial sufrió meningitis meningocócica, por lo que los autores de esta comunicación recomendaron que siempre se encare la protección profiláctica de los contactos cercanos de casos de conjuntivitis meningocócica primaria.⁶¹⁸ Saperstein y cols. también informaron un caso de endoftalmitis meningocócica exógena, en el cual el microorganismo entró en el ojo a través de una fístula posterior a una cirugía de cataratas y no por diseminación hemática.⁵⁷⁵ Además de la infección del ojo, ya sea en forma primaria o secundaria, se ha informado el desarrollo de cataratas transitorias junto con la aparición de exantema y fiebre en asociación con enfermedad meningocócica.²⁸⁶ En 1998, García-Lechuz y cols. dieron a conocer el primer caso de conjuntivitis meningocócica primaria en un paciente infectado por HIV-1.²⁴⁷

N. meningitidis puede en ocasiones aislarse en la uretra masculina, el aparato genital femenino y el conducto anal. En esos sitios, puede causar infecciones clínicamente indistinguibles de las gonocócicas, como uretritis purulenta aguda, cervicitis, sal-

pingitis y proctitis.^{149,172,317,348,714} Se cree que las prácticas sexuales oroanales, anogenitales y orogenitales son responsables de la presencia de meningococos en esos sitios.^{291,317,716}

PROFILAXIS MENINGOCÓCICA Y VACUNAS MENINGOCÓCICAS

El riesgo de enfermedad meningocócica secundaria en los contactos cercanos de la casa de un caso primario de meningitis o meningococemia es 500-800 veces mayor que el de la población general.⁴³⁶ Por lo tanto, la norma de la práctica médica es proveer terapia antimicrobiana quimioprofiláctica para esos contactos lo antes posible después de la exposición. Los casos secundarios de enfermedad meningocócica entre los contactos cercanos de un caso inicial suelen suceder dentro de los 10 días de la exposición. La profilaxis administrada dos semanas o más después de la exposición no es eficaz para evitar los casos secundarios. Durante las décadas de 1940 y 1950, las sulfonamidas fueron eficaces para erradicar el estado de portador meningocócico y evitar la enfermedad. Sin embargo, durante los años sesenta se desarrolló la resistencia a las sulfonamidas en las cepas de *N. meningitidis*. De modo transitorio, altas dosis de penicilina eliminaron los meningococos de la nasofaringe, pero los microorganismos se restablecieron con rapidez al suspender el tratamiento. En la actualidad, se administran dosis orales de rifampicina (adultos, 600 mg cada 12 horas durante 2 días; niños de menos de un mes, 5 mg/kg durante dos días; niños mayores de un mes, 10 mg/kg durante dos días) para erradicar la portación, aunque este fármaco puede fracasar en la erradicación del microorganismo en el 10-20% de los portadores.⁴⁹⁶ Se ha notado un surgimiento rápido de resistencia a la rifampicina entre los meningococos, incluso durante el tiempo en que se administra. Se informó un caso de meningitis meningocócica causada por una cepa resistente a la rifampicina en un niño que la había recibido en forma profiláctica en el comienzo de la enfermedad.¹⁶⁶ La ciprofloxacina (adultos, 500 mg en una dosis única) y la ofloxacina (400 mg en una sola dosis) también se utilizaron con éxito para erradicar la portación meningocócica nasofaríngea, lo que se confirmó en todos los casos entre las 2 y las 5 semanas.^{249,256,517} La ceftriaxona, administrada como una única dosis intramuscular (niños, 125 mg; adultos, 250 mg) erradicará la portación meningocócica por casi dos semanas.^{590,600} La azitromicina (500 mg en dosis única) también se ha probado para erradicar el estado de portador meningocócico en adultos.²³² La profilaxis debería administrarse a los contactos convivientes de la casa y de los centros de atención y a cualquier persona expuesta de modo íntimo a las secreciones orales del paciente. Esto también puede incluir a los individuos que duermen o comen con frecuencia en la misma vivienda con el paciente del caso inicial. Lo último también incluye a los miembros del equipo médico que puedan haber realizado reanimación cardiopulmonar o intubación endotraqueal en ese paciente. Los contactos íntimos dentro de poblaciones cerradas, como dormitorios de estudiantes universitarios, barracas militares, salas de cuidados especiales prolongados, también deberían recibir profilaxis.

Dado que la virulencia de *N. meningitidis* está asociada con los polisacáridos capsulares específicos de grupo del microorganismo, ha sido posible la creación de vacunas contra la enfermedad meningocócica. Las vacunas de polisacáridos de los grupos A y C univalentes se han desarrollado como una vacuna cuativalente que incorpora material capsular de los grupos A, C, Y y W135. Estas vacunas pueden producir una respuesta inmunitaria en niños mayores y adultos. Sin embargo, las vacunas por lo general son poco inmunogénicas en los niños meno-

res de 2 a 3 años e inducen respuestas inmunitarias de corta duración en los niños mayores.^{262,344,384,498} Además, los títulos de anticuerpos producidos decaen con bastante rapidez con el tiempo.³⁴⁴ En los niños menores de 12 meses de edad que fueron vacunados con el polisacárido del grupo A, se mantuvo una respuesta detectable de anticuerpos sólo durante 12 meses, y en los niños inmunizados en edades de 12 a 17 meses, los títulos fueron detectables durante dos años. En un estudio reciente realizado en Montana, sólo el 18% de los niños de un año de edad, el 32% de los niños de 2 años y el 50-60% de los niños de 4 y 5 años producían títulos de anticuerpos bactericidas en respuesta a la vacuna de polisacárido del serogrupo C.⁴²⁰ Además, las vacunas de polisacárido del grupo C nativo pueden inducir hiposensibilidad (tolerancia) inmunitaria cuando se aplican dos dosis durante los primeros seis meses de vida.²⁶² En la actualidad, se recomienda la vacuna cuativalente para individuos de alto riesgo, como los que tienen deficiencias del complemento o asplenia, los que viajan hacia zonas que son altamente endémicas para enfermedad meningocócica, los reclutas militares y los que viven en áreas que padecen brotes. La vacuna también puede administrarse para controlar los brotes y para profilaxis de los contactos de la enfermedad y ahora se utiliza cada vez más en los estudiantes de primer año que viven en los albergues universitarios.¹³⁶ Los CDC también recomiendan la vacunación para el personal de laboratorio clínico, industrial y de investigación expuestos habitualmente a los meningococos que pueden diseminarse por aerosoles. Con los recientes informes de infecciones por *N. meningitidis* mortales en trabajadores del laboratorio clínico de un hospital que habían manipulado cultivos de meningococos de pacientes hospitalizados, los CDC están considerando recomendar la vacunación para los trabajadores de laboratorio con exposición ocupacional a *N. meningitidis*.^{21,141} En algunas instituciones, la vacuna cuativalente se ofrece a los empleados de laboratorio en forma voluntaria. A causa del bajo riesgo total para la infección en los Estados Unidos y del fracaso en proveer inmunidad duradera, no se recomienda su uso en los niños.

Con la disponibilidad de vacunas relativamente eficaz contra los serogrupos meningocócicos A, C, Y y W135, y la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b, el serogrupo B de *N. meningitidis* se ha convertido en la causa principal de meningitis bacteriana en el mundo. Las vacunas de polisacáridos preparadas de las cepas del grupo B son muy poco inmunogénicas, tanto para los niños como para los adultos. Esta falta de antigenicidad es el resultado de la semejanza del material capsular del grupo B con los antígenos encontrados en tejidos cerebrales humanos; la cápsula es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario, de modo que no hay respuesta inmunitaria contra el material capsular del microorganismo del grupo B.²³¹ La respuesta inmunitaria que se produce es transitoria y está compuesta predominantemente por IgM.¹⁵ Los esfuerzos para crear vacunas del grupo B se han centrado en los antígenos OMP del microorganismo. Las OMP de los meningococos del grupo B son inmunogénicas tanto en los niños como en los adultos, pero en un estudio doble ciego controlado con placebo se demostró que esta inmunidad es subóptima.²⁴¹ Para complicar los problemas, la inmunidad hacia las OMP del grupo B es específica de tipo más que específica de grupo, por lo tanto, cualquier posible vacuna tendría que incluir las OMP de varios serotipos y subserotipos del grupo B que producen la enfermedad. Otra propuesta es modificar la estructura del polisacárido capsular del serogrupo B mediante el reemplazo de los grupos *N*-acetilo del material de ácido siálico con grupos *N*-propionilos antes de la conjugación con la proteína. En ese sentido, se

ha creado una vacuna meningocócica del serogrupo B (NPr-GMBP-rPorB) que contiene un polisacárido modificado (polisacárido meningocócico del grupo B-ácido siálico *N*-propionilado [NPr-GMBP]) con una proteína transportadora de clase 3 recombinante (rPorB) altamente inmunogénica y segura para uso humano.²⁴⁴

Se han desarrollado pocas vacunas contra meningococos del serogrupo B y se han probado en partes del mundo con tasas elevadas de enfermedad endémica y epidémica.^{67,443,452} En un intento por controlar un brote epidémico del grupo B en gran parte de San Pablo, estado del Brasil, se administró una vacuna producida en Cuba a más de 2 millones de niños de 3 meses a 6 años de edad durante 1989 y 1990. Esta vacuna, llamada vacuna cubana BC, está compuesta por OMP del serogrupo purificadas, de peso molecular 65 a 95 kDa, carentes de LOS. El polisacárido del grupo C purificado también fue incluido para proporcionar protección contra los meningococos del grupo C y para ayudar a solubilizar las proteínas del grupo B. Como se informó con las primeras vacunas, la eficacia variaba según la edad a la que se las aplicaba. Entre los niños de 48 meses y mayores, el 74% tenía una respuesta inmunitaria protectora, mientras que sólo el 37% de los menores de 24 meses tenían una respuesta inmunitaria eficaz con la vacuna. En Noruega, se llevó a cabo un ensayo de eficacia de la vacuna del grupo B usando una vacuna que contenía el polisacárido del grupo B, antígenos proteicos de subserotipo (clase 1) y serotipo (clase 3), y antígenos de inmunotipo LOS.⁶⁷ Los receptores de la vacuna fueron 171 800 personas de 13 a 21 años de edad. La vacuna tuvo sólo el 57,2% de eficacia para evitar la enfermedad meningocócica.

Para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos capsulares tipo B y las OMP y los polisacáridos de otros serogrupos meningocócicos, se están investigando y desarrollando vacunas conjugadas.^{11,15,509} Algunas vacunas conjugadas del grupo B no logran inducir una respuesta inmunitaria o inducen anticuerpos bactericidas que no reaccionan con el polisacárido nativo.^{324,325}

Sin embargo, cuando el polisacárido se conjuga con una proteína transportadora mediante un enlace dihidrazida adípico (ADH), se puede detectar una respuesta inmunitaria contra el polisacárido de grupo B, la proteína transportadora, y el epítipo que se crea por el enlace ADH.⁵³ También se han creado y probado vacunas conjugadas contra meningococos de los serogrupos A y C. Estas vacunas contienen el polisacárido conjugado con una proteína, como el toxoide del tétanos o CRM.^{197,219,532,669} Las vacunas conjugadas contra meningococos del serogrupo C indujeron niveles de anticuerpos bactericidas con títulos dos veces más altos que los obtenidos con el polisacárido nativo, mientras que no se observaron diferencias entre los generados por la vacuna conjugada del grupo A y el polisacárido nativo del grupo A.³⁹¹ Además, cuando los niños que ya habían sido vacunados con la vacuna conjugada del serogrupo C o con la vacuna de polisacárido nativo del serogrupo C fueron revacunados con la vacuna conjugada del serogrupo C, desarrollaron respuestas de anticuerpo antiserogrupo C significativamente más altas las que antes habían recibido la vacuna conjugada.³⁸⁰ Por otra parte, no se observó diferencia en la respuesta anamnésica en la revacunación con una vacuna conjugada del serogrupo A en niños que habían recibido la vacuna de polisacárido del grupo A o la vacuna conjugada de polisacárido del serogrupo A.⁴⁹⁷ Un ensayo reciente de una vacuna conjugada del grupo C-CRM₁₉₇ (mutante de la toxina diftérica) capsular meningocócica en 182 lactantes sanos encontró que la vacuna fue segura, inmunogénica y generadora de memoria inmunitaria cuando se daba junto con otras vacunas para lac-

tantes de 2, 3 y 4 meses de edad.⁴⁰⁸ Otra propuesta para el desarrollo de vacunas involucra el uso de otros antígenos que no son parte del complejo de la membrana externa. Por ejemplo, las proteínas de unión a la transferrina meningocócicas Tbp-1 y Tbp-2, que se expresan por los meningococos durante el crecimiento in vivo, son inmunogénicas en ratones y los sueros de ocho pacientes convalecientes de enfermedad meningocócica causada por *N. meningitidis* grupos A, B y C reaccionan inmunariamente con la proteína purificada Tbp-2 de las dos cepas homólogas y con cepas heterólogas representativas.¹⁷

Otras especies de *Neisseria*

Neisseria lactamica es un microorganismo de interés especial porque puede crecer en un medio selectivo para gonococos y meningococos y debe diferenciarse de ellos. *N. lactamica* se encuentra con mayor frecuencia en la orofaringe de los niños que en la de los adultos. En un estudio de 2 969 lactantes y niños, Gold y cols. encontraron que la tasa de portadores de *N. lactamica* aumentaba de 3,8% a los 3 meses de edad hasta una tasa pico del 21% a los 18 meses de edad, seguida de una disminución a 1,8% para las edades de 14 a 17 años.²⁶¹ Los mismos investigadores también mostraron que la portación de *N. lactamica* puede estimular la producción de anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis* de los grupos A, B y C a causa de la reactividad cruzada antigénica entre ambos microorganismos.²⁶¹ *N. lactamica* fue aislada como causa rara de meningitis y sepsis tanto en adultos como en niños; el caso adulto se asoció con una fractura de la lámina cribosa.^{181,376} Este microorganismo fue asociado con otitis media recurrente y septicemia en un niño de 7 años sometido a terapia inmunosupresora por una leucemia linfocítica aguda.^{483,580} También se lo ha recuperado del aparato genital femenino en asociación con secreción vaginal persistente.⁶⁴⁷ Las cepas de *N. lactamica* resistentes a la penicilina contienen una proteína de unión a la penicilina (PBP 2) alterada que es similar a la PBP 2 encontrada en las cepas de *N. meningitidis* relativamente resistentes a la penicilina, lo que sugiere que las especies comensales, como *N. lactamica* (y *N. polysaccharea*), son las fuentes de los determinantes de resistencia genética que por lo común se encuentran en los meningococos.^{405,565}

Neisseria subflava (biovariedades *flava*, *subflava* y *perflava*), *N. mucosa*, *N. sicca* y *N. flavescens* se han informado con mucha frecuencia como causas poco frecuentes de endocarditis de válvulas nativas y protésicas.^{22,31,176,293,393,400,602,676} En los casos de endocarditis de válvula nativa, las anomalías estructurales cardíacas causadas por infecciones pasadas (p. ej., fiebre reumática) o cirugía previa están presentes con frecuencia. En algunos informes, el uso de drogas intravenosas fue un factor de riesgo significativo para endocarditis, porque pueden usarse las secreciones orales para disolver las drogas o limpiar la piel antes de la inyección.^{176,676} En un caso reciente, se desarrolló endocarditis por *N. mucosa* en una mujer de 20 años sin historia de enfermedad cardíaca un mes después de haberse perforado la lengua para colocarse un arete.⁶⁶⁴ Se documentó la formación de abscesos miocárdicos como una complicación de endocarditis por *N. mucosa*.²²⁶ Además de la endocarditis, estos microorganismos normalmente saprofitos fueron aislados de otras infecciones importantes. *N. subflava* fue aislada del líquido articular de un niño con artritis séptica, de abscesos de la glándula de Bartolino y como causa de bacteriemia y meningitis primaria en huéspedes inmunodeprimidos.^{46,180,199,479} En la Illinois University, una cepa de *N. subflava* subvariedad *perflava* fue recuperada varias veces de cultivos de orina de un niño

de 10 años con anomalías estructurales congénitas de la vejiga urinaria.³²¹ Se ha informado peritonitis por *N. subflava* subvariedad *perflava* como complicación de la diálisis peritoneal ambulatoria crónica.⁶⁹² *N. mucosa* se ha aislado como causa inusual de meningitis, abscesos pulmonares, infecciones oculares, artritis, bursitis, celulitis crepitante, bacteriemia relacionada con diálisis y peritonitis asociadas con diálisis peritoneal ambulatoria.^{4,118,259,307,395,407,628} *N. sicca* ha sido aislada como causa rara de neumonía, bronquiectasia, meningitis en huéspedes inmunodeprimidos, infección de derivaciones de líquido cefalorraquídeo (LCR), sinusitis, osteomielitis, artritis/bursitis séptica, absceso de la glándula de Bartolino y peritonitis en pacientes mantenidos en diálisis peritoneal prolongada.^{59,193,251,258,273,281,304,448,473,576} *N. subflava* biovariedad *perflava* y *N. sicca* también han sido aisladas de hemocultivos de pacientes con SIDA en estadios terminales.⁴⁵⁵ Estos microorganismos pueden presentar dilemas terapéuticos porque algunas cepas pueden ser resistentes a la penicilina a causa de la elaboración de enzimas de β-lactamasa o de proteínas de unión a la penicilina alteradas. En esos casos, deben identificarse las especies de las cepas aisladas y realizarse pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

Neisseria cinerea es una especie saprófita de las vías respiratorias altas, de particular interés a causa de su semejanza en las características de cultivo con *N. gonorrhoeae*, su recuperación ocasional de los sitios genitales y su asociación con los síndromes similares a los causados por gonococos, como oftalmía neonatal y proctitis.^{42,85,91,201,357,361} *N. cinerea* también ha sido identificada como causa de neumonía hospitalaria en un paciente con SIDA y como causa de linfadenitis.^{92,157} Se ha documentado bacteriemia por *N. cinerea* en un niño con neumonía y otitis media, en un hombre alcohólico con enfermedad intraabdominal, en un paciente que recibía hemodiálisis y en un varón de 17 años después de una pelea a puñetazos en la que sufrió un trauma facial importante.^{327,349,610} En este último caso, el microorganismo también se halló en el LCR. *N. cinerea* también ha sido aislada en casos de conjuntivitis purulenta, oftalmía neonatal y peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria crónica.^{40,85,198,253}

La "especie" *N. gonorrhoeae* subespecie *kochii* (o *N. kochii*) ha sido aislada en pacientes con conjuntivitis en zonas rurales de Egipto; no se describieron aislamientos de los Estados Unidos.⁴²⁶ *N. polysaccharea* se encontró en las vías respiratorias altas de casi el 0,5% de los individuos y no se describió como parte de un proceso patológico.^{84,111,538} *N. canis*, *N. denitrificans*, *N. iguanae* y *N. dentiae* son cepas animales aisladas de la cavidad bucal y de las vías respiratorias altas de gatos, cobayos, iguanas y vacas, respectivamente.^{51,608} *N. canis* se ha aislado en heridas humanas producidas por mordeduras de gatos.^{279,566}

Los miembros baciliformes del género *Neissera* incluyen tres subespecies de *N. elongata* (subesp. *Elongata*, subesp. *glycolytica* y subesp. *nitroreducens*) y *N. weaveri*.^{25,26,89,268,299} Hasta 1990, *N. elongata* sólo incluía dos subespecies: *N. elongata* subesp. *elongata* y *N. elongata* subesp. *glycolytica*. Estos microorganismos se encuentran normalmente en las vías respiratorias altas humanas. Ninguna de estas subespecies ha estado implicada en infecciones humanas hasta 1995, cuando se aisló *N. elongata* subesp. *glycolytica* de muestras de herida de tres pacientes y de hemocultivos de un hombre de 57 años con endocarditis bacteriana subaguda e insuficiencia aórtica.²⁶ En 1996, Nawaz y cols. informaron otro caso de endocarditis causado por *N. elongata* subesp. *elongata* que se complicó por un aneurisma micótico roto de la arterial braquial derecha.⁴⁷⁰ *N.*

elongata subesp. *nitroreducens*, fue llamada en principio grupo M-6 de los CDC.²⁶⁸ Se demostró que esta bacteria "tipo *Moraxella*" está relacionada con las especies de *Neisseria* en general y con las subespecies *N. elongata* en particular sobre la base de estudios genéticos, composición de ácidos grasos celulares y propiedades fenotípicas. *N. elongata* subesp. *nitroreducens* se encuentra normalmente en la orofaringe de los seres humanos y ha sido mencionada como un agente oportunista de bacteriemia y endocarditis, y como causa de osteomielitis posterior a una cirugía bucal.^{200,268,295,437,631,721} También se la ha aislado en orina y tejido apendicular.²⁶⁸ *N. weaveri*, un microorganismo baciliforme llamado en un principio grupo M-5 de los CDC, es parte de la flora de las vías respiratorias altas de perros y gatos y puede ser aislado en heridas humanas y hemocultivos asociados con mordeduras de animales.^{25,116,299} En 2002, *N. weaveri* fue aislado en lavados bronquiales y esputo de un hombre de 60 años con bronquiectasias y en una infección de herida en una niña de 7 años posterior a una mordedura de tigre.^{113,492}

Importancia clínica de *Moraxella catarrhalis*

Durante los últimos 10 años, el microorganismo en principio llamado "*Neisseria catarrhalis*", luego "*Branhamella catarrhalis*" y ahora *M. catarrhalis* ha sido objeto de mucha atención como un patógeno humano emergente.^{213,341} Antes de 1990, se pensaba que *M. catarrhalis* era parte de la flora normal de las vías respiratorias altas; durante años se mantuvo esta idea en muchos libros de texto y en informes de casos sin ninguna evidencia que la avalara. Estudios realizados por Vaneechoutte y cols. y por Knapp y Hook han mostrado que el microorganismo se encuentra en las vías respiratorias altas en alrededor del 1.5-5.4% de los adultos sanos y que es más común en el aparato respiratorio de niños sanos (50.8%) y de adultos de edad avanzada (26.5%).^{357,686} En un estudio realizado luego en Dinamarca también se encontró que *M. catarrhalis* no era un miembro importante de la flora nasofaríngea de los adultos y que rara vez estaba presente en los niños menores de un mes de vida.²⁰⁹ Sin embargo, el 36% de los niños de 1 a 48 meses de edad tenían *M. catarrhalis* como parte de la flora del aparato respiratorio y, en este mismo grupo etario, la prevalencia del microorganismo en niños con infecciones respiratorias era del 68%. Un estudio sobre colonización nasofaríngea con *M. catarrhalis* durante los primeros dos años de vida mostró que el 66% de 120 niños cultivados en forma seriada se colonizaron durante el primer año de vida y que el 77.5% fueron colonizados cerca del final del segundo año de vida.²¹⁷ En este estudio también se encontró que, en niños individuales, se adquirirían de tres a cuatro cepas diferentes de *M. catarrhalis* y después se depuraban durante los dos primeros años de vida. Las mayores tasas de colonización se observaron en los niños en edad preescolar con asma (70%) en comparación con los niños sanos (33%).⁵⁹⁴ En los adultos sanos, la colonización de *M. catarrhalis* cercana al 4% es indicativa de las bajas tasas de infección observadas en los adultos respecto de los niños.³³² Cuando se aísla en adultos con enfermedad respiratoria, es más frecuente encontrar el microorganismo en muestras representativas de las secreciones de las vías respiratorias bajas que en las muestras con abundante contaminación orofaríngea. Las tasas crecientes de colonización del aparato respiratorio en los adultos están asociadas con bronquitis crónica, bronquiectasias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.^{461,734} En un grupo de

adultos con enfermedad crónica de las vías aéreas que fueron seguidos por un período mayor de 27 meses, Klingman y cols. hallaron que el 42.9% estaba colonizado con *M. catarrhalis* y que cada paciente fue colonizado con una a cuatro cepas diferentes, cada una de las cuales persistió alrededor de 2.3 meses.³⁵¹ Entre los pacientes con bronquitis crónica analizados en Buffalo, Nueva York, las tasas de colonización con *M. catarrhalis* excedían el 10%.⁴⁶¹ El hecho de que el aislamiento de este microorganismo sea más frecuente en el aparato respiratorio de niños y ancianos con enfermedad respiratoria crónica señala su papel en ciertas infecciones de la infancia y en las infecciones de las vías respiratorias bajas observadas en las personas mayores.

Las infecciones de las vías respiratorias y de las áreas anatómicas adyacentes dan cuenta de la mayoría de las afecciones clínicas que señalan a *M. catarrhalis* como el agente etiológico. Estas infecciones son otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonía.^{213,341,367,414,688} Aunque la otitis media causada por este microorganismo puede contraerse a cualquier edad, la mayoría de los estudios se han centrado en su papel en las infecciones pediátricas. En un estudio realizado por Van Hare y cols., *M. catarrhalis* fue el único patógeno bacteriano aislado en el líquido del oído medio de 40 (11%) de 355 niños con otitis media aguda y fue aislado junto a *H. influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* en 21 (6%) de los pacientes.⁶⁸⁸ Estudios in vitro han mostrado que las cepas de *M. catarrhalis* presentan mayor adherencia a las células epiteliales nasofaríngeas de los niños propensos a las otitis que a las células de los niños sin esa propensión.⁶²³ Estudios de cultivos seriados de niños propensos a la otitis durante los primeros 2 años de vida demostraron que esos niños tienen tasas de colonización con *M. catarrhalis* considerablemente mayores que otros niños.²¹⁷ Además, estudios serológicos indicaron que los niños con otitis media debida a *M. catarrhalis* producen anticuerpos contra una variedad de antígenos proteicos de *M. catarrhalis* (p. ej., UspA, TpbB y CopB) y LOS (recuadro 11-4).⁴²³ Estos antígenos están siendo investigados para el desarrollo de vacunas, en particular para el grupo etario pediátrico. Los hallazgos bacteriológicos de la otitis media aguda se reflejan en los estudios de sinusitis aguda en los mismos grupos etarios. *M. catarrhalis* puede ser aislado en los aspirados de senos maxilares recolectados con cuidado en niños con sinusitis aguda en cultivos puros o mixtos en el 2-16% de los pacientes.⁴¹⁴ En los adultos, las sinusitis agudas se asocian con este microorganismo pero con menos frecuencia que en los niños. A pesar de su participación en la otitis media y la sinusitis en los niños, *M. catarrhalis* es una causa poco común de infecciones de las vías respiratorias bajas adquiridas en la comunidad en este grupo etario.¹⁵⁵ En los niños con neumonía, *M. catarrhalis* puede comportarse como un patógeno primario o secundario superpuesto en una infección viral precedente (p. ej., virus sincitial respiratorio).²²⁵ En raras ocasiones, causa traqueítis fulminante y enfermedad de las vías respiratorias bajas en niños aparentemente sanos.^{601,603}

Las infecciones respiratorias bajas debidas a *M. catarrhalis* en adultos ocurren por lo general en ancianos y en paciente inmunodeprimidos, en particular en aquellos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias, insuficiencia cardíaca congestiva y predisposición a la aspiración.^{151,428,461} También son factores contribuyentes importantes las anomalías inmunitarias a causa de enfermedades subyacentes (p. ej., diabetes, alcoholismo, infección por HIV, trasplantes).^{413,595} En los adultos, *M. catarrhalis* suele asociarse con hallazgos clínicos de bronquitis aguda y la neumonía es menos frecuente.³³¹ Los pacientes con bronquitis tienen mayor producción de espu-

Recuadro 11-4 Factores de virulencia y antígenos asociados con la virulencia de *Moraxella catarrhalis***Factores de virulencia y antígenos****Comentarios****Lipooligosacárido**

Estudios con anticuerpos monoclonales han mostrado que la estructura del LOS de *M. catarrhalis* está relativamente conservada. Vaneechoutte y cols. analizaron 302 cepas de *M. catarrhalis* e identificaron tres serotipos LOS, designados A, B, y C, con los anticuerpos monoclonales dirigidos al LOS.⁶⁸⁵ Los serotipos A, B y C del LOS dan cuenta del 61,3%, el 28,8% y el 5,3%, respectivamente, de las 302 cepas examinadas. Gu y cols. prepararon una vacuna de LOS conjugado por unión de un LOS de serotipo A al toxoide del tétanos o a las OMP de elevado peso molecular de *H. influenzae* no tipificable y la probaron en ratones.²⁷⁴ En forma sorprendente, desarrollaron en los ratones anticuerpos que tenían actividad bactericida dependiente del complemento. En teoría, las vacunas conjugadas de LOS preparadas con los tres serotipos LOS deberían provocar respuestas de anticuerpos que podrían tener eficacia en la prevención de infecciones con al menos el 90% de las cepas. Los posibles problemas con las vacunas que contienen componentes de LOS son la necesidad de la destoxificación previa del LOS y el desarrollo de un método conjugativo que no altere la antigenicidad del LOS necesaria.

Fimbrias (pili)

Se han demostrado fimbrias en algunas cepas de *M. catarrhalis*. Las microfotografías electrónicas de cepas piliadas muestran fibrillas superficiales de 20 a 146 nm de longitud.¹² Una sonda génica dirigida contra el pili de tipo 4 de *Moraxella bovis* hibridó con DNA genómico de cuatro cepas de *M. catarrhalis*, con lo que se refuerza la estrecha relación genética de *M. catarrhalis* con las otras *Moraxellas*.⁴¹⁵ Los pili de clase 4 también se encuentran en *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* patógenos. Como las fimbrias de otros microorganismos, las de *M. catarrhalis* aparentemente funcionan como adhesinas y se ha identificado un receptor específico de fimbrias glucosfingolípido en células epiteliales respiratorias.¹³

Hemoaglutininas

Se cree que las hemoaglutininas producidas por *M. catarrhalis* contribuyen a la adherencia. La hemoaglutinina mejor definida es una proteína de 200 kDa que se une al glucolípido globotriaosilceramida.²³⁴ Esta hemoaglutinina es serológicamente variable y se conoce poco acerca de su antigenicidad o su potencial para producir anticuerpos bactericidas u opsonizantes. Las hemoaglutininas no se encuentran en todas las cepas. Los aislamientos que expresan hemoaglutinina a menudo son de pacientes infectados más que de pacientes colonizados, y existe una relación entre la expresión de la hemoaglutinina y la resistencia a la actividad bactericida del suero humano normal.⁴⁶⁰

Proteínas de la membrana externa**Proteínas UspA**

Dos proteínas bacterianas de superficie, UspA1 y UspA2, han sido identificadas en *M. catarrhalis*. En un principio se pensó que estas proteínas eran una proteína sola debido a la presencia de un dominio conservado en cada una que reaccionaba con el mismo anticuerpo monoclonal y por la comigración en la electroforesis en gel de poliacrilamida –dodecil sulfato de sodio (SDA-PAGE).⁴³² Los loci *UspA1* y *UspA2* comparten un alto grado de homología en la secuencia y codifican proteínas que tienen dominios conservados o semiconservados.¹⁶⁷ Los dominios N-terminales conservados se reconocen con el mismo anticuerpo monoclonal, mientras que los dominios C-terminales diferencian a las dos proteínas y contienen sus regiones funcionales particulares. Las proteínas UspA se encuentran en todas las cepas, aunque sus pesos moleculares pueden variar de una cepa a otra. UspA1 tiene un peso molecular de casi 88 kDa y es una adhesina, porque los mutantes UspA1 no pueden adherirse a las células epiteliales y los anticuerpos anti-UspA1 bloquean la adherencia celular.^{7,432} UspA1 también se une a la proteína matriz extracelular del huésped, la fibronectina. La proteína UspA2 influye en la resistencia al suero no inmune, desempeña un papel en la mediación de la adherencia a las mucosas y se une a la proteína vitronectina del huésped, un regulador del sistema del complemento.¹⁹³ La inmunización de ratones o cobayos con cualquier proteína deriva en la formación de anticuerpos que son bactericidas tanto para las cepas de *M. catarrhalis* homólogas como para las heterólogas.⁴³² El suero de humanos adultos sanos contiene títulos altos de anticuerpos anti-UspA bactericidas, mientras que el de los niños de 6 a 36 meses de edad tienen títulos bajos.¹⁴⁷ Estos datos, además de los estudios realizados en animales, brindan respaldo para continuar las investigaciones de las proteínas UspA como antígenos para vacunas de *M. catarrhalis*.^{430,431}

Proteína CD

La proteína CD de *M. catarrhalis* es una OMP integral de 45 kDa, conservada que funciona como una proteína porina.⁴⁶² CD puede actuar como un factor de virulencia por unión específica a las mucinas óticas y nasales, pero no a las mucinas salivales.⁵²³ Las mucinas son glucoproteínas complejas y la unión de esas moléculas a la proteína CD puede facilitar la fijación y el transporte de los microorganismos hacia el interior del oído medio mediante la trompa de Eustaquio, donde pueden causar otitis media. La inmunización de ratones con proteínas CD recombinantes o purificadas engendra una respuesta fuerte de anticuerpo que deriva en la depuración de microorganismos *M. catarrhalis* homólogos y heterólogos del aparato respiratorio en estudio.⁴⁶³ Los mecanismos inmunitarios involucrados en la depuración de microorganismos del aparato respiratorio no se conocen bien porque los anticuerpos anti-CD carecen de actividad bactericida dependiente de complemento y no son opsoninas. La depuración de los microorganismos puede ser el resultado de la inhibición de la unión a la mucina por la proteína CD asociada con la superficie.

Proteínas LpbA y LpbB

LpbA y LpbB son proteínas que se unen a la lactoferrina de pesos moleculares 111 kDa y 99 kDa, respectivamente, que extraen hierro de la lactoferrina cuando los microorganismos se desarrollan en condiciones limitantes en hierro.⁷⁶ Estas proteínas están relacionadas con las proteínas que unen lactoferrina de especies de *Neisseria* y están altamente conservadas entre cepas de *M. catarrhalis* diferentes. A continuación de la infección humana, se detectan los anticuerpos contra LpbB, pero no LpbA, lo que sugiere que la LpbA no está expuesta sobre la superficie del microorganismo.⁷³² LpbB está siendo caracterizada como un antígeno posible para vacuna.

Proteínas TbpA y TbpB

TbpA y TbpB son proteínas que se unen a la transferrina con pesos moleculares de 105 kDa y 74 kDa, respectivamente.^{107,148,732} Como las proteínas que se unen a la lactoferrina, estas proteínas tienen homología con proteínas similares encontradas en neisserias, *Haemophilus* y otras bacterias. TbpA recombinante o purificada produce anticuerpos bactericidas en animales, pero

(Continúa)

Recuadro 11-4 Factores de virulencia y antígenos asociados con la virulencia de *Moraxella catarrhalis* (cont.)**Factores de virulencia y antígenos****Comentarios**

sólo contra cepas homólogas. Los anticuerpos contra TbpA no se producen a continuación de la infección natural en seres humanos.⁷³² En los ratones, TbpB (también llamada B 1 y proteína 74 K) estimula la producción de anticuerpos que reaccionan con cepas homólogas y, con alguna extensión, con cepas heterólogas, como se evidenció por análisis de inmunoprecipitación Western blot.^{107,148} La secuenciación de la proteína de TbpB de diferentes cepas se documentó en secuencias identificatorias que van del 50 al 70%. Las variaciones en la respuesta inmunitaria a las proteínas TbpB de diferentes cepas de *M. catarrhalis* también se evidenciaron por diferencias en la actividad bactericida dependiente del complemento y en la eficacia de la depuración pulmonar en estudios respiratorios con *M. catarrhalis* en ratones.^{148,464} En los seres humanos, los anticuerpos contra TbpB reaccionan con cepas homólogas y heterólogas, pero carecen de actividad bactericida dependiente del complemento.

Proteína CopB

La proteína CopB es una OMP integral expuesta a la superficie de 81 kDa que está conservada entre las variedades de *M. catarrhalis* y que está codificada por el gen *copB*.⁸ Esta proteína es homóloga con la proteína FrpB encontrada en las neisserias y funciona en la adquisición de hierro para el crecimiento y el metabolismo. Estudios con anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos CopB de distintas cepas de *M. catarrhalis* indican que existen al menos dos serotipos CopB.⁶ También existen diferencias en las respuestas bactericidas de ratones inmunizados con anticuerpos monoclonales contra la proteína CopB de diferentes cepas de *M. catarrhalis*.⁵⁹⁸ Esto es sorprendente dado que los antígenos CopB de diferentes cepas tienen el 97% de homología en sus secuencias de aminoácidos. Las diferencias en las respuestas de anticuerpos pueden deberse a la exposición limitada de epítomos antigénicos claves en la superficie celular.⁶

Proteína E

La proteína E es una proteína de la membrana externa de 47 a 50 kDa de función incierta, aunque podría ayudar en el transporte de ácidos grasos hacia el interior de la célula.⁶⁴ Usando un anticuerpo monoclonal anti-E específico llamado 1 B3, se han identificado al menos dos serotipos de proteína E, como quedó evidenciado por la reactividad de 82% de las cepas con este reactivo. Las proteínas E de cepas de *M. catarrhalis* que fallan al reaccionar con 1 B3 todavía tienen el 97% de homología en la secuencia con las cepas 1 B3 reactivas, lo que indica que los serotipos de la proteína E están altamente conservados. La infección con *M. catarrhalis* conduce a la formación de anticuerpos anti-E, pero su actividad biológica y su funcionalidad no han sido investigadas.

to purulento y dificultad respiratoria moderada sin fiebre. El compromiso neumónico está anunciado por la aparición de fiebre de bajo grado, disnea y producción de cantidades crecientes de esputo purulento. En algunos pacientes se ha observado la progresión hacia la falla respiratoria. Desde el punto de vista radiológico, la enfermedad aparece como infiltrados "en parches" en ambos pulmones, aunque también se ha documentado el compromiso lobular con formación de absceso subpleural o no.²⁰⁸ La epiglottitis causada por *M. catarrhalis* se ha informado como una complicación de la leucemia mieloide aguda en un hombre diabético de 65 años.⁶⁹³ Se comunicó la bacteriemia por *M. catarrhalis* como complicación de infecciones respiratorias. La mayoría de los casos pediátricos de bacteriemia por *M. catarrhalis* ocurren en forma secundaria a otitis media, sinusitis o neumonía en pacientes inmunodeprimidos debido a leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma, SIDA, hipogammaglobulinemia, anemia drepanocítica, prematuridad y anomalías neurológicas congénitas.^{5,312,438,485} En una revisión de 53 casos de bacteriemias por *M. catarrhalis*, la neutropenia o el cáncer estuvieron presentes en el 30,2% de los pacientes y el 24,5% tenía enfermedad respiratoria subyacente.³¹² Sin embargo, el 28,3% de los casos ocurrieron en individuos inmunocompetentes. La bacteriemia en adultos puede provenir de un foco primario, como sinusitis o neumonía, pero en pacientes inmunodeprimidos, la puerta de entrada puede ser poco clara.⁴⁸⁵

M. catarrhalis también ha sido aislado en pacientes con endocarditis, meningitis, infecciones oculares, infecciones urogenitales, infecciones de heridas, artritis séptica, infecciones respiratorias hospitalarias y peritonitis asociadas con diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{105,163,194,269,406,434,475,531} Se ha informado endocarditis en individuos sanos sin enfermedad valvular anterior, en pacientes inmunodeprimidos con afecciones subyacentes (p. ej., leucemia, linfoma, estados de deficien-

cia de inmunoglobulinas, SIDA) y posteriores a varios tipos de procedimientos invasivos (p. ej., angioplastia).^{569,574,620,722} Han ocurrido casos raros de meningitis y ventriculitis por *M. catarrhalis* luego de procedimientos quirúrgicos que involucran la cabeza y el cuello o de derivaciones ventriculoperitoneales o drenajes ventriculares externos.^{164,465,556} Viagappan y cols. comunicaron un caso atípico de absceso cerebral por *M. catarrhalis* en un varón de 36 años posterior a una lesión orbitaria penetrante con un taco de billar y se describió una meningitis neonatal mortal en un recién nacido de 26 días dos semanas después de sufrir una cirugía abdominal.^{173,694} Las infecciones conjuntivales causadas por *M. catarrhalis* se han documentado tanto en el período neonatal como en la infancia tardía. Se han documentado infecciones de explantes esclerales por *M. catarrhalis*, endoftalmitis secundaria a la cirugía filtrante de glaucoma y celulitis periorbitaria con sepsis.^{105,396,663} La oftalmía neonatal causada por *M. catarrhalis* proviene de la transmisión del microorganismo durante el nacimiento por el tracto genital colonizado de la madre o por las secreciones del aparato respiratorio de los cuidadores del niño. El aislamiento de este microorganismo en el aparato genital masculino o femenino es raro, pero en algunos casos se informó como causa de una uretritis similar a la gonorrea.¹⁹⁴ La neumonía intrahospitalaria debida a *M. catarrhalis* puede ocurrir en unidades respiratorias y en unidades pediátricas de cuidados intensivos.^{163,531}

Aislamiento de especies de *Neisseria****Neisseria gonorrhoeae*****FROTIS DIRECTOS TEÑIDOS CON GRAM**

El diagnóstico de uretritis gonocócica en varones adultos suele efectuarse por la observación de diplococos gramnegati-

vos dentro de leucocitos polimorfonucleares o estrechamente asociados con ellos en un frotis de la secreción uretral (véase lámina en color 11-1A). Cuando se realiza en forma adecuada, la tinción de Gram tiene una sensibilidad del 90-95% y una especificidad del 95-100% para diagnosticar gonorrea genital en varones sintomáticos.³⁵⁰ En las mujeres, la tinción de Gram de muestras endocervicales recolectadas bajo visualización directa del cuello uterino (con un espéculo) también puede ser muy útil para el diagnóstico (véase apartado sobre recolección de la muestra). Los frotis teñidos con Gram de esas muestras tienen una sensibilidad del 50-70%, según la adecuación de la muestra y la población de pacientes. Un frotis endocervical que muestra diplococos intracelulares gramnegativos, en particular de una mujer con otros signos y síntomas de infección gonocócica, es muy predictivo.⁴⁰¹ Sin embargo, en una mujer asintomática, el valor predictivo de la tinción de Gram es mucho menor. En pacientes con proctitis sintomática, los frotis de muestras recolectadas bajo visualización directa mediante un anoscopio pueden proporcionar un diagnóstico en el 70-80% de las pacientes, al contrario de lo que sucede con los frotis de muestras obtenidas a ciegas, que teñidos con Gram tienen una sensibilidad de sólo el 40-60%.⁷¹⁵ Los frotis teñidos con la coloración de Gram no tienen valor en el diagnóstico de infección gonocócica faríngea. No se debería confiar el diagnóstico de gonorrea en estos frotis y se deben usar junto con pruebas más específicas.

Los frotis directos para la tinción de Gram se deben preparar de sitios endocervicales y uretrales y recolectarse con distintos hisopos. Para la preparación del frotis, el hisopo se hace rodar con cuidado sobre la superficie de un portaobjetos en una sola dirección. Esta técnica reduce la deformación y la rotura de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y preserva el aspecto de los microorganismos (lámina en color 11-1A). Los frotis preparados con muestras sometidas a medios de transporte pueden ser más difíciles de interpretar a causa de la deformación de los PMN o a la presencia de sustancias que provocan interferencias (p. ej., carbón). También deben obtenerse frotis de lugares normalmente estériles o muy poco contaminados (p. ej., líquido articular, lesiones cutáneas).

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Del mismo modo que para otros microorganismos patógenos, el éxito del aislamiento depende de la recolección de las muestras apropiadas, lo cual es particularmente importante para la detección de *N. gonorrhoeae*. Debido a que este microorganismo puede causar infección en diversos sitios del cuerpo, la recolección de las muestras apropiadas para el cultivo y el diagnóstico depende del sexo, de las prácticas sexuales del paciente y del cuadro de presentación clínica. En todos los casos, deben recolectarse muestras de sitios genitales (uretra masculina, endocérnix femenino). Si el paciente tiene antecedentes de contactos sexuales anogenitales u urogenitales, también es adecuada la recolección de muestras del conducto anal u orofaríngeas. En los casos sospechosos de infección gonocócica diseminada, se deben obtener muestras de sangre para hemocultivos y muestras de sitios genitales y extragenitales. Los lugares del cuerpo que son apropiados para tomar cultivos se resumen en el cuadro 11-1.

Las muestras deben recolectarse con hisopos de dacrón o rayón. El alginato cálcico usado para preparar algunos lotes de hisopos puede ser tóxico para los gonococos.³⁷⁷ Se pueden usar hisopos de algodón; sin embargo, algunas marcas de este material contienen ácidos grasos que pueden ser inhibitorios para el

Cuadro 11-1 Obtención de muestras para cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*

PACIENTE	SITIO(S) PRIMARIO(S)	SITIO(S) SECUNDARIO(S)
Mujer	Endocérnix	Recto, uretra, faringe
Varón, heterosexual	Uretra	Faringe
Varón, heterosexual o bisexual	Uretra, recto, faringe	
Mujer con infección diseminada	Sangre, endocérnix, recto	Faringe, lesiones cutáneas*, líquido articular**
Varón con infección diseminada	Sangre, uretra	Faringe, recto, lesiones cutáneas, líquido articular**

* Si está presente.

** Cultivar si hay presencia de artritis.

desarrollo de los gonococos. Por lo tanto, los hisopos de alginato cálcico y algodón deberían utilizarse sólo si las muestras se inoculan directamente en el medio de cultivo o se transportan en un medio no nutritivo. Algunas formulaciones de medios de transporte contienen carbón para inactivar los materiales tóxicos presentes en el hisopo o en la misma muestra. Los instrumentos usados para ayudar en la recolección apropiada de las muestras (p. ej., espéculo vaginal) deben estar lubricados con agua caliente o solución fisiológica porque varios lubricantes a base de agua y aceite también pueden inhibir el crecimiento del microorganismo. En el recuadro 11-5 se describen los procedimientos de recolección para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* en diferentes lugares anatómicos.

La función que cumple el laboratorio de microbiología clínica en el diagnóstico de las infecciones gonocócicas en niños es crucial e involucra la manipulación adecuada de las muestras recolectadas en forma apropiada y la identificación exacta de los microorganismos aislados.^{30,153,712} En el caso de mujeres prepúberes, las muestras deben obtenerse de la vagina o la uretra, la orofaringe y el recto e inocularse en medios de cultivo como se describe más adelante. En los niños varones, se deben recolectar muestras con hisopo de la uretra, la orofaringe y el recto e inocularlas en medios de cultivo.

TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Aunque la recuperación máxima de los gonococos se obtiene cuando las muestras se cultivan directamente en el medio después de la recolección, esta técnica no siempre es posible o práctica, en particular en clínicas muy ocupadas o salas de emergencia hospitalarias.³⁹⁸ Para estas situaciones, se cuenta con varios sistemas de transporte:

Sistemas de transporte de hisopos no nutritivos. Los medios de transporte semisólidos bufferados de Stuart o de Amies se usan para el transporte de las muestras con hisopos de *N. gonorrhoeae*. Estos medios están disponibles en la mayoría de las clínicas y los hospitales y no requieren equipamiento ni condiciones de almacenamiento especiales.²¹⁸ Sin embargo, las muestras enviadas al laboratorio en sistemas de transporte con hisopo deben permanecer a temperatura ambiente y procesarse lo antes posible después de la recolección. En 1997, Perry y cols. realizaron un estudio sobre el aislamiento cuantitativo

Recuadro 11-5 Procedimientos de recolección de muestra para el diagnóstico de infecciones gonocócicas

Muestra	Procedimiento de recolección
Uretra masculina	La secreción purulenta se puede extraer presionando la parte anterior del pene y recolectando el material con un hisopo. Las muestras de varones asintomáticos se obtienen por inserción de un hisopo nasofaríngeo de alginato cálcico en el interior de la uretra. El hisopo se rota con cuidado para retirarlo.
Endocérnix	Después de que el espéculo está colocado, eliminar algún moco cervical con algodón o gasa. Insertar el hisopo y recoger la muestra con un movimiento suave. Dar tiempo para que los microorganismos se absorban en el hisopo. Tomar cualquier secreción cervical presente.
Recto	Insertar el hisopo 4-5 cm en el conducto anal y moverlo con suavidad de un lado a otro para tomar la muestra de las criptas anales. Dar algunos segundos para que los microorganismos se absorban en el hisopo y rotar despacio mientras se retira. Si se observa una densa contaminación fecal en el hisopo, recoger otra muestra con un hisopo nuevo.
Orofaringe	Con la ayuda de un bajalenguas, hisopar con firmeza las áreas de las amígdalas y la faringe posterior.
Sangre	Después de la punción venosa, inocular la sangre en el medio de cultivo adecuado (caldo tripticosa soja, caldo de Columbia) que contenga polianetosulfonato de sodio (SPS). Si se usan los tubos Vacutainer SPS® para la recolección de la muestra, transferir la muestra de sangre del tubo al medio de cultivo lo más rápido posible, porque la exposición a altas concentraciones de SPS puede inhibir a los gonococos.
Líquido articular	El líquido articular se puede aspirar con una aguja y jeringa e inocular en un frasco de hemocultivo aerobio.
Lesiones cutáneas	Las muestras de punción biopsia se recogen y se colocan en un recipiente estéril con una pequeña cantidad de caldo o solución fisiológica estéril y se remiten al laboratorio.
Conjuntiva	La secreción conjuntival se recoge de la cara interna del párpado inferior con un pequeño hisopo nasofaríngeo. Preparar frotis para tinciones de Gram como se describe en el texto.

de *N. gonorrhoeae* usando dos sistemas de transporte con hisopos –hisopos Copan® (Copan Diagnostics, Inc., Corona, CA; ahora con la marca BBL CultureSwabs Plus®, BD Biosciences, Sparks, MD) e hisopos Starswab® (Starplex Scientific, Etobicoke, Ontario, Canadá)– que contenían medio de transporte líquido de Stuart.⁵⁰¹ En estos sistemas el hisopo está en contacto con una esponja de poliuretano (Copan®) o de celulosa (Starplex®) que se embebe en el medio de Stuart. Estos investigadores hallaron que el aislamiento cuantitativo de *N. gonorrhoeae* disminuía cerca de un 30% en el sistema Copan® y de un 100% en el sistema Starswab® después de cuatro horas de incubación a temperatura ambiente. Los autores señalaron que los materiales de las esponjas en algunos sistemas de transporte con hisopos pueden contener sustancias (p. ej., azufre, compuestos de amonio cuaternario) que pueden inhibir o dañar a los microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Aunque estos problemas fueron derivados a los fabricantes de sistemas de transporte a partir de la publicación de estos estudios, la importancia de los dispositivos de recolección confiables para el mantenimiento de la viabilidad del microorganismo tiene implicancias para otros microorganismos y muestras más allá de los recolectados para el aislamiento de *N. gonorrhoeae*.

La naturaleza del medio de transporte también es central para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* y otros microorganismos. Thompson y French evaluaron varios medios de transporte comerciales para el aislamiento de 30 cepas clínicas frescas de *N. gonorrhoeae* y encontraron que la formulación Amies sin carbón usada en los dispositivos Copan Transystem® (incluidos CultureSwab®, fabricado por Copan para Difco) fueron superiores y preservaron la viabilidad de 29 de las 30 cepas durante más de 48 horas.⁶⁵¹ Los hisopos de transporte BBL Culturette® (BD Biosciences) y Starswab® fueron de calidad

inferior, con declinaciones mayores en la viabilidad del microorganismo entre 24 y 48 horas. En otro estudio, tanto los medios de transporte de gel Copan® y Amies® con y sin carbón detectaron el 95% de las cepas de *N. gonorrhoeae* que se detectaron por cultivo directo de la muestra; el medio Copan® con carbón detectó el 98% de las cepas obtenidas por cultivo directo después de haber sido mantenidas en el medio de transporte durante 6 horas.⁴⁸⁰ Los sistemas de transporte inoculados con muestras que pueden contener *N. gonorrhoeae* deben mantenerse a temperatura ambiente, porque la exposición a temperaturas extremas (p. ej., refrigeración) comprometerá el éxito del aislamiento del microorganismo.

Sistemas de transporte en medios de cultivo. El transporte de muestras en medios de cultivo presenta ciertas ventajas y se comercializan varios sistemas para este propósito. Entre ellos están las placas JEMBEC® (Cámara de ambiente biológico de James E. Martin) que contienen varias fórmulas de medios selectivos, el sistema Gono-Pak® (BD Biosciences) y el sistema InTray GC® (BioMed Diagnostics, Inc., San Jose, CA).^{62,184,417} Mientras JEMBEC y Gono-Pak requieren almacenamiento refrigerado antes de usarlos, el sistema InTray® permite el almacenamiento del medio a temperatura ambiente durante más de un año. Con estos sistemas, los medios se inoculan con la muestra y se colocan en una bolsa plástica impermeable con un gránulo de bicarbonato-ácido cítrico. El contacto del gránulo con la humedad (mediante la evaporación del medio [JEMBEC] o por la rotura de una ampolla de agua adyacente al gránulo [Gono-Pak]) genera un ambiente enriquecido en CO₂ dentro de la bolsa. La incubación de al menos 18 a 24 horas a 35 °C antes de transportarlo a un laboratorio de referencia permite el crecimiento inicial de los microorganismos y reducir la pérdida de viabilidad que puede ocurrir con la utilización de hisopos de transporte.

MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS: INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

Se dispone de diversos medios selectivos enriquecidos para el cultivo de *N. gonorrhoeae*, entre los que se incluyen el medio de Thayer-Martin modificado (MTM), el medio de Martin-Lewis (ML), el medio GC-Lect® (BD Biosciences) y el medio New York City® (NYC). MTM, ML y GC-Lect son medios en base a agar chocolate suplementados con factores de crecimiento para microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, mientras que el medio NYC® es una base de agar almidón de maíz-peptona purificado que contiene levadura dializada, plasma equino citratado y eritrocitos de caballo lisados.²²¹ Estos medios contienen antibióticos que inhiben el desarrollo de otros microorganismos y permiten el aislamiento selectivo de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *N. lactamica* (cuadro 11-2). La vancomicina y la colistina, antibióticos presentes en las cuatro formulaciones, inhiben el desarrollo de bacterias grampositivas y gramnegativas (incluidas las especies saprófitas de *Neisseria*), respectivamente. El agar GC-Lect (BD Biosciences) también contiene lincomicina. La trimetoprim se agrega para inhibir las especies *Proteus* presentes en las muestras rectales y, en ocasiones, cervicovaginales. Nistatina, anfotericina B o anisomicina se agregan para inhibir levaduras y hongos filamentosos. Estos medios permiten el aislamiento selectivo de *N. gonorrhoeae* de sitios del cuerpo que hospedan una gran flora bacteriana endógena. El medio NYC también sustentará el crecimiento de micoplasmas y ureaplasmas genitales. Estos medios se comercializan ya sea en placas de Petri o en placas de JEMBEC. Sus fórmulas están disponibles en las referencias generales de medios de cultivo.

Los medios selectivos comerciales varían en su capacidad para sustentar el crecimiento de especies de *Neisseria* patógenas y para inhibir el crecimiento de neisserias no patógenas y otros contaminantes.⁷³⁰ El fracaso de algunos medios selectivos para sustentar el desarrollo gonocócico también puede deberse a la sensibilidad de algunas cepas de *N. gonorrhoeae* a la vancomicina. Estas cepas explican el porcentaje variable de aislamientos que depende del área geográfica.⁷³⁰ Por ese motivo, es prudente inocular muestras genitales femeninas y masculinas tanto en medios selectivos (p. ej., MTM) como no selectivos (agar chocolate). La inoculación en medios no selectivos permite el aislamiento de otros posibles patógenos del aparato genital, como las especies de *Haemophilus* o *Pasteurella bett-yae* (cap. 9).

Los medios de cultivo para el aislamiento de *Neisseria* deben estar a temperatura ambiente antes de la inoculación y

no deben estar húmedos o secos en exceso. Si la humedad es excesiva en la tapa de las placas, se coloca la parte de arriba de éstas hacia abajo y se entreabren levemente en una estufa de incubación aireada a 35 °C durante 20 a 30 minutos. El “apilador de placas” (BD Biosciences) tiende a cerrarse si la humedad es excesiva y el crecimiento de los microorganismos se retarda. Las muestras recolectadas en los hisopos se hacen rodar firmemente en forma de “Z” sobre el medio selectivo y se siembra en estría con un ansa bacteriológica. Si también se inocula en medios no selectivos, estas placas se siembran en estría para el aislamiento. Las placas se incuban en una estufa de CO₂ o en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela a una temperatura de 35 °C a 37 °C. El nivel de CO₂ de la estufa debe ser 3-7%; concentraciones más altas de CO₂ pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas. Las jarras de anaerobiosis por extinción con vela proveen un nivel de CO₂ de 3-4%. La atmósfera debe ser húmeda y, para las jarras de anaerobiosis, la humedad de evaporación del medio de cultivo durante la incubación es suficiente para el desarrollo del microorganismo. Las estufas de CO₂ que no están equipadas con humidificadores pueden mantener la humedad mediante la colocación de un recipiente con agua sobre el estante inferior. Si se usan jarras de anaerobiosis con vela, las velas deben estar fabricadas con cera blanca o cera de abejas; mientras están encendidas y durante la extinción, las velas coloreadas o con esencias liberan productos volátiles que pueden inhibir el desarrollo de microorganismos. Las placas se inspeccionan a las 24, 48 y 72 horas antes de la emisión del informe final “no desarrolla”. Las colonias sospechosas se subcultivan en agar chocolate, se incuban y se usan como inóculo para los procedimientos de identificación.

***Neisseria meningitidis*
SEGURIDAD EN EL LABORATORIO**

N. meningitidis se clasifica como un microorganismo de nivel 2 de bioseguridad, lo que significa que se debe usar un gabinete de seguridad biológica para la manipulación de las muestras que tienen un riesgo sustancial por la generación de aerosoles (p. ej., pulverización, centrifugación, mezclado con agitadora vorticial). Los informes de infecciones meningocócicas adquiridas en el laboratorio sugieren que la manipulación de los cultivos, más que la de las muestras, aumenta el riesgo de infección para los técnicos y profesionales del laboratorio microbiológico.^{21,141,674} Tales manipulaciones incluyen la preparación de las suspensiones concentradas de microorganismos para la inoculación de los sistemas de identificación y para el seroagrupamiento de los aislamientos meningocócicos mediante aglutinación en portaobjetos. El uso de un gabinete de seguridad biológica cuando se manipulan cultivos podría garantizar la protección del personal del laboratorio con respecto a los microorganismos aerosolizados. Se están implementando otras medidas de protección alternativa (p. ej., protectores de salpicaduras, máscaras). La educación y el cumplimiento de las medidas de seguridad impartidas por el laboratorio deberían reducir al mínimo el riesgo de infecciones meningocócicas para el personal del laboratorio de microbiología clínica. También se deben establecer pautas de laboratorio para situaciones que puedan requerir la implementación de medidas de profilaxis para empleados expuestos a meningococos. Los directores de laboratorio también pueden considerar el ofrecimiento de la vacuna meningocócica cuatrivalente al equipo de trabajo, medida que disminuiría pero no eliminaría el riesgo de infecciones meningocócicas.

Cuadro 11-2 Antibióticos en los medios selectivos para *Neisseria*

ANTIBIÓTICO	FÓRMULA DEL MEDIO (µg/mL)			
	MTM	mL	NYC	GC-LECT
Vancomicina	3	4	2	2
Lincomicina	—	—	—	1
Colistin	7,5	7,5	5,5	7,5
Nistatina	12,5	—	—	—
Anfotericina B	—	20	—	—
Anisomicina	—	—	1,2	1,5
Trimetoprim	5	5	5	5

FROTIS DIRECTOS TEÑIDOS CON GRAM Y PRUEBAS DIRECTAS PARA ANTÍGENOS CAPSULARES

Sobre los frotis teñidos con Gram preparados a partir de muestras clínicas, en particular de LCR, los meningococos aparecen como diplococos gramnegativos tanto fuera como dentro de los leucocitos PMN. Los microorganismos pueden exhibir una considerable variación de tamaño y tienden a resistir la decoloración. Las cepas encapsuladas pueden tener un halo rosado claro alrededor de las células. Como la presencia de células inflamatorias tiene valor pronóstico (p. ej., en el caso de una enfermedad fulminante rápidamente mortal, están presentes muchos microorganismos y unas pocas células inflamatorias), el informe al médico de la tinción de Gram debe incluir la cuantificación de microorganismos y de PMN.

Además de la tinción de Gram y el cultivo de LCR, el laboratorio puede realizar pruebas directas de detección de antígeno para los polisacáridos capsulares meningocócicos.³⁷¹ Las pruebas de antígeno directas usan aglutinación de látex sensibilizado con anticuerpo o coaglutinación para detectar antígenos capsulares de los grupos A, B, C, Y y W135. Estos reactivos se pueden obtener de distintos proveedores (pruebas de látex: Hynson®, Westcott® y Dunning®, Baltimore MD; Murex Diagnostics®, Dartford, Reino Unido; pruebas de coaglutinación: Boule Diagnostics® AB, Huddinge, Suecia). Si bien los resultados positivos de las pruebas con estos reactivos son útiles para el diagnóstico temprano, una prueba negativa no descarta la meningitis causada por cualquiera de los microorganismos que se encuentran comúnmente. Estas pruebas siempre se deben realizar junto con la tinción de Gram y cultivos en medios de agar enriquecidos.

Una modificación reciente de la prueba de aglutinación manual modifica el rendimiento de este ensayo por la presencia de una onda sostenida de ultrasonido. Las partículas de

látex recubiertas de anticuerpos inmersas en la onda se someten a fuerzas físicas que aumentan el contacto entre partículas y se produce una mejoría de la aglutinación en presencia del antígeno, lo que lleva a un aumento de la sensibilidad de la prueba. La aglutinación de látex mejorada con ultrasonido para la detección de serogrupos meningocócicos A, B, C, Y y W135 ha mostrado una mayor sensibilidad con muestras clínicas sin ninguna pérdida de especificidad.^{49,270} Este ensayo se ha usado para mejorar la detección de polisacáridos meningocócicos en suero y para cuantificar la concentración de antígeno en sangre. En un estudio realizado por Sobanski y cols. se detectó una concentración de tan solo 0,05 µg/mL de antígeno con el ensayo mejorado con ultrasonido en comparación con 1,98 µg/mL con el ensayo de aglutinación de látex convencional, lo que representa unas 30 veces de mejoría en la sensibilidad de la prueba.⁶⁰⁹

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Las muestras útiles para el diagnóstico de enfermedad meningocócica son LCR, sangre, muestras de biopsia y material de aspiración, e hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos. A veces se solicita la detección de meningococos en esputo y aspirados transtraqueales. Los procedimientos de recolección y procesamiento de las muestras a los que puede someterse *N. meningitidis* se presentan en el recuadro 11-6. Los aislamientos genital, rectal y orofaríngeo de *N. meningitidis* se pueden obtener usando los procedimientos de recolección e inoculación descritos para *N. gonorrhoeae* en el recuadro 11-5. Las condiciones de incubación para el medio inoculado con las muestras son las mismas que las ya detalladas para *N. gonorrhoeae*. Los meningococos crecen bien en todos los medios selectivos para las neisserias patógenas, y no se describieron

Recuadro 11-6 Procedimientos de recolección de muestra para el aislamiento de *Neisseria meningitidis*

Muestra	Procedimiento de recolección
LCR	En los casos de meningitis meningocócica sospechosa, se debe enviar al laboratorio tanto LCR como sea posible (como mínimo 1 mL) para cultivar, porque pueden estar presente escasos microorganismos. La muestra de LCR se debe transportar manualmente al laboratorio después de su recolección y no debe refrigerarse. Una alícuota del LCR debe centrifugarse para la tinción de Gram. Si hay cantidad suficiente de LCR, la muestra debe centrifugarse y el "botón" aglutinado debe ser inoculado en agar sangre y agar chocolate.
Sangre	La sangre debe cultivarse como se describió en el recuadro 11-5. Se prefiere la inoculación directa de la sangre en los frascos de hemocultivo más que en los tubos SPS Vacutainer® debido a los reconocidos efectos inhibitorios del SPS sobre los meningococos. Esta inhibición puede superarse por el agregado de gelatina estéril al 1% (volumen final) al medio del hemocultivo. El uso del sistema Isolator® para hemocultivos evita el problema de la inhibición del SPS.
Petequias	Las muestras de lesiones cutáneas petequiales pueden recolectarse por inyección y aspiración de pequeñas cantidades de solución salina estéril en el borde de la lesión, usando una jeringa de tuberculina. Los aspirados se cultivan directamente en agar sangre y agar chocolate. Debido a que algunas lesiones son el resultado del fenómeno inmunitario, el cultivo de lesiones cutáneas puede no contribuir para el diagnóstico.
Hisopados nasofaríngeos	Los hisopados nasofaríngeos son importantes, en particular, para detectar colonización de individuos que son contactos cercanos a los casos de infección meningocócica y para el reconocimiento de portadores. Para estas muestras, se pasa un hisopo fino en un hilo de metal flexible (p. ej., un hisopo nasofaríngeo de alginato de calcio) a través de la orofaringe y detrás de la úvula. Por lo general, los hisopados de fauces recolectados con cuidado proveerán la misma información. Estas muestras se inoculan en un medio selectivo, como MTM.
Biopsias	Las muestras de biopsia deben enviarse al laboratorio en recipientes estériles. Deben humedecerse con solución salina o caldo estériles y no se deben refrigerar. En el laboratorio, las muestras deben ser sembradas aparte y cultivadas en agar sangre y agar chocolate.
Aspirados	Los aspirados de espacios cerrados se recolectan con aguja y jeringa. En el laboratorio, estas muestras se inoculan en agar sangre y agar chocolate.

cepas sensibles a la vancomicina. Contrariamente a las creencias sostenidas durante mucho tiempo, la mayoría de las cepas de *N. gonorrhoeae* crecerán en agar sangre de carnero comercial, aunque no tan bien como en agar chocolate. El aislamiento de gonococos y meningococos en los hemocultivos puede estar afectado de modo adverso por el anticoagulante polianetolsulfonato de sodio (SPS) presente en los medios de hemocultivo. Este efecto se puede neutralizar por el agregado de gelatina estéril (1% de concentración final) al medio o por el procesamiento de la muestra de sangre mediante lisis por centrifugación (Isolator®).^{212,487,593}

AISLAMIENTO E INCUBACIÓN

Para el aislamiento de *N. meningitidis*, las muestras de LCR deben cultivarse en agar chocolate no selectivo y en agar sangre de carnero como se describe en el recuadro 11-6, mientras que las muestras que pueden contener otros microorganismos (p. ej., muestras de hisopados orofaríngeo y nasofaríngeo) deben inocularse en medios selectivos (p. ej., agar MTM, Martin-Lewis, NYC o GC Lect) y en medios no selectivos. Las placas se incuban en 5-7% de CO₂ a 35 °C (estufa de CO₂ o jarra de anaerobiosis por extinción con vela) y se inspeccionan después de 24, 48 y 72 horas antes de emitir un informe final que indique “no desarrolla”. Las colonias sospechosas se subcultivan en agar sangre y agar chocolate para la identificación posterior.

Identificación de especies de *Neisseria*

Morfología de las colonias

Los gonococos producen varios tipos de colonias en los cultivos. En el esquema de Kellogg, estos tipos se denominan desde T1 hasta T5 y se describen en función del tamaño de la colonia y de otras características (coloración, topografía de las colonias, reflexión de la luz, etc.).³⁴⁵ A nivel celular individual, los microorganismos que constan de colonias tipo P⁺ y P⁺⁺ (antes T1 y T2, respectivamente) tienen pili sobre la superficie celular, mientras que las células de las colonias tipo P⁺ (T3, T4 y T5) carecen ellos. Los aislamientos obtenidos de cultivos primarios son en su mayoría colonias del tipo P⁺ y P⁺⁺. Estas colonias tienden a ser pequeñas, brillantes y elevadas (lámina en color 11-1C). Se puede mantener el cultivo con este tipo colonial subcultivando colonias con pili. Las suspensiones de microorganismos preparadas a partir de cultivos de 18-24 horas que contienen en principio colonias del tipo P⁺ y P⁺⁺ tienden a ser uniformes y homogéneas. Con subcultivos en medios no selectivos (un “barrido” de desarrollo), los otros tipos de colonias se harán más evidentes, con todas las colonias por último convertidas en variedades sin pili. Estos tipos de colonias son más grandes, más aplanadas y no tienen el brillo característico de las colonias con pili. Los cultivos en los que predominan los tipos de colonias grandes con frecuencia no forman suspensiones uniformes, porque las colonias se vuelven gomosas debido a la autólisis y la liberación de DNA celular. La presencia de todos los tipos de colonias en un subcultivo de una placa primaria a menudo puede dar la apariencia de un cultivo mixto. La observación cuidadosa y el subcultivo con el uso de un microscopio de disección (10×) permiten familiarizarse con este tipo de colonias (lámina en color 11-1D). La variación en el tipo de colonia se observa con aislamientos frescos de *N. gonorrhoeae*. Los gonococos atípicos (aquellos con requerimientos nutricio-

nales múltiples, como las cepas que requieren AHU) también producen varios tipos de colonias, pero éstas crecen más lentamente y requieren la observación con un microscopio de disección para la detección y caracterización del tipo de colonia.⁴⁵³

Otro sistema descriptivo considera las características de opacidad de las colonias de los gonococos determinadas por examen del desarrollo en un medio transparente mediante ampliificación e iluminación desde la parte inferior del microscopio. Las colonias opacas, sin tener en cuenta la forma, se denominan O⁺ y O⁺⁺, mientras que las transparentes se llaman O⁻. Los tipos T de colonias descritos por Kellogg y cols.³⁴⁵ pueden reconocerse en cultivos habituales en agar chocolate o MTM; sin embargo, el medio transparente apropiado para determinar la opacidad característica de las colonias no siempre es accesible.

Los meningococos crecen bien tanto en agar sangre como en agar chocolate, así como en medios selectivos para las *Neisserias* patógenas (lámina en color 11-1F). Las cepas capsuladas de *N. meningitidis* pueden aparecer mucosas en agar. La mayoría de los aislamientos meningocócicos son grisáceos y pueden mostrar una reacción verdosa difusa en áreas de crecimiento confluyente. Algunos pueden tener una pigmentación levemente amarillenta. La variación en los tipos de colonias puede observarse con algunos aislamientos frescos.

Tinción de Gram y prueba de la oxidasa

Las placas primarias para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* debe examinarse después de 24, 48 y 72 horas de incubación usando una lupa o, de preferencia, un microscopio de disección. Los frotis de colonias sospechosas deben examinarse con la tinción de Gram y debe realizarse la prueba de la oxidasa. En la tinción de Gram de la colonia deben verse diplococos gramnegativos característicos, uniformes. Algunos de los microorganismos pueden aparecer como tétradas, en particular en los frotis de colonias jóvenes. Los microorganismos en los frotis de cultivos viejos pueden parecer hinchados y mostrar una amplia variación en la intensidad de la contratinción. Los frotis de colonias parcialmente autolisadas pueden presentar dificultades de interpretación. El examen de la tinción de Gram es esencial para la identificación presuntiva porque en los medios selectivos también pueden crecer otros microorganismos, en particular de las muestras orofaríngeas (tratadas más adelante).

Los resultados de las pruebas de la oxidasa se obtienen con el derivado tetrametil del reactivo de oxidasa (*N,N,N,N*-tetrametil-1,4-fenilendiamina al 1% en solución acuosa). Esta solución se coloca sobre un trozo de papel de filtro y una porción del desarrollo de la colonia se frota en el reactivo con un anso de platino, un hisopo de algodón o un palillo aplicador de madera. En cultivos jóvenes aparecerá un color violeta oscuro dentro de los 10 segundos. Se obtienen excelentes resultados con los reactivos de oxidasa envasados en ampollas de vidrio rompibles (p. ej., BACTIDROP® Oxidase, Remel Laboratories).

Prueba de Superoxol®

El Superoxol®, otra prueba útil para la identificación presuntiva rápida de *N. gonorrhoeae*,⁵⁶⁷ es peróxido de hidrógeno al 30% (no la solución al 3% usada para la prueba de la catalasa). Las cepas de *N. gonorrhoeae* producen de inmediato un burbujeo efervescente cuando algo del material de la colonia se emulsiona con el reactivo sobre un portaobjetos de vidrio. Tanto *N. meningitidis* como *N. lactamica*, la otra especie que

crece en medios selectivos, producen burbujeo demorado y débil. En un estudio que usa esta prueba en microorganismos aislados en medios selectivos, 201 gonococos probados producían de inmediato un burbujeo vigoroso en Superoxol, mientras que 241 de 242 meningococos y una de dos cepas de *N. lactamica* producían reacciones positivas débiles, demoradas o negativas.⁵⁶⁷

Diferenciación de otros microorganismos en medios selectivos

Tanto la identificación presuntiva como la confirmatoria de las especies de *Neisseria* dependen de la capacidad de diferenciar estos microorganismos de otros que también pueden crecer en medios selectivos. Estos son *Kingella denitrificans*, especies de *Moraxella* (además de *M. catarrhalis*), especies de *Acinetobacter* y especies de *Capnocytophaga*. *K. denitrificans* crece bien en el medio MTM y produce tipos de colonias que se asemejan a las de *N. gonorrhoeae*.²⁹⁸ Una prueba útil para identificar en forma presuntiva los gonococos y diferenciarlos de *K. denitrificans* es la **prueba de la catalasa**. Los gonococos producen un burbujeo vigoroso cuando el desarrollo de la placa se sumerge en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (H_2O_2): *K. denitrificans* produce una reacción catalasa negativa. *M. catarrhalis* y otras especies de *Moraxella*, como los gonococos, son oxidasa positivas y catalasa positivas. Estos microorganismos pueden diferenciarse de *Neisseria* por la **prueba del disco de penicilina**.¹²³ El microorganismo se subcultiva en una placa de agar sangre triptica soja y se siembra para obtener un desarrollo confluyente. Luego se coloca un disco de sensibilidad de penicilina (10 unidades) sobre el inóculo. Después de una incubación de toda la noche en CO_2 , se prepara una tinción de Gram a partir del desarrollo en el borde de la zona de inhibición. Las especies de *Neisseria* y *M. catarrhalis* retendrán su morfología de diplococos, aunque las células pueden aparecer hinchadas. Las especies de *Moraxella* coccobacilares formarán filamentos largos o células en forma de huso bajo la influencia de las concentraciones subinhibitorias de la penicilina. Las especies de *Acinetobacter* pueden diferenciarse por su reacción oxidasa negativa. Las especies de *Capnocytophaga* aparecen como bacterias fusiformes, levemente curvadas, gramnegativas, con tinción pálida, y tanto la reacción de la oxidasa como la de la catalasa son negativas. Durante la incubación prolongada (mayor de 48 horas) estos microorganismos tienden a diseminarse debido a su movilidad deslizante y pueden impedir la recuperación de los gonococos de muestras orofaríngeas.

Criterios presuntivos para la identificación de *N. gonorrhoeae*

Todos los diplococos gramnegativos y oxidasa positivos que se aíslan en sitios urogenitales y que crecen en medios selectivos pueden ser identificados como *N. gonorrhoeae*. El Superoxol, descrito antes, proporciona una prueba presuntiva adicional para identificar estos microorganismos. Sin embargo, las pruebas de identificación confirmatoria se recomiendan para todas las cepas y son necesarias para la identificación de los aislamientos de sitios extragenitales (faringe, recto, sangre, líquido articular, LCR). Además, los gonococos sospechosos aislados en niños deben confirmarse por al menos dos métodos diferentes que involucren principios distintos.^{20,712} Éstos pueden incluir las pruebas de utilización de hidratos de carbono, métodos inmunológicos (p. ej., pruebas de fluorescencia con anticuerpos monoclonales; pruebas de coagulación), procedimientos enzimáticos (p. ej., detección cromogénica de activi-

dades enzimáticas específicas) o la prueba de confirmación del cultivo con sondas de DNA (véase más adelante). Ésta es extremadamente importante debido a ciertas consecuencias médico-legales y sociales que ocurren tras la publicación de los resultados.

Pruebas de identificación para especies de *Neisseria*

Las pruebas confirmatorias para gonococos, meningococos y otras especies de *Neisseria* incluyen las pruebas de utilización de hidratos de carbono, las pruebas cromogénicas de enzima sustrato, las pruebas inmunológicas (p. ej., anticuerpos fluorescentes, coagulación estafilocócica y otras), sistemas de identificación multiprueba y pruebas con sondas de DNA. Las pruebas de utilización de hidratos de carbono y los sistemas de identificación multiprueba se pueden usar para identificar *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y otras especies de *Neisseria*. Los procedimientos de identificación con sustratos cromogénicos se limitan a identificar aislamientos que crecen en medios selectivos (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica* y algunas cepas de *M. catarrhalis*). Los anticuerpos fluorescentes, la coagulación, otras pruebas inmunológicas y la prueba de confirmación de cultivo con sondas de DNA son accesibles sólo para la identificación de *N. gonorrhoeae*. Los procedimientos más nuevos de amplificación de ácidos nucleicos e hibridación de ácidos nucleicos están aprobados sólo para la detección directa de *N. gonorrhoeae* del aparato genital y de muestras de orina.

Pruebas de utilización de hidratos de carbono

MEDIO CTA CONVENCIONAL CON HIDRATOS DE CARBONO

La técnica convencional para la identificación de especies de *Neisseria* usa un medio semisólido de agar base cistina-triptica (CTA) que contiene 1% de hidratos de carbono y un indicador de pH rojo de fenol (lámina en color 11-1E). La serie de pruebas más común incluye CTA-glucosa, -maltosa-sacarosa y -lactosa, más un control CTA sin hidratos de carbono. El análogo estructural de la lactosa, *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), puede ser sustituido por el tubo de lactosa y el agregado de fructosa a la serie de pruebas es útil para la identificación de varias biovariedades de *N. subflava*. Algunas formulaciones comerciales de CTA pueden ser suplementadas con líquido ascítico para sustentar el desarrollo de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Los medios CTA se inoculan con una suspensión densa de los microorganismos para ser identificados a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en agar chocolate. El inóculo se prepara en 0.5 mL de solución fisiológica y se divide entre los tubos o cada tubo se inocula en forma individual con una ansa del microorganismo. El inóculo está limitado a los 1.25 cm superiores de los tubos profundos de agar. Los tubos se colocan en una estufa sin CO_2 a 35 °C con las tapas bien apretadas. Con un inóculo cargado, la mayoría de los aislamientos producen un cambio de color detectable en el indicador rojo de fenol dentro de las 24 horas. Si el inóculo está suficientemente cargado, muchas cepas cambiarán el indicador dentro de las 4 horas. Sin embargo, algunas cepas gonocócicas con requerimientos nutricionales especiales pueden necesitar 24 a 72 horas para producir ácido suficiente para cambiar el indicador. Como el medio CTA que contiene 1% de hidratos de carbono se usa en principio para la detección de ácido producido por microorganismos fermentadores, la escasa cantidad de ácido producido en forma oxidativa por algunas cepas de especies de *Neisseria* no puede detectarse.

PRUEBA RÁPIDA DE UTILIZACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Esta prueba es un método dependiente de la falta de crecimiento para detectar la producción de ácido a partir de los hidratos de carbono. En este método, se fraccionan pequeños volúmenes de una solución salina equilibrada (BSS; pH 7,0) con indicador rojo de fenol en tubos no estériles a los cuales se les agrega unas gotas de una solución de hidratos de carbono al 20% esterilizada y filtrada (lámina en color 11-1G). Se prepara una suspensión densa del microorganismo en BSS con un ansa bacteriológica; esta suspensión puede mezclarse en un agitador vorticial para dispersar las aglutinaciones. Se agrega una gota de suspensión a cada tubo que contiene hidratos de carbono. Los tubos se incuban durante 4 horas a 35 °C en una estufa sin CO₂ o en un baño de agua. Este método es muy económico, los reactivos son fáciles de preparar e inocular, y los resultados son bien definidos. Los detalles de este método se presentan en el protocolo 11-1. La clave de esta técnica es el uso de hidratos de carbono de "grado reactivo". La maltosa produce resultados positivos o ambiguos para *N. gonorrhoeae* en la prueba de degradación rápida de hidratos de carbono, debido tal vez a la presencia de glucosa contaminante. Los inóculos para este procedimiento pueden obtenerse del cultivo primario si hay suficientes colonias y si el desarrollo tiene un tiempo menor de 24 horas. Como el crecimiento bacteriano no sucede en el medioambiente de prueba, los escasos contaminantes que pueden estar presentes no interfieren en los resultados. Sin embargo, la incubación no puede continuarse durante toda la noche.

PRUEBA RIM-NEISSERIA® (MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICACIÓN DE NEISSERIA)

En el sistema de este equipo (Remel Laboratories), se agregan pequeñas cantidades (dos a tres gotas) de soluciones de hidratos de carbono (glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa) y rojo fenol al 2% bufferadas y un buffer control sin hidratos de carbono a cinco microtubos bufferados no estériles incluidos en el equipo. Los inóculos de un cultivo puro de 18 a 24 horas de diplococos gramnegativos, oxidasa positivos, que se desarrollaron en un medio selectivo o de un subcultivo en agar chocolate, se disponen en cada uno de los tubos con pequeñas ansas plásticas provistas en el equipo. Después de la inoculación, los tubos se colocan en un agitador vorticial durante 10 segundos y se incuban al aire a 35 °C durante una hora. La producción de ácido se indica por un cambio en el indicador rojo de fenol de rojo rosado a amarillo o amarillo naranja. En las reacciones negativas de los hidratos de carbono permanece el color rojo rosado o se vuelve levemente rosa anaranjado. En una evaluación de este sistema realizada en la University of Illinois, el sistema RIM-*Neisseria* identificaba el 98% de 176 *N. gonorrhoeae*, el 99% de 173 *N. meningitidis*, el 94% de 48 *N. lactamica*, y el 100% de 12 *M. catarrhalis* dentro de los 60 minutos.³²² De los microorganismos identificados correctamente después de una hora, 94% de los gonococos, 99% de los meningococos y 84% de las cepas de *N. lactamica* fueron identificados dentro de los primeros 30 minutos. Otros investigadores también informaron una buena concordancia de la prueba RIM-*Neisseria* con los métodos convencionales.^{188,197,254,374,543} También se comercializa una prueba similar de DNasa inoculada para la confirmación de *M. catarrhalis*.

OTROS MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

El equipo de la prueba *Neisseria-Kwik*® (Micro-Biologics, St Cloud MN) y el Gonobio-Test® (I.A.F. Production, Inc.,

Laval, Québec, Canadá) también son modificaciones comerciales del procedimiento de la prueba rápida de hidratos de carbono. El *Neisseria-Kwik*® usa una cubeta que contiene hidratos de carbono deshidratados en pocillos separados. Se inocula cada pocillo con una suspensión cargada del microorganismo preparada en buffer y los resultados se leen después de 3 a 4 horas registrando cambios en el color de los indicadores. El Gonobio-Test es un método de 2 horas que requiere una inoculación cargada en los microtubos que contienen como sustratos los hidratos de carbono. Estos dos sistemas fueron evaluados y comparados con los métodos convencionales.¹⁸⁸

Pruebas cromogénicas de enzima sustrato

Los sistemas de identificación enzimáticos usan sustratos bioquímicos específicos que, después de la hidrólisis por enzimas bacterianas, producen un producto final coloreado que se detecta directamente (p. ej., amarillo de nitrofenol o producto de nitroanilina) o después de la adición de un diazorreactivo acoplador de color (reactivo cinamaldehído para la detección de β -naftilamida). El uso de estos sistemas está limitado a especies capaces de crecer en medios selectivos: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *N. lactamica*. Como algunas cepas de *N. catarrhalis* se desarrollan en medios selectivos, estos sistemas también proveerán una identificación presuntiva de este microorganismo. Las pruebas de identificación con sustratos cromogénicos no deben usarse para identificar meningococos sospechosos que crecen en agar sangre o agar chocolate sin antes subcultivarlos en medios selectivos. Las actividades enzimáticas que se detectan en estos sistemas son β -galactosidasa, γ -glutamil aminopeptidasa y prolil-hidroxiprolil aminopeptidasa (cuadro 11-3). β -galactosidasa y γ -glutamil aminopeptidasa son específicas para *N. lactamica* y *N. meningitidis*, respectivamente. En ocasiones, las cepas de *N. meningitidis* carecen de actividad γ -glutamil aminopeptidasa; en 2002, se encontró una cepa meningocócica aislada de un portador que carece de esta enzima a causa de la presencia de una mutación de inserción en el gen *ggt*.⁶⁴⁰ La ausencia de estas actividades y la presencia de prolil-hidroxiprolil aminopeptidasa identifican un microorganismo como *N. gonorrhoeae*. *M. catarrhalis* carece de las tres actividades enzimáticas. Los sistemas comerciales que usan este enfoque son el Gonochek II®, el BactiCard *Neisseria*® y el Neisstrip®.

GONOCHEK II®

El Gonochek II (EY Laboratorios, San Mateo, CA) es un único tubo que contiene tres sustratos cromogénicos deshidratados (lámina en color 11-1H). Después de la rehidratación con gotas de solución salina buffer-fosfato (pH 7,4), se emulsionan en el tubo con un palillo aplicador de madera 5 a 10 colonias de diplococos gramnegativos, oxidasa positivos de un cultivo puro que se desarrolla en un medio selectivo o de un subcultivo disponible. Se tapa el tubo y se incuba a 35 °C durante 30 minutos. Las reacciones de color específicas en la suspensión bacteriana confirman el aislamiento como *N. meningitidis* (hidrólisis de γ -glutamil-*p*-nitroanilida; amarillo) o *N. lactamica* (hidrólisis de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido; azul). Si la suspensión es incolora al final del período de incubación, el tapón se separa y su parte superior se inserta en el tubo. El tubo se invierte de modo que la suspensión bacteriana se ponga en contacto con el diazorreactivo acoplador de color (sal de *o*-aminoazotolueno diazonio [Fast Garnet®] presente en el tapón. La detección de β -naftilamina liberada por la

Cuadro 11-3 Actividades enzimáticas usadas para la identificación de especies de *Neisseria* patógenas

ESPECIES	β-GALACTOSIDASAS	(γ-GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA	HIDROXIPROLIL AMINOPEPTIDASA	BUTIRATO ESTEARASA
<i>N. lactamica</i>	+	—	+	—
<i>N. meningitidis</i>	—	+	V	—
<i>N. gonorrhoeae</i>	—	—	+	—
<i>M. catarrhalis</i>	—	—	—	+

+ : reacción positiva; — : reacción negativa; V : reacción variable.

actividad hidroxipropil aminopeptidasa bacteriana (rojo) identifica el microorganismo aislado como *N. gonorrhoeae*. La ausencia de un producto de color cuando se completa la prueba y los pasos de lectura provee una identificación presuntiva de *M. catarrhalis*. En una gran evaluación de este sistema, el Gonochek II identificó el 99% de 176 gonococos, el 97% de 173 meningococos y el 100% de 48 *N. lactamica* y 10 *M. catarrhalis*, respectivamente.³²² Otros investigadores han evaluado también el Gonochek II y lo han encontrado confiable para la identificación de estos microorganismos.^{188,707}

BACTICARD NEISSERIA®

El BactiCard *Neisseria*® (Remel Laboratorios, Lenexa KA) usa cuatro sustratos cromogénicos que están impregnados en cuatro círculos de pruebas individuales dentro de una tarjeta de cartón (lámina en color 11-2A). Después de humectar cada uno de los cuatro círculos con una única gota de líquido de rehidratación, se frota varias colonias de los microorganismos tomadas de medios selectivos (o de un subcultivo de medios selectivos) en cada una de las cuatro áreas de la prueba. Luego de 2 minutos de incubación sobre la mesada, se inspecciona el círculo del sustrato de indoxil butirato estearasa (IB; 5-bromo-4-cloro-3-indolil butirato) para observar la aparición de un color azul a azul verdoso. Si la prueba es positiva, el microorganismo puede ser identificado como *M. catarrhalis* y no es necesaria otra prueba. Si la prueba IB es negativa, la tarjeta se incuba en la mesada durante unos 13 minutos más (tiempo total de la prueba, 15 minutos). Pasado ese tiempo, se inspecciona el círculo del sustrato de β-galactosidasa (BGAL; 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) para observar la presencia de color azul verdoso. Si la prueba es positiva, el microorganismo puede identificarse como *N. lactamica* y no se necesitan pruebas adicionales. Si la prueba BGAL es negativa, se coloca una sola gota del reactivo que desarrolla color sobre los círculos de las pruebas del prolilaminopeptidasa (PRO; L-prolina-β-naftilamida) y de γ-glutamil aminopeptidasa (GLUT; γ-glutamil-β-naftilamida). Estas dos pruebas son rojas cuando son positivas si aparece un color rosa o rojo definido dentro de los 30 segundos del agregado del reactivo. Una reacción PRO positiva identifica al microorganismo aislado como *N. gonorrhoeae*, mientras que una reacción GLUT positiva la identifica como *N. meningitidis*. La reacción PRO también puede ser positiva para algunas cepas de *N. meningitidis*. En la University of Illinois, la prueba BactiCard *Neisseria* se comparó con los procedimientos de identificación convencionales para 558 aislamientos. BactiCard *Neisseria* identificó el 100% de 254 *N. gonorrhoeae*, el 100% de 125 *N. meningitidis*, el 98,2% de 54 *N. lac-*

tamica y el 98,4% de 125 cepas de *M. catarrhalis*.³²³ Un tercer producto, Neisstrip® (Lab M Ltd., Bury, Reino Unido) es muy similar a BactiCard *Neisseria*, pero no tiene el reactivo indoxil butirato para identificar *M. catarrhalis*. Dealler y cols. informaron que el Neisstrip identificó 93 de 95 cepas gonocócicas y 2 de 400 cepas no gonocócicas fueron mal identificadas con esta tira.¹⁷⁸

Métodos inmunológicos para la confirmación del cultivo de *N. gonorrhoeae* IMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

Por lo general, el procedimiento de confirmación de cultivos con inmunofluorescencia directa (IFD) usa anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos en la proteína de la membrana externa PorA (la antigua proteína I), la principal proteína de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*.³⁷⁸ La prueba de IFD (*Neisseria gonorrhoeae* Culture Confirmation Test®; Wampole Laboratorios, Cranberry, NJ) se realiza mediante la preparación de una tenue suspensión de microorganismos en 5 µL de agua en un portaobjetos para IFD; se permite secar la suspensión, se fija la muestra al calor, se cubre el frotis con el reactivo para IFD y se incuba durante 15 minutos. El frotis se lava, se seca al aire, se cubre con un cubreobjetos y se observa con un microscopio de fluorescencia. Los gonococos aparecen como diplococos fluorescentes color verde manzana (lámina en color 11-2B).

Cuando esta prueba fue comercializada por Syva en 1986, se informaron sensibilidades y especificidades del 100%.^{197,378,708} En 1989, Walton informó el aislamiento de dos cepas de *N. gonorrhoeae* β-lactamasa positivas, IFD negativas de dos parejas sexuales.⁷⁰³ Boehm y cols. comunicaron el 100% de sensibilidad y de especificidad para la prueba, pero mencionaron que se había aislado una cepa β-lactamasa positiva. IFD negativa luego de completar sus estudios.⁷⁵ En 1993, Janda y cols. hallaron que la prueba IFD identificaba en forma correcta el 95,4% de 151 cepas β-lactamasa negativas, pero sólo el 74,4% de 43 cepas β-lactamasa positivas.³²³ En otro estudio de 1993, Beebe y su equipo de trabajo encontraron que 18 (4,6%) de 395 cepas de gonococos aisladas durante 1991 y 1992 eran IFD negativas; 6 de 18 cepas eran β-lactamasa positivas.⁵⁵ Los datos de serotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado indican que las variedades productoras y no productoras de β-lactamasa que eran negativas con el reactivo para IFD pertenecen a diversas serovariedades.^{55,65,323,607} El "cóctel" de anticuerpos monoclonales anti-Por común usados en el producto Syva original es fabricado por Trinity Biotech (Wicklow, Irlanda) y

no ha sido cambiado desde que el producto fue vendido a Wampole Laboratories. A la luz de los estudios citados con anterioridad, los anuncios del 99,6% de sensibilidad y de 100% de especificidad ya no eran válidos. Por ese motivo, los aislamientos que fracasan en la tinción con el reactivo de IFD deben ser identificados por otros métodos. Esta advertencia limita las ventajas reales del procedimiento de IFD, que incluyen su rapidez, la capacidad para probar colonias directamente de cultivos primarios y el escaso crecimiento requerido para realizar la prueba. La prueba de IFD no está destinada a la detección e identificación directa de los microorganismos en frotis de muestras de pacientes.

PRUEBAS DE COAGULINACIÓN

Las pruebas de coagulación hacen uso de la capacidad de la proteína A en las células de *Staphylococcus aureus* para unirse a moléculas de IgG por su región Fc. La unión del anticuerpo anticonocócico a las células muertas de *S. aureus* y la mezcla posterior con una suspensión de gonococos causa una aglutinación visible de la suspensión. En la actualidad se venden dos pruebas de coagulación para la identificación de *N. gonorrhoeae*, el Phadebact Monoclonal GC® y la prueba GonoGen I®. El Phadebact Monoclonal GC® (Boule Diagnostics AB, Huddinge, Suecia) usa anticuerpos monoclonales para Por gonocócica (proteína I). A diferencia de la prueba GC OMNI® comercializada antes por Boule Diagnostics, la prueba monoclonal GC contiene un reactivo que reacciona con el serogrupo WI de las cepas de *N. gonorrhoeae* y un segundo reactivo que reacciona con las cepas del serogrupo WII/WIII. Como no está incluido un reactivo de control negativo, los aislamientos gonocócicos reaccionarán con el reactivo WI o con el reactivo WII/WIII, según la composición del antígeno Por del aislamiento individual. La falta de aglutinación en cualquiera de los reactivos constituye una prueba negativa. Para realizar la prueba, se prepara una suspensión (0,5 del estándar de McFarland) en un buffer salino (pH 7,2 a 7,4) y se hierve durante 5 minutos. Después que se enfría, la suspensión se mezcla con reactivos control y prueba sobre un portaobjetos con la tarjeta de cartón. La aglutinación dentro de un minuto es un resultado positivo de la prueba. Se incorpora un colorante azul en los reactivos para ayudar a visualizar la aglutinación contra el fondo blanco de la tarjeta. Es necesario prestar atención a los detalles del procedimiento para evitar resultados falsos negativos y falsos positivos. Las evaluaciones de la prueba GC OMNI disponible con anterioridad informaron una sensibilidad del 98-100% y una especificidad del 99-100%.^{188,197,323} Las suspensiones de microorganismos más concentradas que la densidad McFarland especificada pueden dar resultados falsos positivos. Además, se ha informado que el uso de solución salina con pH menor o mayor de 7,4 produce resultados falsos positivos con algunas cepas de *N. lactamica*, *N. cinerea* y *M. catarrhalis*.^{188,323}

La prueba GonoGen I (New Horizons Diagnostics, Columbia MD) también usa células estafilocócicas recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de la membrana externa Por de varias serovariedades gonocócicas.⁴⁴⁴ Se realiza usando una suspensión hervida (McFarland 3) del microorganismo. Los resultados por lo general son bien definidos y aparecen dentro de los 15 a 30 segundos de la mezcla de los reactivos de la prueba y la suspensión. El equipo contiene reactivos de coagulación de control y de prueba, además de suspensiones de control positivas y negativas para la prueba gonocócica. Las evaluaciones de esta prueba han informado

una sensibilidad del 86-100% y una especificidad del 99-100%.^{24,323,346,379,444}

PRUEBA GONOGEN II®

El GonoGen II® (New Horizons Diagnostics, Columbia MD) usa anticuerpos monoclonales anti-Por conjugados con oro coloidal como reactivo de detección. Se prepara una suspensión (McFarland 1) en 0,5 mL de una solución de microorganismos lisados y se agrega una gota del reactivo anticuerpo. Después de 5 minutos, se pasan dos gotas de la suspensión a través de una membrana filtrante que retiene los complejos antígeno-anticuerpo. La retención y la concentración del complejo en el filtro vuelven el filtro de color rojo, identificador del microorganismo como *N. gonorrhoeae*. En los aislamientos no gonocócicos el filtro permanece blanco o rosa pálido. Janda y cols. observaron que el GonoGen II identificaba el 91,8% de 194 cepas de *N. gonorrhoeae*; cinco fueron negativas y 11 produjeron reacciones de color dudosas en la membrana. Además, una variedad menigocócica y dos cepas de *N. lactamica* produjeron en forma repetida resultados falsos positivos.³²³ Kellogg y Orwing hallaron que el GonoGen II identificaba 99,6% de 248 cepas gonocócicas, pero 7 de 22 cepas de *N. meningitidis* producían resultados falsos positivos. Estos investigadores sugirieron que los resultados positivos de la prueba GonoGen II necesitan la confirmación con otro método.³⁴⁶

Sistemas de identificación multipruebas

Se comercializan cuatro sistemas de equipos que pueden usarse no sólo para identificar especies de *Neisseria* sino también para otros gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales. Estos son: el sistema rapID NH® (*Neisseria-Haemophilus*) (Remel Laboratories: lámina en color 11-2C), la tarjeta Vitek NHI® (*Neisseria-Hemphilus* Identification) (bioMérieux, Inc., Hazelwood MO), el panel de identificación *Haemophilus-Neisseria* (HNID®) (Dade/American Microscan, Sacramento CA; lámina en color 11-2D) y el sistema API NH® (bioMérieux, Inc., La Balme-les-Grottes, Francia).^{47,197,318,319} Véase la lámina en color 11-2E y F. Todos estos sistemas usan pruebas convencionales modificadas (p. ej., producción de ácido a partir de hidratos de carbono, ureasa, indol, ornitina descarboxilasa) y sustratos cromogénicos para proporcionar identificaciones de 2 o de 4 horas de *Neisseria*, *Haemophilus* y otras bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales encontradas en muestras clínicas. La tarjeta NHI de bioMérieux, brinda por lo general excelentes resultados para las especies de *Neisseria* patógenas y también identifica *N. cinerea*.³¹⁹ Sin embargo, las cepas de *M. catarrhalis* no pueden diferenciarse de otras especies de *Moraxella* con las pruebas actuales de la tarjeta. El panel MicroScan HNID no incluye *N. cinerea* en su base de datos y estos microorganismos se identifican mal como *N. gonorrhoeae* o *M. catarrhalis* cuando se probaron con este sistema.³¹⁸ Además, algunas cepas de *N. meningitidis* no producen reacciones definidas con pruebas claves de identificación en el panel (producción de ácido de maltosa o actividad de γ -glutamyl aminopeptidasa), lo que da lugar a identificaciones erróneas. El RapID NH contiene pruebas (p. ej., reducción de nitrito y un sustrato de estearasa) que se presume permitirán la identificación confiable tanto de *N. cinerea* como de *M. catarrhalis*. Una sola evaluación de este sistema indicó que RapID NH fue confiable para la identificación de las especies de *Neisseria*, pero que algunas reacciones fueron difíciles de interpretar.¹⁸⁸ En el estudio de Barbe y cols., el sis-

tema API NH identificó gonococos, meningococos, *N. lactamica* y *M. catarrhalis* dentro de las 2 horas, mientras que otras especies de *Neisseria* requerían pruebas adicionales para la identificación correcta de las especies.⁴⁷

Pruebas de sondas de DNA para la confirmación del cultivo de *N. gonorrhoeae*

La prueba de confirmación de cultivos de *N. gonorrhoeae* Accuprobe® (GenProbe®) identifica *N. gonorrhoeae* por la detección de secuencias rRNA específicas de especie. En la prueba, se lisan los microorganismos que crecieron en un medio con agar y se mezclan con una sonda de DNA monocatenario marcada con quimioluminiscencia complementaria al rRNA gonocócico. Después que sucede la hibridación, el complejo sondas DNA/rRNA bicatenario se selecciona por un proceso químico, y la presencia de la sonda en el material bicatenario se detecta por el agregado de reactivos de detección que hidrolizan la marca quimioluminiscente en la sonda, con lo que se libera energía lumínica. Esta energía se detecta en un instrumento llamado quimioluminómetro y el resultado se informa como negativo o positivo. En una evaluación llevada a cabo en la University of Illinois que examinó los procedimientos de coaglutinación con anticuerpos monoclonales, la inmunofluorescencia directa y el AccuProbe® para la identificación de *N. gonorrhoeae*, la última prueba fue el único procedimiento que tuvo el 100% de exactitud en la identificación *N. gonorrhoeae*.³²³ Otros investigadores han informado resultados similares para la prueba AccuProbe.^{386,731} Esta prueba puede ser muy útil para determinar cepas que no se identifican con facilidad por otros procedimientos confirmatorios.

Pruebas de amplificación e hibridación de ácidos nucleicos para *N. gonorrhoeae*

La técnica de hibridación con sondas también se usa en las pruebas de detección de *N. gonorrhoeae* en muestras urogenitales. El sistema PACE 2 (del inglés, ensayo quimioluminiscente con sonda mejorado) (GenProbe®, San Diego, CA) es una sonda quimioluminiscente no isotópica de DNA que hibrida en forma específica con rRNA gonocócico multicopia. Las muestras se recolectan como para cultivo y se colocan en una solución lisante de transporte. Una porción de la muestra se mezcla con la sonda unida mediante unión éster a la acridina. Después de la incubación, el ácido nucleico hibridado se separa del material no hibridado. El complejo rRNA-sonda marcada con éster de acridina se procesa en un quimioluminómetro semiautomatizado con el agregado de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno. Esta hidroliza el enlace éster de la sonda marcada y libera luz, que se detecta en el quimioluminómetro y se informa como unidades relativas de luz (RLU). La cantidad de luz liberada es directamente proporcional a la cantidad de rRNA gonocócico presente en la muestra. El ensayo requiere casi 2 horas para su realización.

La evaluación del sistema PACE 2 de hibridación de ácidos nucleicos indican que esta sonda puede ser más sensible que el cultivo, debido a las características de los microorganismos con requerimientos nutricionales especiales.^{145,280,394,698} Este problema es más crítico para los laboratorios que reciben cultivos de gonococos de lugares distantes, como centros municipales de enfermedades de transmisión sexual. En todos los estudios, los ensayos de comparación con sonda (*probe competition*) se usaron para confirmar si las muestras con cultivo negativo/sonda positiva se debían a cultivos falsos negativos o a resultados fal-

sos positivos de la sonda. Chapin-Robinson y cols. compararon el PACE 2 con el cultivo en 795 muestras endocervicales y encontraron que la sensibilidad y la especificidad determinadas eran del 100% y del 99,5%, respectivamente.¹⁴⁵ Un estudio similar fue llevado a cabo por Hale y cols. en 271 muestras endocervicales y 165 muestras uretrales masculinas.²⁸⁰ Veinte de las 27 muestras con sonda positiva/cultivo negativo se definieron como cultivos falsos negativos mediante la comparación con la sonda; la sensibilidad y la especificidad determinadas de PACE 2 fueron 99,4% y 99,6%, respectivamente. Por último, un gran estudio del sistema de detección PACE 2, que tuvo lugar en los Países Bajos en 1 750 muestras, informó una sensibilidad del 97,1% y una especificidad del 99,1%.³⁸⁶ En general, la sensibilidad del sistema PACE 2 ha aumentado desde 85,5% hasta 100% para muestras endocervicales femeninas y desde 91,5% hasta 100% para muestras uretrales masculinas.³⁸⁶ La especificidad correspondiente ha cambiado del 93,5% hasta el 99,7% para muestras endocervicales y del 82,2% hasta el 99,9% para muestras uretrales masculinas.³⁶⁸ Otros estudios han informado datos de sensibilidad y especificidad similares para el sistema PACE 2.^{58,154,591} Hanks y cols. evaluaron el sistema PACE 2 como prueba de curación y encontraron que fue confiable para esta aplicación tan pronto como 6 días después del tratamiento.²⁸⁵ Koumans y cols. revisaron varias evaluaciones publicadas del sistema PACE 2 y observaron que la sensibilidad global es del 92,1% y del 96,4% para muestras endocervicales y uretrales, respectivamente.³⁶⁸ Algunos investigadores recomendaron que todas las muestras con resultados positivos con la sonda o las muestras que den valores de RLU dentro de cierto rango se confirmen con un ensayo de comparación con sonda.⁷²⁵ Para muestras positivas, la reducción del 70% o más de la señal RLU en el tubo de reacción PCA comparada con la señal generada en el tubo estándar con la sonda marcada sola constituye un positivo confirmado.

El sistema PACE 2 se ha evaluado para la detección de *N. gonorrhoeae* en muestras faríngeas y rectales. Lewis y cols. hallaron que la exactitud total del sistema PACE 2 por evaluación de estas muestras era del 99,4%, con una sensibilidad del 87,5% y una especificidad del 99,7%.³⁸⁵ Según Young y cols., la sensibilidad de PACE 2 para la detección de infecciones gonocócicas faríngeas y rectales fueron del 86,4% y del 94,1% y la especificidad del 100%.⁷²⁹ La sensibilidad global del sistema PACE 2 para la detección de infecciones gonocócicas orofaríngeas y rectales fue del 77,4% y del 96,4%, respectivamente. En la actualidad, el sistema PACE 2 no está aprobado por la FDA para el diagnóstico de infecciones gonocócicas extragenitales.

Además de la detección directa con sondas, ahora se cuenta con varios ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos para la detección directa de *N. gonorrhoeae* en muestras clínicas. Por lo general, las pruebas disponibles usan varios tipos de procedimientos de amplificación, incluidos PCR (AMPLICOR® *Neisseria gonorrhoeae* PCR y el COBAS AMPLICOR® *Neisseria gonorrhoeae* PCR, Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ), amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) (BD ProbeTecET®, BD Biosciences) y amplificación mediada por la transcripción (APTIMA COMBO 2®, GenProbe, San Diego). Estos métodos amplifican de algún modo las dianas y son detectados por quimioluminiscencia. La reacción en cadena de la ligasa (LCR), otro método de amplificación de dianas, se usó en los ensayos LCx para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.³⁰² A pesar de los buenos resultados obtenidos en los laboratorios clínicos, este sistema fue retirado del mercado después de que varios lotes de reactivos no lograron satisfacer las

expectativas analíticas anticipadas por los fabricantes.¹⁴³ Otro método, la prueba de captura Digene® (Digene, Silver Spring, MD), es un ensayo basado en una sonda quimioluminiscente que usa hibridación y captura del híbrido, seguida de la amplificación de la señal.¹⁴⁵ Estas pruebas están aprobadas para la evaluación de muestras de hisopados genitales y muestras de orina, tanto en hombres como en mujeres.

El ensayo AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR y los sistemas automatizados COBAS AMPLICOR utilizan la amplificación basada en la PCR convencional. El ensayo original no automatizado usa el termociclador PerkinElmer 9600 con la detección ulterior por enzimoimmunoanálisis que utiliza placas de micropocillos recubiertas con un oligonucleótido para capturar los productos del amplicón biotinilados. El COBAS AMPLICOR es un sistema automatizado en el cual el DNA diana se amplifica por una reacción de PCR convencional que usa termocicladores contruidos dentro del instrumento. Para ambos ensayos AMPLICOR, la secuencia diana de amplificación en *N. gonorrhoeae* es un fragmento de 201 pares de bases del gen citosina DNA metiltransferasa. Los productos de amplificación biotinilados son captados por partículas magnéticas recubiertas con sondas de oligonucleótidos con secuencias específicas de amplicón y se detectan colorimétricamente con peroxidasa de rábano conjugado con avidina.³³³

Varios estudios han analizado el desempeño del ensayo AMPLICOR para gonorrea. Crotchfeldt y cols. evaluaron el ensayo de micropocillos AMPLICOR de Roche con 344 muestras de hisopado uretral y orina de varones y 192 muestras de hisopado endocervical y de orina de mujeres. La sensibilidad del ensayo fue del 94,4% para muestras de orina y del 97,3% para muestras de hisopado uretral masculino. La sensibilidad del ensayo para las muestras de orina y de hisopado endocervical de mujeres fue del 90% y del 100%, respectivamente. La especificidad del ensayo se extendió del 95,9% hasta el 98,5% para muestras de orina y del 97,0% hasta el 99,4% para muestras de hisopados.¹⁶⁹ Paladino y cols. evaluaron el ensayo de PCR con muestras de orina de 73 varones y encontraron que el ensayo tuvo 100% de sensibilidad y de especificidad en comparación con el cultivo.⁴⁸⁸ En una gran evaluación multicéntrica del ensayo de micropocillos AMPLICOR semiautomatizado y del ensayo COBAS AMPLICOR automatizado se analizaron 2 192 muestras pareadas de hisopado endocervical y de orina de mujeres y muestras pareadas de orina y de hisopados uretrales de 1 981 varones.⁴¹⁶ El ensayo de micropocillos AMPLICOR y el COBAS AMPLICOR produjeron resultados concordantes en el 98% de las muestras y exhibieron sensibilidades idénticas del 99,5% y del 99,8% para hisopado endocervical y muestras de orina de mujeres, respectivamente, y del 98,9% y el 99,9% para hisopados uretrales y muestras de orina de hombres, respectivamente. Livengood y Wrenn observaron, en un estudio de 618 muestras de hisopado endocervical, que el sistema COBAS AMPLICOR tenía una sensibilidad y especificidad analíticas del 96,3% y el 100%, respectivamente.³⁹⁹ En un estudio que analizó la especificidad del ensayo de micropocillos AMPLICOR, Farrel encontró que 6 de 15 cepas de *N. subflava* producían resultados positivos, incluida una que fue aislada de una muestra vaginal.²²⁰ Otros estudios, así como el fabricante, también han reconocido que las neisserias saprófitas (p. ej., *N. cinerea*, *N. subflava*, *N. sicca* y *N. flavescens*) pueden producir resultados de reacción cruzada en el ensayo de micropocillos AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR.^{491,545,678}

El sistema BD ProbeTec ET® usa amplificación de desplazamiento de hebra más que PCR por amplificación, de modo que toda la prueba se realiza en forma isotérmica sin necesidad de

un termociclador.³⁹⁷ El sistema tiene una operatividad mayor que otros métodos de amplificación, con una capacidad de realizar 300 ensayos en un turno de 8 horas. También tiene opciones para la realización y la interpretación de la prueba con control de amplificación o no, y usa reactivos que pueden almacenarse a temperatura ambiente. En este ensayo, la diana de amplificación está en el homólogo de la proteína de inversión del cromosómico de la pilina, que está presente en copias múltiples en la célula gonocócica.¹¹⁷ Van der Pol y cols. evaluaron el sistema ProbeTec ET con muestras de hisopado y de orina de hombres y mujeres.⁶⁷⁷ Para las muestras de mujeres, la sensibilidad del sistema fue del 96,6% y el 84,9%, respectivamente. Para las muestras de hombres, la sensibilidad fue del 98,5% y el 97,9%, respectivamente. La especificidad aumentó desde el 94,4% hasta el 100% para las muestras de orina y del 94,8% hasta el 99,6% para las muestras de hisopado. En otra evaluación del ProbeTec ET con 733 muestras de hisopado endocervical de prostitutas en Bélgica, el procedimiento SDA se realizó con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% comparadas con el cultivo.⁶⁸¹ En un estudio de 3 544 muestras de orina en las que se hicieron pruebas para *N. gonorrhoeae*, Akduman y cols. encontraron que la sensibilidad y la especificidad del ProbeTec ET fueron del 99,2% y el 99,3%, respectivamente, en una población con una prevalencia del 3,6% por cultivo.¹⁴ Otra evaluación realizada en Canadá con muestras de orina de 825 hombres y 399 mujeres comparó ProbeTec ET con COBAS AMPLICOR PCR y halló que el procedimiento SDA fue 100% sensible y 99,7%, específico.¹⁴⁴ Como los ensayos AMPLICOR para *N. gonorrhoeae*, el BD ProbeTec ET también puede producir reacciones falsas positivas con varias especies de *Neisseria* no gonocócicas.⁴⁹¹

El APTIMA Combo 2 es un ensayo más nuevo que usa la amplificación mediada con transcripción para la detección de gonococos y clamidias en muestras de hisopado y de orina. Gaydos y cols. lo evaluaron con ambas muestras, hisopado endocervical y orina, sometidas a la detección de *N. gonorrhoeae*.²⁵⁰ La sensibilidad y la especificidad del sistema APTIMA fueron del 99,2% y del 98,7%, respectivamente, para muestras de hisopado endocervical, y del 91,3% y el 99,3%, para la primera muestra de orina. Este ensayo se está sometiendo a otras evaluaciones, incluido el uso de hisopados vaginales para la detección de microorganismos autorrecolectados o recolectados por el médico. Las pruebas APTIMA también parecen menos sensibles a los inhibidores de la amplificación, que a menudo se encuentran en las muestras de orina, que otros ensayos de amplificación.¹⁵⁰

El ensayo de captura del híbrido Digene®, como ya se mencionó, usa amplificación de señal en lugar de amplificación de la diana para aumentar su sensibilidad de detección. En este ensayo, el DNA diana se hibrida a las sondas RNA específicas de secuencia, provistas con el ensayo. Los productos híbridos se transfieren a los pocillos de una cubeta de microtitulación, donde se inmovilizan por los anticuerpos en un pocillo microtitulador. Luego, se agrega a cada micropocillo un reactivo de detección, que consiste en un anticuerpo conjugado específico para híbridos RNA/DNA. Las enzimas múltiples se conjugan con cada una de estas moléculas de anticuerpo y muchas moléculas de anticuerpo se unen a cada híbrido RNA/DNA, lo que deriva en una amplificación de la señal marcada además de la del sustrato enzimático quimioluminiscente. En un estudio realizado con muestras de hisopado endocervical de 1 370 mujeres, el ensayo Digene demostró una sensibilidad del 92,6% y una especificidad del 98,5% comparado con el cultivo.⁵⁷⁹ En un análisis de 669 muestras endocervicales, la prueba Digene tuvo

un 92.2% de sensibilidad y más del 99% de especificidad para la detección de *N. gonorrhoeae* cuando se comparó con el cultivo.¹⁷⁴ Van der Pol y cols. encontraron que el ensayo Digene se realizaba con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99% para la detección de *N. gonorrhoeae* en muestras de hisopado endocervical.⁶⁷⁹

Además de las pruebas comerciales de amplificación molecular para *N. gonorrhoeae*, se han creado los ensayos de PCR en "tiempo real" que usan la plataforma de LightCycler®. En un estudio de 152 muestras de orina, se comparó la prueba LightCycler con una prueba PCR casera para *N. gonorrhoeae*.⁷¹⁰ El método del LightCycler tuvo una sensibilidad del 94% y su especialidad fue comparable con la de las pruebas de autoaplicación. Li y cols. también inventaron una prueba LightCycler que detectó tanto el microorganismo como las mutaciones en el gen *gyrA* responsables de la resistencia a las quinolonas.³⁹⁰

El uso de métodos basados en ácidos nucleicos para la detección de *N. gonorrhoeae* en muestras clínicas tiene ventajas y desventajas. Las ventajas son la capacidad de evaluar muestras de fácil recolección (orina), la velocidad del procedimiento, cada vez más rápido, y el aumento demostrado en la sensibilidad de estos métodos comparados con los cultivos. Las desventajas son el costo de las pruebas (equipamiento e insumos), la necesidad de un lugar especial dedicado al procesamiento de la muestra y a la realización de la prueba, y los cambios en las rutinas de trabajo del laboratorio para impedir la contaminación con amplicón del instrumental y del medioambiente. Un lado oscuro del uso generalizado de estos ensayos basados en el no cultivo es el desaprovechamiento de los aislamientos gonocócicos para la vigilancia de la resistencia emergente a los antibióticos. A pesar de la alta especificidad de estas pruebas, su desempeño en poblaciones con baja prevalencia requiere otro estudio; algunos especialistas han recomendado pruebas confirmatorias con métodos moleculares más específicos (p. ej., 16S rRNA PCR) para los resultados positivos de las pruebas amplificadas obtenidos en poblaciones con baja prevalencia de gonorrea.¹⁸⁷ Todavía se requiere el cultivo para el diagnóstico de infecciones gonocócicas extragenitales y para el registro y la documentación de infecciones gonocócicas genitales, rectales u orofaríngeas en los niños.

Métodos moleculares para la detección de *N. meningitidis*

También se describieron métodos moleculares para la detección directa de *N. meningitidis* en muestras clínicas, pero ninguno se comercializa. Lansac y cols. describieron pruebas identificación con PCR específicas de especie y de género usando pares de cebadores derivados del gen aspartato β -se-mialdeído (*asd*) de especies de *Neisseria* y del gen de una proteína de la membrana externa conservada (*ctrA*) de *N. meningitidis*, respectivamente.³⁷⁵ El primer ensayo fue 100% específico para la identificación de 321 de 322 cepas que representaban 13 especies de *Neisseria*, mientras que el segundo ensayo amplificó el DNA de 256 aislamientos de *N. meningitidis* pertenecientes a nueve serogrupos diferentes. También se describieron varios ensayos de PCR para la detección directa de meningococos en muestras clínicas. Durante una epidemia de enfermedad causada por el serogrupo B que comenzó en Chile en 1987, Saunders y su equipo de investigación desarrollaron un ensayo de PCR anidada que amplificó el gen *porA* que codifica la proteína específica de subserotipo.⁵⁷⁸ El uso de este ensayo en muestras de LCR durante la epidemia tuvo una sensibilidad de prueba del 96,7% y una especificidad del 100%.⁵⁷⁷ También se

describieron métodos de PCR que amplifican los genes de los polisacáridos capsulares múltiples (ensayo PCR *ctrA*) o que amplifican los genes específicos de serogrupo (ensayo PCR *siaD*).^{81,82,335,514} Taha describió un ensayo de PCR realizado directamente sobre LCR para la detección meningocócica y el seroagrupamiento simultáneos. El ensayo de detección amplificó un gen conservado involucrado en la regulación de la adherencia meningocócica a las células diana (*crgA*). mientras se realizaba un ensayo de PCR múltiple simultáneo con oligonucleótidos en los genes *siaD* para la detección de los serogrupos B, C, Y y W135 y en el casete del gen *orf-2* requerido para la detección del serogrupo A por biosíntesis del serogrupo capsular A.⁶³⁸ Orvelid y cols. describieron un método basado en PCR para la detección de meningococos del serogrupo A en LCR.⁴⁸⁶ Este ensayo usó cebadores y sondas específicos para el gen casete que codifica la (α 1-6) *N*-acetil-D-manosamina que compone el polisacárido capsular del serogrupo A. También se han desarrollado ensayos LightCycler basados en PCR que pueden detectar, identificar y realizar la subserotipificación del gen *porA* de *N. meningitidis* directamente de muestras clínicas.⁴⁴⁶

Características del cultivo de especies de *Neisseria*

Las secciones siguientes presentan aspectos útiles para la caracterización e identificación en el laboratorio de los cocos gramnegativos. Se reseñan las sugerencias para la realización de pruebas confirmatorias y diferenciales descritas en detalle en la sección anterior y los procedimientos de pruebas adicionales. En el cuadro 11-4 se muestran las características para la identificación de especies de *Neisseria* y *M. catarrhalis*.

Neisseria gonorrhoeae

Aunque los sistemas de identificación tratados en la sección anterior de este capítulo y las características bioquímicas del cuadro 11-4 son confiables para la identificación habitual de *N. gonorrhoeae* en el laboratorio clínico, otras técnicas han contribuido mucho al conocimiento de la biología y la epidemiología de los gonococos. Técnicas como la auxotipificación y la serotipificación han sido útiles para determinar la virulencia potencial, la invasividad, la sensibilidad a los antibióticos y la constitución genética de diferentes cepas de gonococos. Las cepas de gonococos con requerimientos nutricionales específicos por ciertos factores del crecimiento se conocen como **auxotipos**.¹²⁴ Aun cuando en estudios de auxotipificación se pueden determinar hasta 15 factores del crecimiento diferentes (como requerimientos por valina, leucina, lisina, arginina, prolina, hipoxantina, citrulina u otros), las cepas que requieren la triada de arginina, hipoxantina y uracilo (cepas AHU) han sido las más estudiadas. Estas cepas son de particular interés porque, por lo general, se aíslan en pacientes con infección gonocócica diseminada y son muy sensibles a la penicilina.^{356,453} Las cepas AHU halladas en infecciones sistémicas a menudo son resistentes a la acción bactericida normal del suero humano, lo que puede explicar en parte su capacidad para entrar en el torrente circulatorio.⁵⁸⁵ Las cepas AHU también están asociadas con infecciones uretrales asintomáticas en los varones; en un estudio, 96% de los varones asintomáticos estaban infectados con este auxotipo.¹⁶⁸ Las cepas que requieren AHU crecen como colonias atípicas en agar; algunas pueden requerir 72 horas más de incubación antes de que se observe un crecimiento visible.⁴⁵³ Además de las cepas AHU, los auxótrofos que requieren

Cuadro 11-4 Características para la identificación de especies de *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis* y la “falsa *Neisseria*”

ESPECIES	OXIDASA	CATALASA	CRECIMIENTO EN			PRODUCCIÓN DE GAS DE		
			Medio selectivo, 35 °C	Agar chocolate, 22 °C	Agar nutritivo, 35 °C	Glucosa	Maltosa	Fructosa
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	+	—	—	+	—	—
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	—	—	+	+	—
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	—	—	+	+	—
<i>N. cinerea</i>	+	+	—†	—	—	—	—	—
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	V	—	+	+	+	—
<i>N. sicca</i>	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>N. subflava</i>								
bv. <i>subflava</i>	+	+	—	+	+	+	+	—
bv. <i>flava</i>	+	+	—	+	+	+	+	+
bv. <i>perflava</i>	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>N. flavescens</i>	+	+	—	—	+	—	—	—
“ <i>N. kochii</i> ”	+	+	+	—	—	+	—	—
<i>N. elongata</i>								
subesp. <i>elongata</i>	+	—	—	+	+	—	—	—
subesp. <i>glycolytica</i>	+	+	—	+	+	+ ^d	—	—
subesp. <i>nitroreducens</i>	+	—	—	+	+	—/+ ^d	—	—
<i>N. weaveri</i>	+	+	—	+	+	—	—	—
<i>N. canis</i>	+	+	ND	ND	ND	—	—	—
<i>N. denitrificans</i>	+	+	—	ND	ND	+	—	+
<i>N. macacae</i>	+	+	—	ND	ND	+	+	+
<i>N. caviae</i>	+	+	ND	ND	ND	—	—	—
<i>N. ovis</i>	+	+	ND	ND	ND	—	—	—
<i>N. cuniculi</i>	+	+	ND	ND	ND	—	—	—
<i>N. iguanae</i>	+	+	ND	ND	ND	V	—	ND
<i>Moraxella catarrhalis</i>	+	+	V	+	+	—	—	—

+, reacción positiva; —, reacción negativa; V: reacción variable; +^d: reacción positiva débil; —/+^d: negativa a reacción positiva débil; ND: datos no disponibles.
^aLas reacciones mostradas están en medios con 0,1% nitrógeno. *N. gonorrhoeae* reducirá 0,01% de nitrógeno.
^bAlgunas cepas recuperadas en medios selectivos.
^cAlgunas cepas desarrolladas en medios selectivos.

prolina, citrulina y uracilo han sido asociados con infecciones asintomáticas en varones en los Estados Unidos, Canadá y Suecia.¹⁰²

Los estudios de las características inmunológicas del gono-coco incluyen la caracterización de las proteínas de la membrana externa del microorganismo y el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra epítomos de la proteína Por (proteína I), la principal proteína de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*.^{257,360} Estos anticuerpos se pueden adsorber sobre células estafilocócicas para usarlos como reactivos de coaglutinación.

Las diferencias en Por dividen las cepas en tres grupos: el serogrupo WI contiene Por AI, mientras que los serogrupos WII y WIII contienen Por IB. Los serotipos WI se asocian con infecciones diseminadas, infecciones asintomáticas en los varones y resistencia mediada por complemento a la actividad bactericida del suero humano normal. La exploración de varios epítomos de Por IA y IB ha llevado a la subdivisión de Por IA (serotipo WI) en más de 18 serovariedades y de Por IB (serotipos WII/WIII) en más de 28 serovariedades.³⁶⁰ Las determinaciones de serovariedades a menudo se logran mediante técnicas de

ESPECIES	PRODUCCIÓN DE GAS DE		POLISACÁRIDO DE SACAROSA	REDUCCIÓN DE		DNASA	HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA	HABITATS
	Sacarosa	Lactosa		NO ₃	NO ₂ *			
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	-	-	-	-	-	-	Seres humanos
<i>N. meningitidis</i>	-	-	-	-	V	-	-	Seres humanos
<i>N. lactamica</i>	-	+	-	-	V	-	-	Seres humanos
<i>N. cinerea</i>	-	-	-	-	V	-	-	Seres humanos
<i>N. polysaccharea</i>	-	-	+	-	V	-	-	Seres humanos
<i>N. sicca</i>	+	-	+	-	+	-	-	Seres humanos
<i>N. subflava</i>								
bv. <i>subflava</i>	-	-	-	-	+	-	-	Seres humanos
bv. <i>flava</i>	-	-	-	-	+	-	-	Seres humanos
bv. <i>perflava</i>	+	-	+	-	+	-	-	Seres humanos
<i>N. mucosa</i>	+	-	+	+	+	-	-	Seres humanos
<i>N. flavescens</i>	-	-	+	-	+	-	-	Seres humanos
" <i>N. kochii</i> "	-	-	-	-	-	-	-	Seres humanos (raro)
<i>N. elongata</i>								
subesp. <i>elongata</i>	-	-	-	-	+	-	-	Seres humanos
subesp. <i>glycolytica</i>	-	-	-	-	+	-	-	Seres humanos
subesp. <i>nitroreducens</i>	-	-	-	+	+	-	-	Seres humanos
<i>N. weaveri</i>	-	-	-	-	+	-	-	Perros
<i>N. canis</i>	-	-	-	+	-	ND	-	Perros
<i>N. denitrificans</i>	+	-	+	-	+	ND	-	Cobayos
<i>N. macacae</i>	+	ND	+	-	+	ND	ND	Primates
<i>N. caviae</i>	-	-	-	+	+	ND	+	Cobayos
<i>N. ovis</i>	-	-	-	+	-	ND	+	Ovejas/vacas
<i>N. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	NA	+	Conejos
<i>N. iguanae</i>	V	ND	+	+	V	ND	ND	Iguanas
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	+	+	+	+	Seres humanos

coagulación, aunque los reactivos de tipificación monoclonal también han sido adaptados a un formato de enzimoanálisis con resultados menos subjetivos y más reproducibles.¹¹⁴ Las aplicaciones de estos esquemas de tipificación han incluido 1) el estudio de las diferencias regionales y los cambios temporales en los gonococos de todo el país y dentro de comunidades, 2) el análisis de las relaciones serovariedad-auxotipo, 3) el estudio de serovariedades gonocócicas como indicadores o predictores de virulencia, 4) el uso de la determinación de serovariedades para definir una recidiva o una

reinfección en pacientes individuales, y 5) el uso de la determinación de serovariedades como una herramienta de la patología forense relacionada con asaltos y abusos sexuales.²⁵⁷

Los métodos moleculares más nuevos han sido desarrollados para aumentar y extender la capacidad de discriminación de la auxotipificación y la serotipificación. Estas técnicas incluyen perfiles de antibiograma, análisis de plásmidos, tipificación de *Opa*, secuenciación del gen *PorB*, ribotipificación, análisis de isoenzimas, análisis de endonucleasas de restricción, electroforesis en gel de campo pulsado, PCR cebada arbitrariamente,

análisis de restricción de RNA ribosómico amplificado, huellas dactilares (*fingerprinting*) del polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados.^{106,476,477,484,489,490,508,650,673} Estos métodos nuevos de tipificación han demostrado la existencia de “grupos” dentro de auxotipo(s)/serovariedad(es) existentes.^{672,689}

Otro sistema de tipificación involucra la amplificación y la secuenciación de los genes *lip*, que codifican una lipoproteína de la membrana externa de 18 a 30 kDa de peso molecular y que se encuentra en todos los meningococos.⁶⁶² Los tres genes *lip* han sido identificados y secuenciados. Las secuencias de nucleótidos de esos genes predicen los péptidos que están compuestos por un aminoácido pentamérico que se repite de 13 a 19 veces. Las variaciones en el número de repeticiones de *lip* en una secuencia y la naturaleza de la secuencia por sí misma pueden usarse junto con el auxotipo, la serovariedad, la sensibilidad a los antibióticos y otras características para construir un sistema altamente discriminativo para la tipificación de aislamientos individuales.

Debido a las consecuencias medicolegales que se originan después de aislar *N. gonorrhoeae* en un niño y de hallar gonococos tanto en los genitales como en otras partes del cuerpo, la identificación apropiada del microorganismo aislado es imperativa. Whittington y cols. informaron 40 aislamientos bacterianos en menores de 15 años identificados como *N. gonorrhoeae* y remitidos a los CDC para su confirmación.⁷¹² Catorce (35%) de esas cepas habían sido mal identificadas por el laboratorio de origen, entre ellas cuatro *N. cinerea*, tres *N. lactamica*, dos *N. meningitidis*, tres *M. catarrhalis*, una *K. denitrificans* y una especie de *Neisseria* nogonocócica no identificada. En 10 de los 14 casos, los microorganismos se aislaron en niños en quienes no hubo evidencia de abuso sexual. En muchos casos, los laboratorios que informaron estas cepas estaban usando los equipos comerciales descritos con anterioridad para la identificación de *N. gonorrhoeae*. Como ya se mencionó, algunos sistemas de pruebas de utilización de hidratos de carbono comerciales pueden producir reacciones a la glucosa falsas positivas para *N. cinerea*, que pueden conducir a la identificación equivocada de estas especies como *N. gonorrhoeae*.^{91,92} Las pruebas de coaglutinación, si bien suelen ser bastante confiables, pueden producir resultados falsos negativos con algunas cepas gonocócicas y también pueden mostrar resultados falsos positivos con algunas otras cepas de *Neisseria* o especies relacionadas, como *N. lactamica*, *N. cinerea* y *M. catarrhalis*. Los detalles del procedimiento para estas pruebas (p. ej., densidad de la suspensión de la prueba, tipo y pH del líquido en el que se hace la suspensión) difieren entre los fabricantes y deben seguirse estrictamente las instrucciones incluidas en el embalaje. Las pruebas enzimáticas para la detección de prolilaminopeptidasa gonocócica deben usarse sólo para neisserias que sean capaces de crecer bien en medios selectivos. Algunas cepas de *N. cinerea* y ciertas cepas de *N. subflava* biovariedad *perflava* pueden crecer en medios selectivos y también pueden ser positivas para prolilaminopeptidasa en sistemas comerciales.³²⁰ Las cepas aisladas en la orofaringe pueden ser problemáticas. *N. lactamica*, una especie que crece bien en medios selectivos y puede ser mal identificada como *N. gonorrhoeae*, coloniza la orofaringe de casi el 60% de los niños de entre 1 y 4 años.²⁶¹

El Comité de abandono y abuso infantil de la American Academy of Pediatrics recomienda que el aislamiento presunto de *N. gonorrhoeae* en un niño, sin tener en cuenta el sitio del aislamiento, se confirme con al menos dos métodos.²⁰ Las técnicas sin cultivo, como la hibridación de ácidos nucleicos y los métodos de amplificación, son pruebas de investigación uti-

lizadas en niños, de modo que sus resultados positivos deben confirmarse con un cultivo. Si un laboratorio no puede establecer la identificación definitiva, la cepa debería enviarse a un laboratorio de referencia para efectuar otras pruebas y, si es posible, también debería guardarse. Esto se puede lograr si se extraen los cultivos obtenidos en unas pocas placas de agar chocolate, se los prepara en suspensión en 1 mL de caldo de infusión de cerebro y corazón más suero equino sin complemento (en proporción 1:1) y se lo almacena a -70 °C.

Neisseria meningitidis

Los procedimientos de identificación para meningococos (y gonococos) producen los mejores resultados cuando se inoculan a partir de subcultivos de 18 a 24 horas en agar sangre o agar chocolate. En las pruebas confirmatorias de utilización de hidratos de carbono, la reacción ácida en el tubo de maltosa suele ser más fuerte que la del tubo de glucosa porque el microorganismo degrada la maltosa en dos moléculas de glucosa, que luego se metabolizan. De tanto en tanto, pueden hallarse cepas de *N. meningitidis* asacarolíticas glucosa negativas y maltosa negativas.^{266,505,562,705} Si se aíslan esas cepas aberrantes desde el punto de vista bioquímico, se deben realizar pruebas confirmatorias con sustratos cromogénicos o seroagrupamiento de los aislamientos.

La aglutinación en portaobjetos es la técnica usada con mayor frecuencia para el seroagrupamiento de meningococos. Se prepara una suspensión densa del microorganismo en 0,5 a 1,0 mL de solución salina de buffer fosfato (PBS), pH 7,2 de un subcultivo de 12 a 18 horas en agar sangre tripticasa soja. Se mezcla una gota de esta suspensión con una gota de antisuero meningocócico en un portaobjetos sectorizado y se lo rota durante 2 a 4 minutos. Las cepas agrupables por lo general aglutinarán firmemente en ese lapso. Aunque las cepas de infecciones sistémicas aglutinan enseguida, las de portadores pueden no hacerlo (cepas no agrupables) o pueden autoaglutinarse en PBS. El uso de cultivos jóvenes de agar sangre (6 a 8 horas) o de medios enriquecidos con suero, como agar tripticasa soja que contiene 10% de suero equino descomplementado, puede resolver esos problemas. Se dispone de antisueros para los principales serogrupos meningocócicos de BD Biosciences®. Algunas de estas cepas no agrupables pueden ser *N. polysaccharaea*; la prueba para la producción de polisacáridos a partir de sacarosa ayuda en la identificación de estas especies (véase la explicación más adelante).⁸⁴ Además de la aglutinación en portaobjetos, el seroagrupamiento de meningococos puede realizarse con células enteras, enzimoinmunoanálisis indirecto y por inmunotransferencia en manchas (*dot blot*) con anticuerpos monoclonales contra los serogrupos A, B, C, Y y W135. Según Rosenqvist y cols., las dos últimas técnicas son más sensibles, más específicas y más fáciles de interpretar que las pruebas de aglutinación en portaobjetos, pero su aplicabilidad está limitada a la disponibilidad de reactivos monoclonales específicos de serogrupo.⁵⁴⁹

Además de las determinaciones de serogrupos, los aislamientos de *N. meningitidis* pueden ser serotipificados y subserotipificados basándose en sus proteínas de membrana externa y antígenos LOS (véase recuadro 11-3). Estas técnicas se usan principalmente para investigaciones de epidemias y brotes esporádicos de la enfermedad y no están al alcance de los laboratorios microbiológicos clínicos de rutina. Además de las técnicas serológicas, se han aplicado varias técnicas moleculares a investigaciones de enfermedad meningocócica y a la epidemiología de las cepas de *N. meningitidis*. Estas técnicas son

electroforesis de enzimas multilocus, análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción, técnicas con sondas de rRNA (ribotipificación), análisis de los genes cromosómicos *porA* y *dhps* (dihidropteroato sintasa) de *N. meningitidis* por endonucleasas de restricción-amplicón de PCR y electroforesis en gel de campo pulsado.^{276,277,347,369,495,629,658}

Otras especies de *Neisseria* **NEISSERIA LACTAMICA**

N. lactamica se asemeja a *N. meningitidis* en la morfología de las colonias y en un principio se pensó que era una variante lactosa positiva de aquella.²⁹⁷ Esta especie reside en la faringe y se encuentra más a menudo en los niños.²⁶¹ Crece en medios selectivos y produce ácido de glucosa, maltosa y lactosa. También hidroliza ONPG, que puede usarse como sustituto de la lactosa en la serie de pruebas bioquímicas. Se ha informado que algunas cepas causan reacciones falsas positivas con algunas pruebas de coaglutinación comerciales.^{322,323} Las cepas de *N. lactamica* tienen sensibilidad intermedia a la penicilina y a la ampicilina, pero son sensibles a la cefotaxima y a la ceftriaxona.³⁶

NEISSERIA CINEREA

Las colonias de *N. cinerea* se asemejan a los tipos de colonias grandes de *N. gonorrhoeae* y pueden producir resultados compatibles con *N. gonorrhoea* en algunos sistemas de identificación comerciales.⁹¹ Aunque es parte de la flora comensal de las vías respiratorias altas, ha sido aislado en otros sitios, incluidos cuello uterino, recto, celulitis orbital, conjuntiva, sangre y LCR.^{42,85,198,201,361} *N. cinerea* crece tanto en agar sangre como en agar chocolate. En agar chocolate después de 24 horas de incubación, las colonias son de casi 1 mm de diámetro, lisas y con bordes continuos. El microorganismo no genera ácido con los hidratos de carbono ni en los medios con CTA ni en las pruebas rápidas de degradación de hidratos de carbono. Se han informado reacciones positivas débiles con glucosa después de incubación de toda la noche para algunos sistemas de identificación y su reacción hidroxiprolil aminopeptidasa positiva también puede llevar a una identificación errónea de *N. cinerea* como *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, la mayoría de las cepas de *N. cinerea* no crecen bien en MTM u otros medios selectivos, lo que excluye a estos microorganismos de las pruebas con sustratos cromogénicos, como Gonocheck y BactiCard *Neisseria*. *N. cinerea* puede diferenciarse de las especies asacarolíticas *N. flavescens* por su incapacidad para producir polisacáridos de sacarosa (véase más adelante) y por la falta de un pigmento amarillo perceptible. Esta especie también puede ser separada de *M. catarrhalis*, otra especie asacarolítica, por su reducción de nitratos negativa (véase cuadro 11-4). Para diferenciar *N. cinerea* de *N. gonorrhoeae* es útil la prueba de sensibilidad a la colistina. Se prepara una suspensión del microorganismo (0,5 del estándar de turbidez de McFarland) en caldo y se siembra con hisopo en placas de agar sangre o agar chocolate como para una prueba de sensibilidad por difusión con discos. Se coloca un disco de 10 mg de colistina sobre el inóculo y se incuba la placa en CO₂ entre 18 a 24 horas. *N. cinerea* es sensible a la colistina y tendrá una zona ≥ 10 mm sin crecimiento alrededor del disco. Por lo general, *N. gonorrhoeae* crece hasta el borde del disco.

NEISSERIA FLAVESCENS

N. flavescens se encuentra en el aparato respiratorio y rara vez se asocia con procesos infecciosos. Este microorganismo

crece como colonias amarillentas lisas, tanto en agar sangre como en agar chocolate. Además de crecer en un agar nutritivo a 35 °C, la mayoría de las variedades crecen a temperatura ambiente en agar sangre o agar chocolate. Es un microorganismo incapaz de sintetizar polisacáridos yodopositivos a partir de la sacarosa (véase descripción) y puede diferenciarse de *M. catarrhalis* por su incapacidad para reducir nitrato y por sus reacciones de la DNasa y de hidrólisis de la tributirina negativas.

NEISSERIA SUBFLAVA BIOVARIEDADES. NEISSERIA MUCOSA Y NEISSERIA SICCA

La identificación de especies de *Neisseria* "no patógenas" no suele ser necesaria a menos que se determine que el microorganismo es importante desde el punto de vista clínico o si se lo aísla de un sitio sistémico (p. ej., sangre, LCR) o de un cultivo puro. La identificación se basa en la morfología de la colonia, el crecimiento en un medio nutritivo simple, la incapacidad para desarrollarse en medios selectivos, la producción de ácido a partir de hidratos de carbono, la reducción de nitrato y nitrito y la síntesis de un polisacárido que se tiñe con yodo, similar al almidón, a partir de sacarosa. **La reducción de nitrato y de nitrito** se determinan en un medio (caldo con infusión de corazón o tripticasa soja) que contiene 0,1% (p/v) de KNO₃ y 0,01% (p/v) de KNO₂, respectivamente. **La síntesis del polisacárido** se determina por inoculación del microorganismo en un agar infusión de cerebro y corazón que contiene 5% de sacarosa. Se inocula un medio sin sacarosa como control negativo. Después de la incubación a 35 °C durante 48 horas, las placas se cubren con solución de yodo de Lugol o de Gram (dilución 1:4). Una prueba positiva está indicada por la aparición de un color azul intenso en y alrededor de las colonias sintetizadoras del polisacárido. Se han obtenido excelentes resultados por el agregado regular de yodo de Gram (una a dos gotas) al tubo que contiene sacarosa en la técnica rápida de degradación de hidratos de carbono, después de 4 horas de incubación. Si es positiva, aparece un color azul intenso en el tubo. Éste se compara con el color observado en los otros tubos de hidratos de carbono (p. ej., el tubo de maltosa) después del agregado del yodo de Gram.

Las cepas de *N. subflava* pueden subdividirse en tres biovariedades (biovariedades *subflava*, *flava* y *perflava*) sobre la base de la producción de ácido a partir de fructosa y sacarosa y la síntesis de polisacárido yodopositivo a partir de sacarosa (véase cuadro 11-4). Las tres biovariedades reducen nitrito, pero no nitrato. *N. mucosa* tiene un patrón de utilización de hidratos de carbono similar a *N. subflava* bv. *perflava* y también produce polisacárido yodopositivo, pero *N. mucosa* puede reducir tanto nitrato como nitrito a N₂ gas (lámina en color 11-2D). Todos estos microorganismos exhiben grados variables de pigmentación amarilla. Las cepas de *N. sicca* son idénticas desde el punto de vista bioquímico a *N. subflava* bv. *perflava*, pero forman colonias coriáceas, adherentes y secas (disecadas) características en agar que no pueden ser emulsionadas fácilmente.

NEISSERIA POLYSACCHAREA

N. polysaccharea se encuentra en la orofaringe humana. Este microorganismo es un diplococo gramnegativo, catalasa positivo, oxidasa positivo que forma colonias amarillas lisas.⁵³⁸ En la descripción original, la capacidad para crecer en medios selectivos (p. ej., agar MTM) fue una característica clave. Sin em-

bargo, estudios posteriores indicaron que el desarrollo en medios selectivos para las especies de *Neisseria* patógenas es una característica variable en *N. polysaccharea* debido a la sensibilidad a la colistina de algunas cepas.²³ Las cepas capaces de crecer en medios selectivos tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para la colistina de 64 µg/mL o mayores, mientras que las que son inhibidas tienen CIM para la colistina de 1 µg/mL o menores. Los microorganismos son resistentes a la vancomicina. Después de 24 horas de crecimiento, *N. polysaccharea* forma colonias de casi 2 mm de diámetro en agar sangre o en agar chocolate. Produce ácido de glucosa y maltosa pero no de fructosa o lactosa. La producción de ácido a partir de sacarosa varía y parece depender de los tipos de medios usados para determinar esta característica. *N. polysaccharea* también tiene una amilosacarosa que sintetiza un polisacárido extracelular ácido a partir de sacarosa.^{104,515} El polímero se compone principalmente de residuos D-glucopiranosilo unidos por enlaces α 1,4 y alrededor de un 6% de elementos de ramificación O-α 4,6-D-glucopiranosilo.⁵³⁹ La producción de diferentes cantidades del material por distintas cepas puede explicar la naturaleza variable de la reacción de la sacarosa.^{538,539} No reduce nitrato, mientras que el nitrito es reducido con frecuencia. *N. polysaccharea* puede diferenciarse de *N. meningitidis* por la síntesis de polisacárido y las pruebas de γ-glutamil aminopeptidasa. *N. polysaccharea* produce polisacárido yodopositivo de sacarosa y es γ-glutamil aminopeptidasa negativa, mientras que *N. meningitidis* no produce polisacárido yodopositivo de sacarosa y es γ-glutamil aminopeptidasa positiva.^{23,84} Como *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, y algunas cepas de *N. meningitidis*, *N. polysaccharea* son protil aminopeptidasa positivas. El microorganismo requiere cisteína para desarrollarse y no crece en agar nutritivo o en agar chocolate a 22 °C. Aunque sus características de cultivo se parecen a las de *N. meningitidis*, el perfil proteico de su membrana externa se asemeja al de *N. lactamica* más que al de las especies patógenas.¹¹¹

SUBESPECIES DE *NEISSERIA ELONGATA*

N. elongata subespecies *elongata*, *glycolytica* y *nitroreducens* son miembros baciliformes del género *Neisseria*. Las primeras dos subespecies se reconocieron en la edición más reciente del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* como especies de *Neisseria*, mientras que la última subespecie, en principio conocida como grupo M-6 de los CDC, fue reclasificada recientemente en el género.^{89,268,721} Todas las subespecies son miembros de la flora de las vías respiratorias altas humanas y han sido aisladas en pacientes con procesos infecciosos.^{295,470,721} Estas subespecies pueden diferenciarse sobre la base de la reactividad a la catalasa, la producción de ácido de la glucosa y la reducción de nitrato (véase cuadro 11-4).

NEISSERIA GONORRHOEAE SUBESPECIE *KOCHII* ("NEISSERIA KOCHII")

En 1986, se aislaron siete cepas de una *Neisseria* atípica de cultivos conjuntivales de niños en dos villas rurales de Egipto.⁴²⁶ Estos aislamientos crecieron en agar chocolate y en el medio de Thayer-Martin modificado y produjeron colonias lisas y grandes que asemejaban meningococos. De modo similar a los gonococos, estos microorganismos requieren el aminoácido cisteína para crecer. Las cepas fueron oxidasas positivas, produjeron ácido sólo de glucosa y fueron γ-glutamil aminopeptidasa negativas. No reaccionaron con los anticuerpos monoclonales gonocócicos fluorescentes ni con los reactivos monoclonales para

la coaglutinación usados para las determinaciones de serovariedades de *N. gonorrhoeae*. En análisis posteriores estas cepas tenían proteínas de superficie diferentes de las variedades gonocócicas con las cuales se las comparó. Sin embargo, el análisis de plásmidos mostró homología significativa con los plásmidos encontrados por lo común en cepas gonocócicas. Los experimentos de homología de DNA mostraron similitud suficiente tanto a *N. gonorrhoeae* como a *N. meningitidis*; sobre esta base, los investigadores percibieron que esos aislamientos no representaban una especie nueva sino más bien una subespecie de *N. gonorrhoeae*. Dado que estas cepas podrían ser identificadas como *N. gonorrhoeae* en un laboratorio clínico y que su sitio de aislamiento y el patrón de utilización de hidratos de carbono eran similares a los observados en los gonococos, se los ha llamado *N. gonorrhoeae* subespecie *kochii* o "*N. kochii*".⁴²⁶ Esta especie todavía no ha sido adoptada formalmente.

ESPECIES DE *NEISSERIA* NO HUMANAS Y ATÍPICAS

Las especies de *Neisseria* con perfiles serológicos o bioquímicos inusuales o atípicos están siendo reconocidas de manera creciente. Hodge y cols. aislaron un microorganismo que fue bioquímicamente un meningococo, incluso reaccionó con los reactivos de inmunofluorescencia de anticuerpos monoclonales y con los de coaglutinación para *N. gonorrhoeae*.²⁹⁴ Janda y cols. aislaron cepas de *N. subflava* bv. *perflava* de cultivos orofaríngeos de varones homosexuales que crecieron en forma abundante en un medio selectivo (agar de Thayer-Martin modificado).^{320,322} En las pruebas de sustratos cromogénicos, estos microorganismos fueron identificados como *N. gonorrhoeae* basándose en la reacción hidroxiprolil aminopeptidasa positiva y en las reacciones β-galactosidasa y γ-glutamil aminopeptidasa negativas. Una caracterización más completa de las cepas de neisseries aisladas, en particular las halladas en pacientes inmunodeprimidos, puede detectar formas inusuales o anómalas en el futuro.

En ocasiones, en el laboratorio microbiológico clínico se aíslan especies de *Neisseria* de origen animal a partir de infecciones humanas, como heridas por mordedura de animales. Estas especies pueden incluir *N. weaveri*, *N. canis*, *N. denitrificans* y miembros de la falsa neisseria. Todos estos microorganismos muestran una morfología diplocócica gramnegativa típica excepto *N. weaveri*, que es un bacilo gramnegativo. Las reacciones bioquímicas para estos microorganismos también se presentan en el cuadro 11-4.

Características del cultivo e identificación de *Moraxella catarrhalis*

M. catarrhalis crece bien tanto en agar sangre como en agar chocolate y algunas cepas también crecerán bien en MTM y en otros medios selectivos. Las colonias por lo general son blanco grisáceas, opacas y lisas. También se describió un medio selectivo que incorpora acetazolamida como inhibidor de otra flora del aparato respiratorio.⁶⁸⁴ El microorganismo es asacarolítico en las pruebas de degradación de hidratos de carbono y por lo común puede volver alcalino el medio de identificación a base de peptona. La mayoría de las cepas reducen nitrato y nitrito y producen DNasa.¹⁹² La actividad DNasa se detecta a través de la inoculación concentrada en un área del tamaño de una moneda sobre la placa del medio para la prueba de DNasa que contiene azul de toluidina 0 (lámina en color 11-2F). Después de

la incubación durante toda la noche, la hidrólisis del DNA se detecta por un cambio en el color del medio alrededor y debajo el inóculo de azul a rosa. También se inoculan las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en la placa como controles positivos y negativos de la prueba, respectivamente.

M. catarrhalis también puede distinguirse de las especies de *Neisseria* por su capacidad para hidrolizar el enlace éster de los grupos butirato (butirato estearasa).⁶¹⁵ Véase lámina en color 9-2H. Esta actividad enzimática se detecta con un sustrato llamado tributirina. Una prueba rápida de hidrólisis de tributirina fluorescente que usa 4-metilumbeliferil butirato como sustrato fue informada por Vaneechoutte y cols.⁶⁸³ En este estudio, las 62 cepas de *M. catarrhalis* fueron positivas con esta prueba dentro de los 5 minutos, mientras que todas las otras especies de *Neisseria* probadas fueron negativas. Se describió una prueba muy rápida (2,5 minutos) y confiable de hidrólisis de indoxil-butirato que se comercializa (Remel® Laboratories; Carr-Scarborough, Stone Mountain, GA; lámina en color 11-2G).^{177,402} Esta misma prueba también se incluyó en el BactiCard-*Neisseria* junto con los otros tres sustratos cromogénicos para la identificación de *Neisseria* (véase lámina en color 11-2A).¹³⁰ El sistema Rapad NH también contiene una prueba de hidrólisis del éster del ácido graso para ayudar en la identificación de *M. catarrhalis*. El indoxil acetato, que se usa para la identificación de especies de *Campylobacter*, también puede usarse como sustrato para la enzima estearasa de *M. catarrhalis*.^{320,615} Además, la mayoría de las cepas de *M. catarrhalis* clínicamente significativas producen una β -lactamasa asociada con la célula, inducible (véase más adelante).¹⁹⁶ Debido a su naturaleza inducible, las pruebas rápidas de β -lactamasa acidométricas (que se basan en la conversión de la hidrólisis de la penicilina en ácido peniciloico) pueden producir resultados falsos negativos. Los mejores resultados se obtienen con el método yodométrico con la prueba de la cefalosporina cromogénica.⁴⁴⁷

Con el reconocimiento de *M. catarrhalis* como un patógeno primario en ciertos medios clínicos y ante la sospecha de que puedan ocurrir infecciones hospitalarias por este microorganismo, se han investigado métodos para la tipificación de las cepas.^{309,454} como biotipificación enzimática, electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas de células completas, análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción obtenidos con endonucleasas.^{418,429,454} Estas técnicas han sido aplicadas a investigaciones de brotes de enfermedad del aparato respiratorio en unidades de cuidados intensivos en los Estados Unidos y en otros países.^{494,531} Dos de los métodos de tipificación de DNA, el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción obtenidos con endonucleasas generados por sondas y el análisis de fragmentos polimorfos modificados por simple adaptador, se usaron recientemente para demostrar la existencia de dos subgrupos dentro de *M. catarrhalis* que pueden representar subespecies separadas.⁷⁸

Sensibilidad de las especies de *Neisseria* a los antibióticos

Neisseria gonorrhoeae

A poco de su descubrimiento durante la década de 1940, la penicilina se convirtió rápidamente en el tratamiento de elección para la gonorrea. Desde la década de 1950 hasta mediados de los años setenta, los programas de tratamiento con penicilina fueron actualizados en forma regular para conservar la resis-

tencia creciente al fármaco y se usaron otros antibióticos (p. ej., tetraciclinas y macrólidos) para el tratamiento. El aumento de la resistencia obedeció a mutaciones en varios genes cromosómicos, como *mtr* y *env*, que codifican proteínas que participan en el flujo de sustratos y en la permeabilidad de la membrana, y *penA*, que codifica la proteína 2 de unión a la penicilina. En 1976, las cepas de *N. gonorrhoeae* con elevado nivel de resistencia a la penicilina fueron llevadas a los Estados Unidos desde África Occidental y el Lejano Oriente. Estas cepas contenían plásmidos que transportaban genes para una enzima β -lactamasa y se les dio el nombre de "PPNG" por ser *N. gonorrhoeae* productora de penicilinasa.³⁰¹ Entre 1976 y 1979, las cepas PPNG fueron asociadas con brotes esporádicos en los Estados Unidos y, entre 1979 y 1982, el número de casos de gonorrea causados por cepas PPNG aumentó 15 veces, con grandes brotes en Nueva York, Los Ángeles y Miami. Desde mediados de la década de 1980, las cepas PPNG se volvieron endémicas en varias áreas metropolitanas de los Estados Unidos.⁷¹¹ En la actualidad, se recomienda el uso de espectinomina para el tratamiento de estas infecciones. Sin embargo, hacia 1981 se había informado sobre cuatro cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a la espectinomina y más tarde también aparecieron cepas de PPNG resistentes a ese agente.^{37,511,736} Esa resistencia se debe a una mutación en un solo paso en el RNA 16S ribosómico (rRNA) que produce una elevada resistencia (CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$ o mayores).²⁴⁵

En 1983, se produjo un brote causado por gonococos β -lactamasa negativos, resistentes a la penicilina en Carolina del Norte.¹³⁰ Estas cepas carecían del plásmido β -lactamasa y fueron negativas en las pruebas para la detección de β -lactamasa. Su elevado nivel de resistencia a la penicilina se debió a mutaciones cromosómicas en el loci que contribuye a la resistencia a los antibióticos y se las designó *N. gonorrhoeae* resistentes mediadas cromosómicamente (CMRNG). En octubre de 1984, se informaron a los CDC 446 casos de infecciones por CMRNG de 23 estados que se habían sometido a un cribado para este tipo de resistencia.⁵²⁷ Las cepas CMRNG tienen CIM de penicilina mayores de 1 $\mu\text{g/mL}$, y el 75% de ellos, CIM mayores de 2 $\mu\text{g/mL}$. Las CMRNG también son moderadamente resistentes a la tetraciclina (CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$), muestran sensibilidad disminuida a eritromicina, cefoxitina y trimetoprim-sulfametoxazol, y a menudo son sensibles a espectinomina y ceftriaxona.

En 1985, los CDC informaron sobre 12 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en Georgia, Pensilvania y New Hampshire de pacientes en quienes la terapia con tetraciclina había fracasado (*N. gonorrhoeae* resistente a la tetraciclina [TRNG]).¹³¹ La prueba de sensibilidad por dilución en agar mostró un nivel elevado de resistencia a la tetraciclina (CIM de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$) y a la doxiciclina (CIM de 8-32 $\mu\text{g/mL}$), pero con sensibilidad a la penicilina (CIM de 0,008 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$), la espectinomina y la cefotaxima. Estas cepas también son moderadamente resistentes a cefoxitina. Estudios actuales han determinado que *N. gonorrhoeae* resistente a la tetraciclina (TRNG) hospeda un plásmido de 25,2 mDa construido por la inserción de un determinante de resistencia a la tetraciclina (*tetM*) en el plásmido conjugativo de 24,5 mDa encontrado en algunas cepas gonocócicas.^{364,456} Este gen asociado con el transposón también se halló en estreptococos, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Kingella denitrificans*, *Eikenella corrodens* y algunas *N. meningitidis*.^{358,541,667} El plásmido conjugativo que transporta el determinante *tetM* puede ser transferido a cepas de *N. gonorrhoeae* receptoras por transformación o conjugación.^{541,542} Se cree que el determinante

tetM codifica una proteína o proteínas que interactúan con el ribosoma gonocócico para impedir la inhibición de la síntesis proteica por tetraciclina.

Con la caracterización de estas cepas resistentes, los investigadores de los CDC han delineado cinco fenotipos de resistencia en cepas de *N. gonorrhoeae*.⁵²⁸ Estos fenotipos son 1) cepas sensibles a la penicilina (CIM < 2 µg/mL), 2) cepas productoras de penicilinas (PPNG, β-lactamasa positiva), 3) cepas con nivel elevado de resistencia a la tetraciclina mediada por plásmidos (TRNG, CIM ≥ 2 µg/mL) que tienen el determinante *tetM*, 4) cepas con resistencia a la penicilina mediada cromosómicamente (CMRNG, CIM ≥ 2 µg/mL) y 5) cepas con nivel elevado de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina mediada por plásmido (β-lactamasa positiva con el determinante *tetM*). La aparición y la diseminación de otros determinantes de resistencia entre estos cinco fenotipos forman las bases de la implementación de la vigilancia gonocócica conducida por todos los Estados Unidos por los CDC.^{139,140,264}

A causa de la resistencia creciente de *N. gonorrhoeae* a los antibióticos ya comentada y sobre la base de varios estudios clínicos de eficacia controlados, el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos recomienda que todos los pacientes con infecciones gonocócicas no complicadas reciban uno de los cinco regímenes de tratamiento de dosis única.¹⁴² Estos son ceftriaxona (125 mg por vía intramuscular), y cefixima (400 mg), ciprofloxacina (500 mg), ofloxacina (400 mg) y levofloxacina (250 mg) todos por vía oral. Cada una de estas terapias incluye también azitromicina (1 g por vía oral) o doxiciclina (100 mg, dos veces por día durante 7 días por vía oral) para el tratamiento de la coinfección por *Chlamydia trachomatis*. Las mujeres embarazadas deben ser tratadas con ceftriaxona (250 mg por vía intramuscular) seguida de 7 a 10 días de eritromicina, porque las cefalosporinas orales no han sido estudiadas en esta población, y las quinolonas y las tetraciclinas están contraindicadas en las embarazadas. En las PHS Treatment Guidelines también se han incluido regímenes adicionales para pacientes internadas y ambulatorias con salpingitis e infecciones gonocócicas diseminadas, ya sea hospitalizados o ambulatorios.¹⁴² En la actualidad, no se ha identificado resistencia significativa a las cefalosporinas para los tratamientos recomendados de infecciones gonocócicas.^{239,342}

Aun cuando no se haya observado resistencia a las nuevas cefalosporinas, el surgimiento de cepas de *N. gonorrhoeae* con sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas es problemático.²⁴⁰ En Europa, las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina se usaron para el tratamiento de infecciones gonocócicas a finales de la década de 1980 y a principios de 1990, se observó en el Reino Unido el fracaso de ese tratamiento.²⁶⁷ Más tarde, se documentaron fracasos similares en pacientes tratados con fluoroquinolonas en el Lejano Oriente, Canadá, Australia y los Estados Unidos.^{132,138,338,643,644} La prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas gonocócicas de pacientes en quienes la terapia oral con 250 mg de ciprofloxacina no obtuvo buenos resultados tenían una CIM para ciprofloxacina de 0,06 a 0,25 µg/mL, mientras que las cepas de infecciones tratadas con 500 mg orales de ciprofloxacina o 400 mg de ofloxacina tenían una CIM ≥ 1 µg/mL y 2 µg/mL, respectivamente.^{267,337,338,643,644} Sobre la base de los niveles séricos pico alcanzados después de la administración oral, los CDC propusieron criterios para la interpretación de sensibilidades in vitro a ciprofloxacina, ofloxacina y otras fluoroquinolonas. Las cepas con resistencia intermedia a ciprofloxacina y ofloxacina tienen CIM de 0,125 a 0,5 µg/mL y de 0,5 a 1 µg/mL, respectivamente. Las cepas resistentes a ciprofloxacina y ofloxacina tienen CIM ≥ 1 µg/mL

y ≥ 2 µg/mL, respectivamente.³⁵⁵ Las cepas de *N. gonorrhoeae* que han disminuido la sensibilidad o que son resistentes a ciprofloxacina y ofloxacina se han documentado en diversas regiones geográficas, entre ellas Canadá, Australia, Hong Kong, Japón, Tailandia, las Filipinas, España, el Reino Unido y los Estados Unidos.^{132,158,354,359,362,363,537,641,644} Algunas de estas cepas tienen CIM para ciprofloxacina de hasta 2 µg/mL.^{354,359} Las cepas altamente resistentes a las fluoroquinolonas se recuperaron de pacientes que habían viajado al sudeste asiático o eran contactos sexuales de individuos que habían estado allí. Estas cepas también eran resistentes a la penicilina y muchas lo eran, además, a la tetraciclina, pero todas eran sensibles a ceftriaxona y cefixima. En la mayoría de estas regiones, la prevalencia de cepas con sensibilidad disminuida o resistencia a las fluoroquinolonas está en aumento. Las cepas resistentes a la fluoroquinolona tienen mutaciones de genes que derivan en sustituciones de aminoácidos en las subunidades A y B (GyrA y GyrB, respectivamente) de la DNA girasa, y en la subunidad que codifica *parC* de la topoisomerasa IV.^{57,179,621}

La disminución de la sensibilidad y la resistencia a las fluoroquinolonas de *N. gonorrhoeae* pronostican que la utilidad de esos agentes para el tratamiento de la gonorrea necesitará revisión en un futuro cercano.²⁴⁰ La vigilancia adicional de la sensibilidad antimicrobiana gonocócica en determinados grupos de pacientes (p. ej., mujeres con enfermedad inflamatoria pelviana u otras complicaciones) que puedan recibir otros antibióticos (p. ej., cefoxitina, clindamicina, metronidazol, y gentamicina) también es necesaria para evitar la emergencia de resistencias clínicamente importantes.⁵²⁹ Aunque la azitromicina no es un tratamiento recomendado para la gonorrea, puede ser útil en regiones donde la resistencia a la quinolona es prevalente. Para la terapia con azitromicina, se recomienda un régimen oral de 2 g más que el régimen de 1 g usado para el tratamiento de infecciones por clamidia. Los fracasos clínicos siguientes al tratamiento con regímenes de 1 g y 2 g de azitromicina se han asociado con cepas que tienen CIM para azitromicina de 0,125-0,25 µg/mL y ≤ 0,5 µg/mL, respectivamente.^{284,646} En algunas regiones de los Estados Unidos se comunicó el aislamiento de gonococos poco sensibles a la azitromicina (CIM ≥ 1 µg/mL).^{138,139}

Los CDC también han efectuado recomendaciones sobre indicaciones y métodos para probar la sensibilidad a los antibióticos de *N. gonorrhoeae*, los cuales se refieren más a una mayor vigilancia de los patrones de resistencia gonocócica que al manejo de pacientes individuales. En 1989, se publicó un estudio multicéntrico en el que se determinaron los criterios interpretativos para la dilución en agar y la difusión con discos para penicilina, tetraciclina, espectinomina y ceftriaxona.³²⁹ Las guías para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *N. gonorrhoeae* han sido publicadas y son actualizadas continuamente por el National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS).⁴⁶⁹ En la actualidad, los puntos de corte de la dilución en agar y la difusión con discos de *N. gonorrhoeae* están disponibles para penicilina, cefalosporinas parenterales, cefalosporinas orales (p. ej., cefixima), tetraciclina, fluoroquinolonas y espectinomina.⁴⁶⁹ Además de la dilución en agar y la difusión con discos, la prueba E (AB Biodisk®, Solna, Noruega) ha sido usada para determinar la sensibilidad a los antibióticos de *N. gonorrhoeae*.^{682,728}

Neisseria meningitidis

A pesar de la recuperación ocasional de cepas de *N. meningitidis* con sensibilidad disminuida a la penicilina, la penicilina

G sigue siendo el fármaco de elección en los Estados Unidos para el tratamiento de la meningitis meningocócica, porque la gran mayoría de las cepas son sensibles a la penicilina y a la ampicilina.¹³⁴ Para el tratamiento de infecciones meningocócicas graves, se administra penicilina G parenteral (300 000 U/kg/día) durante 10 a 14 días. El cloranfenicol (100 mg/kg/día) hasta 4 g/día es una alternativa para los pacientes alérgicos a la penicilina. Las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima y ceftazidima) alcanzan niveles en LCR que son varios miles de veces la CIM de la cepa infectante, y estos antibióticos se han usado con éxito en el tratamiento de la enfermedad meningocócica; la ceftriaxona (niños, 50 mg/kg/día hasta 4 g; adultos, 2 g/día) es un régimen parenteral generalmente recomendado. Además de la terapia con antibióticos, los pacientes con enfermedad meningocócica grave requieren cuidados intensivos, incluido el manejo del estado de shock y el control cuidadoso de los signos vitales para la detección de complicaciones (p. ej., síndrome de dificultad respiratoria aguda, secuela neurológica, pericarditis) y progresión de la enfermedad (p. ej., estudios para detectar coagulación intravascular diseminada).^{119,680} Las nuevas terapias complementarias, como la proteína recombinante humana que aumenta la permeabilidad y de acción bactericida, se muestran promisorias en la prevención de la falla multiorgánica debido a la endotoxemia.²⁶⁰ Otros agentes biológicos, como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la endotoxina o contra citocinas involucradas en el shock séptico meningocócico (p. ej., IL-1, IL-6, TNF- α) también pueden desempeñar un papel como intervenciones terapéuticas complementarias.^{93,182,680,699}

No obstante el hecho de que la gran mayoría de las cepas, en particular en los Estados Unidos, continúan siendo sensibles a la penicilina, se ha acumulado evidencia que muestra que los perfiles de sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *N. meningitidis* también están evolucionando. Históricamente, las cepas de *N. meningitidis* sensibles a la penicilina tienen una CIM para penicilina $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$. En 1983, Dillon y cols. aislaron en Canadá la primera cepa meningocócica productora de β -lactamasa de una muestra urogenital.¹⁸⁹ Esta cepa albergaba el plásmido β -lactamasa de 4,5 Mda gonocócico y el plásmido conjugativo de 24,5 Mda. Posterior a este caso, sólo se han publicado tres aislamientos de *N. meningitidis* productora de β -lactamasa: dos cepas se aislaron en 1988 de dos pacientes con meningitis en Sudáfrica y la cuarta fue recuperada en 1989 de una paciente en España.^{83,237,561} Las cepas β -lactamasa positivas tienen CIM para penicilina mayores de $256 \mu\text{g/mL}$. En 1987, se aisló una cepa de *N. meningitidis* que había disminuido su sensibilidad a la penicilina (CIM $> 0,06 \mu\text{g/mL}$), pero que era β -lactamasa negativa.⁵⁶³ Estas cepas se mencionan como relativamente resistentes, moderadamente sensibles o con sensibilidad disminuida a la penicilina. Desde aquel momento, se han informado otros aislamientos con características similares en el Reino Unido, Europa, Grecia, Sudáfrica y los Estados Unidos.^{71,100,314,632,670,675,687,724} En España, la frecuencia de aislamiento de estas cepas ha aumentado del 0,4% en 1985 al 67% en 1994, mientras que la frecuencia de estas cepas en el Reino Unido permanece estable en alrededor del 9%.^{35,236} En 1997, la vigilancia activa realizada por los CDC acumuló 90 aislamientos de 121 casos de enfermedad meningocócica informada. De ellos, tres ($< 3\%$) fueron moderadamente sensibles a la penicilina con una CIM de $0,12 \mu\text{g/mL}$.⁵⁵¹ De las 87 cepas sensibles a la penicilina restantes, 49 tenían una CIM de $0,06 \mu\text{g/mL}$; las variedades con sensibilidad disminuida tenían CIM que iban de $0,10 \mu\text{g/mL}$ a $1 \mu\text{g/mL}$.^{551,564} Las variedades resis-

tentes se definen como las que tienen una CIM para penicilina $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. La mayoría de los meningococos relativamente resistentes que se han informado pertenecen a los serogrupos B o C.^{35,60,71,236} La resistencia a penicilina/ampicilina también puede surgir durante la terapia con estos antibióticos. En el informe de un caso interesante, se aisló una cepa de *N. meningitidis* del serogrupo W-135 resistente a la ampicilina en los hemocultivos de una mujer de 82 años con shock séptico mortal.²⁶³ Los aislamientos iniciales de sangre y esputo eran sensibles a la penicilina (CIM = $0,05 \mu\text{g/mL}$) y la ampicilina ($0,016 \mu\text{g/mL}$). A pesar de los 7 días de terapia con ampicilina en altas dosis, la paciente murió. La cepa aislada en la sangre 7 días después de la internación se había vuelto moderadamente resistente tanto a penicilina (CIM = $1 \mu\text{g/mL}$) como a la ampicilina (CIM = $1,2 \mu\text{g/mL}$).

La sensibilidad disminuida a la penicilina en las cepas de *N. meningitidis* moderadamente resistentes se debe a una reducción de la unión del antibiótico causada por alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBP 2 y PBP 3) de la pared celular meningocócica.⁴³⁵ En el caso de las proteínas PBP 2, la unión disminuida de la penicilina resulta de una secuencia de nucleótidos alterada del gen de PBP 2, *penA*.⁷³⁸ Las formas de baja afinidad similares de PBP 2 se encuentran en cepas resistentes a la penicilina de otras especies de *Neisseria*, entre ellas *N. lactamica*, *N. flavescens*, *N. polysaccharaea* y *N. gonorrhoeae*. Las formas de PBP 2 de baja afinidad alteradas en las cepas de *N. meningitidis* surgen de eventos de recombinación que derivan en el reemplazo de secuencias en el gen *penA* meningocócico nativo con material genético correspondiente de especies de *Neisseria* comensales.^{90,564,565,616}

La importancia clínica de la sensibilidad a la penicilina disminuida en *N. meningitidis* no está clara hasta ahora. Aunque se han observado fracasos en el tratamiento y altas tasas de complicaciones en pacientes infectados con cepas relativamente resistentes, la administración de dosis mayores de penicilina ha sido clínicamente eficaz.^{560,668} Ciertas cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona y cefotaxima, son activas contra las cepas de *N. meningitidis* sensibles y moderadamente sensibles, pero las CIM de algunos antibióticos para estas últimas —en particular, cefuroxima, aztreonam e imipenem— pueden ser más elevadas que las de las cepas sensibles.⁴⁹⁹ Meropenem es muy activo contra los meningococos, con más del 90% de las cepas inhibidas por $\leq 1 \mu\text{g/mL}$.^{3,504}

Las cepas de *N. meningitidis* también han mostrado resistencia a otros antibióticos. Se informó un nivel elevado de resistencia a cloranfenicol en aislamientos en Francia y Vietnam.²⁴⁶ El temor a la diseminación de la resistencia al cloranfenicol está justificado porque el fármaco es el pilar del tratamiento de la meningitis en el África subsahariana.⁶¹¹ Ahora está diseminado el elevado nivel de resistencia a las sulfonamidas, el fármaco usado antes para la profilaxis y es común encontrarlo entre ciertos clones epidémicos del serogrupo A de *N. meningitidis*.⁶¹¹ En un estudio llevado a cabo en España, el 43,6% de las 55 cepas tanto de casos como de portadores eran resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol.²³⁶ El surgimiento de la resistencia a la rifampicina se observó incluso durante la administración de profilaxis con rifampicina.¹⁶⁶ La resistencia a la rifampicina surge debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular o a mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa meningocócica.² En 2000, se aisló en Australia una cepa de *N. meningitidis* con sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina (CIM de $0,25 \mu\text{g/mL}$) de una mujer de 19 años que tenía una enfermedad meningocócica invasora.⁵⁸⁷ Las cepas sensibles tienen una CIM para

ciprofloxacina $\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$. La amplificación por PCR y la secuenciación del gen *gyrA* de este aislamiento revelaron una diferencia de tres nucleótidos con las cepas sensibles a la ciprofloxacina tipo silvestre. Se ha mencionado la adquisición por *N. meningitidis* del determinante a la resistencia a tetraciclina, *tetM*.⁶⁶⁷

La prueba de sensibilidad a los antibióticos de *N. meningitidis* es dificultosa y las determinaciones de CIM son los métodos de elección.⁶⁴⁸ No están disponibles los estándares aceptados y los puntos de corte para *N. meningitidis*, y las evaluaciones de los métodos de difusión con discos usando discos de penicilina, oxacilina, ampicilina y rifampicina han dado resultados decepcionantes.^{70,109,110,305,500} El NCCLS recomienda la microdilución en caldo o la dilución en agar para la determinación de la CIM de *N. meningitidis* usando caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes con 2-5% de sangre de caballo lacada o agar de Mueller-Hinton con 5% (v/v) de sangre de carnero, respectivamente.⁴⁶⁹ La prueba E también puede resultar valiosa para determinar la sensibilidad a los antibióticos de aislamientos meningocócicos individuales.^{305,500} En algunos informes publicados sobre sensibilidad meningocócica a otros antibióticos, a menudo se usan los puntos de corte de las CIM de *N. gonorrhoeae* para la interpretación.³⁵ Como la mayoría de los laboratorios microbiológicos clínicos no están equipados para realizar las pruebas de dilución en agar, los meningococos aislados en pacientes que no responden a la quimioterapia antibiótica apropiada y algunos que se presumen resistentes a la penicilina deben probarse para la producción de β -lactamasa con la prueba de cefalosporina cromogénica (Nitrocefín®, BD Biosciences) y remitirse a un laboratorio de referencia para la prueba de sensibilidad por dilución en agar.

Puesto que no se han establecido los criterios del tamaño de la zona para otras especies de *Neisseria*, el método de dilución en agar es el de elección para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos. Hay informes anecdóticos de que el procedimiento de difusión con discos, el procedimiento de dilución en agar y los criterios de interpretación publicados por el NCCLS para gonococos también pueden utilizarse para otras especies de *Neisseria*.⁴⁶⁹ Aunque estos microorganismos suelen crecer bien en el agar de Muller-Hinton suplementado con sangre recomendado por el NCCLS, algunas cepas pueden requerir una suplementación del medio con aditivos como IsoVitalax®.

Sensibilidad a los antibióticos de *Moraxella catarrhalis*

La aparición y la diseminación de la resistencia a los antibióticos entre *Neisseria* patógenas también están reflejadas en la sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *M. catarrhalis*. Antes de mediados de la década de 1970, este microorganismo era muy sensible a los antibióticos. *M. catarrhalis* β -lactamasa positiva fue aislada por primera vez en 1976; hacia finales de esa década, cerca del 75% de las cepas producían enzimas β -lactamasa. Un estudio de Doern y Tubert mostró que las pruebas en tubo y con disco de cefalosporina cromogénica (Nitrocefín®) tenían una sensibilidad superior para la detección de β -lactamasa cuando se las comparaba con las pruebas que usan cefalosporina piridin-2-azo-*p*-dimetilnilina (PADAC), los procedimientos acidométricos y yodométricos en tubo y con disco.¹⁹⁶ En el laboratorio clínico, las cepas de *M. catarrhalis* deben ser probadas para la producción de β -lactamasa, de preferencia con la prueba de cefalosporina cromogénica.⁴⁴⁷

Las pruebas de sensibilidad a la ampicilina de dilución en caldo para aislamientos de *M. catarrhalis* pueden dar resultados confusos. Algunas cepas productoras de β -lactamasa tendrán CIM elevadas para ampicilina (12,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$), mientras que otras tendrán CIM bajas (0,10 a 0,40 $\mu\text{g/mL}$). Las pruebas de dilución en caldo para ampicilina para las últimas cepas son dependientes del inóculo.⁷²⁷ Con inóculos más pequeños (10^4 UFC/mL), estas cepas se muestran sensibles a la ampicilina y a otros β -lactámicos. Con inóculos mayores (10^7 UFC/mL), tienen CIM más elevadas y son resistentes. El efecto inóculo se observó para ampicilina, penicilina G, cefalotina, cefamandol, cefuroxima y cefaclor.

Estudios de las enzimas β -lactamasa de *M. catarrhalis* han mostrado la existencia de dos tipos de enzimas en las cepas de estos microorganismos.^{701,702} BRO-1 (o tipo Ravisio) y BRO-2 (o tipo 1908).^{308,702} Una tercera enzima β -lactamasa, BRO-3, fue descrita por Christensen y cols. en 1991, pero ahora se sabe que es un precursor unido a la membrana de las otras enzimas BRO.^{152,622} El nombre "BRO" es una contracción de "BRanhamella y mOraxella", debido a que se han encontrado β -lactamasas similares en moraxellas baciliformes.⁷⁰¹ Las cepas de *M. catarrhalis* producen BRO-1 o BRO-2 y estas enzimas pueden diferenciarse por isoelectroenfoque. Las cepas que producen enzimas PRO-1 dan cuenta de casi el 90% de los aislamientos de *M. catarrhalis* productores de β -lactamasa de muestras clínicas, mientras que las productoras de BRO-2 constituyen el 10% restante.^{203,701} El análisis molecular de la producción de β -lactamasa indica que la enzima BRO-1 está codificada por un gen cromosómico único (*bla*) que codifica un polipéptido de 314 aminoácidos.⁸⁰ El análisis de la secuencia de los genes *bla* de las cepas productoras de BRO-1 y BRO-2 difiere en cinco bases de nucleótidos que deriva en un solo residuo aminoácido de diferencia en las secuencias de aminoácidos de las enzimas BRO-1 y BRO-2. Sin embargo, se encontró una delección en el par de bases 21 en la región del promotor del gen BRO-2. Las diferencias en las CIM de las cepas de *M. catarrhalis* productoras de BRO-1 y BRO-2 pueden explicarse por los niveles más bajos de producción de BRO-2 debidos a la delección en la región del promotor, mientras que la estructura y las actividades enzimáticas de las dos enzimas son similares.⁸⁰ Los pacientes que han estado infectados con cepas de *M. catarrhalis* productoras de β -lactamasa BRO-2 también han respondido clínicamente a la penicilina y la ampicilina. La BRO-1 tiene un peso molecular de casi 32,5 kDa. Las variaciones en el peso molecular informado de esta enzima, que oscilan desde 28 kDa hasta 41 kDa, se explican por la presencia de formas de BRO-1 libres y asociadas con lípidos.⁷⁷ La prevalencia de cepas que producen enzimas BRO-1 o BRO-2 también difiere. Entre los aislamientos clínicos de *M. catarrhalis* recolectados en estudios de vigilancia multicéntricos durante 1994-1995 y durante 1997-1998, la prevalencia de cepas productoras de BRO-1 y BRO-2 fueron del 97,5% y el 2,5%, respectivamente.⁵³³ El gen *bla* puede estar asociado con transposón y ser transferible por mecanismos conjugativos o transformacionales.^{79,339,702} Los estudios in vitro indican que las β -lactamasas de *M. catarrhalis* pueden intervenir indirectamente en la virulencia al inactivar la penicilina o la ampicilina administradas por otras infecciones respiratorias, como la neumonía neumocócica.²⁹⁶

Varios estudios llevados a cabo en los Estados Unidos y en el exterior señalan que las cepas de *M. catarrhalis* son casi siempre sensibles a amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de segunda y tercera generación (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftibuteno) y los antibióticos orales cefixi-

y cefaclor), macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina), tetraciclinas y rifampicina.^{72,99,195,224,568,653,654,700,737}

Mientras que la mayoría de las cepas son sensibles a las fluoroquinolonas (incluidas ciprofloxacina, levofloxacina, esparfloxacina, grepafloxacina, trovafloxacina y gemifloxacina), la resistencia a las fluoroquinolonas ha surgido en aislamientos obtenidos de pacientes que recibían esos fármacos durante períodos prolongados.^{122,175,183,190,419,512} Con excepción de las variaciones de producción de β -lactamasas, no se han señalado diferencias notorias en las sensibilidades a los antibióticos de las cepas de *M. catarrhalis* aisladas en distintos países (entre ellos Japón, el Reino Unido, Alemania, España, Francia, Italia y los Estados Unidos).⁵⁶⁸ Algunas cepas raras de *M. catarrhalis* pueden ser resistentes a tetraciclinas, macrólidos o trimetoprim-sulfametoxazol.^{653,737}

En el capítulo 17 se presenta una información más detallada acerca de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos para estos microorganismos.

REFERENCIAS

- Aakre RK, Jenkins A, Kristiansen B-E, Frohohn LO. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* isolates from the Norwegian county of Telemark, 1987-1995. *J Clin Microbiol* 1998;36:2623-2628.
- Abadi FJR, Carter PE, Cash P, Pennington TH. Rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:646-651.
- Abadi FJR, Yakubu DE, Pennington TH. In vitro activities of meropenem and other antimicrobial agents against British meningococcal isolates. *Chemotherapy* 1999;45:253-257.
- Abiteboul M, Mazieres, Causse B, et al. Septic arthritis of the knee due to *Neisseria mucosa*. *Clin Rheumatol* 1985;4:83-85.
- Abuhammour WM, Abdel-Haq NM, Asmar BI, Dajani AS. *Moraxella catarrhalis* bacteremia: a 10-year experience. *South Med J* 1999;92:1071-1074.
- Aeby C, Cope LD, Latimer JL, et al. Mapping of a protective epitope of the CopB outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun* 1998;66:540-548.
- Aeby C, LaFontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic effect of isogeni UspA1 and UspA2 mutations on *Moraxella catarrhalis* strain O35E. *Infect Immun* 1998;66:3113-3119.
- Aeby C, Stone B, Beucher M, et al. Expression of the CopB outer membrane protein by *Moraxella catarrhalis* is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin. *Infect Immun* 1996;64:2024-2030.
- Agraharkar M, Fahlen M, Siddiqui M, Rajaraman S. Waterhouse-Friderichsen syndrome and bilateral cortical necrosis in meningococcal sepsis. *Am J Kidney Dis* 2000;36:396-400.
- Aguado IM, Vada J, Zuoiga M. Meningococemia: an undescribed cause of community-acquired bacteremia in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Am J Med* 1990;88:314.
- Ahmad H, Chapnick EK. Conjugated polysaccharide vaccines. In: Lutwick LI, ed.: *Infectious Diseases Clinics of North America*. Vol. 13. New vaccines and new vaccine technology. Philadelphia: WB Saunders, 1999;113-133.
- Ahmed K. Fimbriae of *Branhamella catarrhalis* as possible mediators of adherence to pharyngeal epithelial cell. *APMIS* 1992;100:1066-1072.
- Ahmed K, Matsumoto K, Rikitomi N, Nagatake T. Attachment of *Moraxella catarrhalis* to pharyngeal epithelial cells is mediated by a glycosphingolipid receptor. *FEMS Microbiol Lett* 1996;135:305-309.
- Akduman D, Ehret JM, Messina K, et al. Evaluation of the strand displacement amplification assay (BD ProbeTect-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:281-283.
- Ala'aldin DAA, Cartwright KCV. *Neisseria meningitidis*: vaccines and vaccine candidates. *J Infect* 1996;33:153-157.
- Ala'aldin DAA, Neal KR, Ait-Tahar K, et al. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 2000;38:2311-2316.
- Ala'aldin DAA, Stevenson P, Griffiths E, et al. Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: implications for vaccine design. *Infect Immun* 1994;162:2984-2990.
- Alexander WJ, Griffith H, Housch JG, et al. Infections in sexual contacts and associates of children with gonorrhea. *Sex Transm Dis* 1984;11:156-158.
- Al-Zamil F, Al-Ballaa S, Nazer H, et al. Meningococcalemia: a life-threatening complication of upper gastrointestinal endoscopy. *J Infect* 1994;28:73-75.
- American Academy of Pediatrics Committee on Child Abuse and Neglect. Gonorrhea in prepubertal children. *Pediatrics* 1998;101:134-135.
- American Health Consultants. Vaccine could have saved lab workers from deadly meningitis infections. *Hosp Infect Control* 2001;28:45-60.
- Amsel BJ, Mouljijn AC. Nonfebrile mitral valve endocarditis due to *Neisseria subflava*. *Chest* 1996;109:280-282.
- Anand CM, Ash F, Shaw H, et al. Variability in growth of *Neisseria polysaccharea* on colistin-containing selective media for *Neisseria* spp. *J Clin Microbiol* 1991;29:2434-2437.
- Anand CM, Gubash SM, Shaw H. Serologic confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* by monoclonal antibody-based coagglutination reagents. *J Clin Microbiol* 1988;26:2283-2286.
- Andersen BM, Steigerwalt AG, O'Connor SP, et al. *Neisseria weaveri* sp. nov. formerly CDC group M-5, a gram-negative bacterium associated with dog bite wounds. *J Clin Microbiol* 1993;31:2456-2466.
- Andersen BM, Weyant RS, Steigerwalt AG, et al. Characterization of *Neisseria elongata* subsp. glycolytica isolates obtained from human wound specimens and blood cultures. *J Clin Microbiol* 1995;33:7678.
- Andersen J, Berthelsen L, Jensen BB, Lind I. Surveillance of cases of meningococcal disease associated with military recruits studied for meningococcal carriage. *Scand J Infect Dis* 2000;32:527-531.
- Andersen J, Lind I. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates and clinical features of meningococcal conjunctivitis in ten patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:388-393.
- Anderson B, Albritton WL, Biddle J, et al. Common β -lactamase specifying plasmid in *Haemophilus ducreyi* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:296-297.
- Anderson C. Childhood sexually transmitted diseases: one consequence of sexual abuse. *Publ Health Nurs* 1995;12:41-46.
- Anderson MD, Miller LK. Endocarditis due to *Neisseria mucosa*. *Clin Infect Dis* 1993;16:184.
- Apfalter P, Horler R, Nehrer S. *Neisseria meningitidis* serogroup W-135 primary monoarthritis of the hip in an immunocompetent child. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:475-476.
- Apicella MA. *Neisseria meningitidis*. In: Mandell CL, Bennett JE, Dolin R, eds.: *Mandell, Douglas, and Bensen's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2000;2228-2241.
- Apicella MA, Shero M, Jarvis GA, et al. Phenotypic variation in epitope expression of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *Infect Immun* 1987;55:1755-1751.
- Arreaza L, de la Fuente L, Vazquez JA. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1705-1707.
- Arreaza L, Salcedo C, Alcalá B, Vazquez JA. What about antibiotic resistance in *Neisseria lactamica*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:545-547.
- Ashford WA, Pous DW, Adams HJ, et al. Spectinomycin-resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* 1981;2:1035-1037.
- Ashton PE, Mancino L, Ryan AJ, et al. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains associated with meningococcal disease in Canada, 1977-1989. *Can J Microbiol* 1991;37:613-617.
- Ashton FE, Ryan JA, Borczyk A, et al. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. *J Clin Microbiol* 1991;29:2489-2493.
- Asnis DS, Brennessel DJ. Gonococcal scalp abscess: a risk of intrauterine monitoring. *Clin Pediatr (Phila)* 1992;31:316-317.
- Asier H, Chosidow O, Rekaewicz I, et al. Chronic meningococemia in acquired immunodeficiency infection. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:793-794.
- Au Y-K, Reynolds MD, Ramhin ED, et al. *Neisseria cinerea* purulent conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1990;109:96-97.
- Ayala P, Vazquez B, Wetzler L, So M. *Neisseria gonorrhoeae* porin PI.B induces endosome exocytosis and a redistribution of Lampl to the plasma membrane. *Infect Immun* 2002;70:5965-5971.
- Backman A, Orvelid P, Vazquez JA, et al. Complete sequence of a β -lactamase-encoding plasmid in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:210-212.
- Baevski RH. Primary meningococcal pericarditis. *Clin Infect Dis* 1999;29:213-214.
- Baralades MA, Domingo P, Barrio JL, et al. Meningitis due to *Neisseria subflava*: case report and review. *Clin Infect Dis* 2000;30:615-617.
- Barbe G, Baoolat M, Boeufgras JM, et al. Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:187-189.
- Barlow D. The diagnosis of oropharyngeal gonorrhea. *Genitourin Med* 1997;73:16-17.
- Barnes RA, Jenkins P, Coakley WT. Preliminary clinical evaluation of meningococcal disease and bacterial meningitis by ultrasonic enhancement. *Arch Dis Child* 1998;78:58-60.
- Barquet N, Gasser I, Domingo P, et al. Primary meningococcal conjunctivitis: report of 21 patients and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:838-847.
- Barrett SJ, Schlatter LK, et al. A new species of *Neisseria* from iguanid lizards, *Neisseria iguanae* sp. nov. *Lett Appl Microbiol* 1994;18:200-202.
- Ban A, Schuurman IGA, Achtman M, et al. Randomly amplified polymorphic DNA genotyping of serogroup A meningococci yields results similar to those obtained by multilocus enzyme electrophoresis and reveals new genotypes. *J Clin Microbiol* 1998;36:1746-1749.
- Bartoloni A, Norelli F, Ceccarini C, et al. Immunogenicity of the meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or to CRM147 via adipic acid dihydrazide. *Vaccine* 1995;13:463-470.
- Beck-Sague CM, Solomon F. Sexually transmitted diseases in abused children and adolescent and adult victims of rape: review of selected literature. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 1):S74-S83.

55. Beebe JL, Rau MP, Flageolle S, et al. Incidence of *Neisseria gonorrhoeae* isolates negative by Syva direct fluorescent-antibody test but positive by Gen-Probe Accuprobe test in a sexually transmitted disease clinic population. *J Clin Microbiol* 1993;31:2535-2537.
56. Belding ME, Carbone J. Gonococemia associated with adult respiratory distress syndrome. *Rev Infect Dis* 1991;13:1105-1107.
57. Belland RJ, Morrison SG, Ison C, Huang WM. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *ParC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol* 1994;14:371-380.
58. Beltrami JF, Farley TA, Hamrick JT, et al. Evaluation of the Gen-Probe PACE 2 assay for the detection of asymptomatic *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Infections in male arrestees. *Sex Transm Dis* 1998;25:501-504.
59. Berger SA, Gorea A, Peysser MR, et al. Bartholin's gland abscess caused by *Neisseria sicca*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1589.
60. Berron S, Vazquez JA. Increase in moderate penicillin resistance and serogroup C in meningococcal strains isolated in Spain: is there any relationship? *Clin Infect Dis* 1994;18:161-165.
61. Beucher M, Sparling PF. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1995;177:2041-2049.
62. Beverly A, Bailey-Gniffin JR, Schwebke JR. InTray GC medium versus modified Thayer-Martin agar plates for diagnosis of gonorrhea from endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3825-3826.
63. Bhal KS, Gibbs CP, Barrera O, et al. The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS 11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Mol Microbiol* 1992;6:1073-1076.
64. Bhushan R, Craiye R, Murphy TF. Molecular cloning and characterization of outer membrane protein E of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *J Bacteriol* 1994;176:6636-6643.
65. Billings SD, Fuller DeAnna, LeMonte AM, et al. Characterization of DFA-negative, probe-positive *Neisseria gonorrhoeae* by pulsed field electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:281-283.
66. Bjerknes R, Guttormsen H-K, Solberg SO, Wetzler LM. Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression and phagocytosis, but prime the neutrophils to increase their exudative burst. *Infect Immun* 1995;63:160-167.
67. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991;338:1093-1096.
68. Black JR, Black WJ, Cannon JG. *Neisseria* antigen H.8 is immunogenic in patients with disseminated gonococcal and meningococcal infection. *J Infect Dis* 1985;151:650-657.
69. Black JR, Dyer DW, Thompson MK, Sparling PF. Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1986;54:710-713.
70. Block C, Davidson Y, Keller N. Unreliability of disc diffusion test for screening for reduced penicillin susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3103-3104.
71. Blondeau JM, Ashton FE, Isaacson M, et al. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol* 1995;33:1784-1786.
72. Blondeau JM, Suter M, Borsoc S. Canadian Antimicrobial Study Group. Determination of the antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43(Suppl A):25-30.
73. Bodsworth NJ, Price R, Davies SC. Gonococcal infections of the neovagina in a male-to-female transsexual. *Sex Transm Dis* 1994;21:211-212.
74. Bodsworth NJ, Price R, Nelson MJ. A case of gonococcal mastitis in a male. *Genitourin Med* 1993;69:222-223.
75. Boehm DM, Bernhardt M, Kurzynski TA, et al. Evaluation of two commercial procedures for rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae* using a reference panel of antigenically diverse gonococci. *J Clin Microbiol* 1991;28:2099-2100.
76. Bonnah RA, Yu RH, Wong H, Schryvers AB. Biochemical and immunological properties of lactoferrin binding proteins from *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Microb Pathog* 1998;24:89-100.
77. Bootsma HJ, Aerts PC, Pothuma G, et al. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* BRO β -lactamase: a lipoprotein of gram-positive origin? *J Bacteriol* 1999;181:5090-5093.
78. Bootsma HJ, Van der Heide HGJ, Van de Pas S, et al. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits. *J Infect Dis* 2000;181:1376-1387.
79. Bootsma HJ, Van Dijk H, Vauterin P, et al. Genesis of BRO β -lactamase-producing *Moraxella catarrhalis* evidence for transformation-mediated horizontal transfer. *Mol Microbiol* 2000;36:93-104.
80. Hootsma HJ, Van Dijk H, Verhoef J, et al. Molecular characterization of the BRO β -lactamase of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Antimicrob Agent Chemother* 1996;40:966-972.
81. Borrow R, Claus H, Chaudhry U, et al. *sidA* PCR ELISA for the confirmation and identification of serogroup Y and W135 meningococcal infection. *FEMS Microbiol Lett* 1998;159:209-214.
82. Borrow R, Claus H, Guiver M, et al. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (*sidA*) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 1997;113:111-117.
83. Botha P. Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in southern Africa. *Lancet* 1988;1:54.
84. Bouquete MT, Marcos C, Saez-Nieto JA. Characterization of *Neisseria polysacchara* sp. nov. (Riou, 1983) in previously identified noncapsulated strains of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1986;23:973-975.
85. Bourbeau P, Holla V, Peimontese S. Ophthalmia neonatorum caused by *Neisseria cinerea*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1640-1641.
86. Bovre K. Proposal to divide the genus *Moraxella* Lwoff 1939 emend. Henriksen and Bovre 1968 into two subgenera, subgenus *Moraxella* (Lwoff 1939) Bovre 1979 and subgenus *Branhamella* (Catlin 1970) Bovre 1979. *Int J Syst Bacteriol* 1979;29:403-406.
87. Bovre K, Family VIII. *Neisseriaceae* Prevot 1933, 119^{AL}. In Krieg NR, Holt JG, eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984;288-290.
88. Bovre K, Genus II. *Moraxella* Lwoff 1939, 173 emend. Henriksen and Bovre 1968, 391. In Krieg NR, Holt JG, eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984;296-303.
89. Bovre K, Holten E. *Neisseria elongata* sp. nov., a rod-shaped member of the genus *Neisseria*: re-evaluation of cell shape as a criterion for classification. *J Gen Microbiol* 1970;60:67-75.
90. Bowler LD, Zhang Q-Y, Riou J-Y, et al. Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol* 1994;176:333-337.
91. Boyce JM, Mitchell EB. Difficulties in differentiating *Neisseria cinerea* from *Neisseria gonorrhoeae* in rapid systems used for identifying pathogenic *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 1985;22:731-734.
92. Boyce JM, Taylor MR, Mitchell EB, et al. Nosocomial pneumonia caused by a glucose-metabolizing strain of *Neisseria cinerea*. *J Clin Microbiol* 1985;21:1-3.
93. Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, et al. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock. *Microb Pathog* 1992;13:423-431.
94. Brandtzaeg P, Molne TE, Kierulf P. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989;160:58-65.
95. Brook MG, Clark S, Stirland A, et al. A case cluster of possible tissue invasive gonorrhoea. *Genitourin Med* 1995;71:126-128.
96. Brooks GF, Lammel CJ, Blake MS, et al. Antibodies against IgA₁ protease are stimulated both by clinical disease and asymptomatic carriage of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1992;166:1316-1321.
97. Broome CV. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 1986;18(Suppl A):25-34.
98. Bruce MG, Rosenstein NE, Capparella J, et al. Risk factors for meningococcal disease in college students (abstract). *Clin Infect Dis* 1999;29:973.
99. Brueggemann AB, Doern GV, Huynh HK, et al. In vitro activity of ABT, a new ketolide, against recent clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:447-449.
100. Brunen A, Peetermans W, Verhagen J, et al. Meningitis due to *Neisseria meningitidis* with intermediate susceptibility to penicillin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:969-970.
101. Brunham RC. The concept of core and its relevance to the epidemiology and control of sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* 2000;18:67-68.
102. Brunham RC, Plummer F, Slaney L, et al. Correlation of auxotype and protein I type with expression of disease due to *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1985;152:339-343.
103. Burnen IA, Denton K, Sutcliffe J. Cerebrospinal fluid shunt infection: an unusual case. *J Infect* 1990;22:205-206.
104. Butcher V, Welsh T, Willmitzer L, Kossman J. Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysacchara*: production of a linear α -1,4-glucan. *J Bacteriol* 1997;179:3324-3330.
105. Calanan D, Rubsamen PE. *Moraxella* infection of a scleral buckle. *Am J Ophthalmol* 1992;114:637-638.
106. Camarena JJ, Nogueira JM, Dasi MA, et al. DNA amplification fingerprinting for subtyping *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Sex Transm Dis* 1995;22:128-136.
107. Campagnari AA, Ducey TF, Rehmann CA. Outer membrane protein B1, an iron-repressible protein conserved in the outer membrane of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, binds human transferrin. *Infect Immun* 1996;64:3920-3924.
108. Campbell WN, Joshi M, Sileo D. Osteonecrosis following meningococemia and disseminated intravascular coagulation in an adult: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997;24:452-455.
109. Campos J. Disc testing of meningococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:879-880.
110. Campos J, Mendelman PM, Saku MU, et al. Detection of relatively penicillin G-resistant *Neisseria meningitidis* by disk susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1478.
111. Cann KJ, Rogers TR. The phenotypic relationship of *Neisseria polysacchara* to commensal and pathogenic *Neisseria* sp. *J Mol Microbiol* 1989;39:351-354.
112. Cannon JG, Black WJ, Nachamkin I, Stewart PW. Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species. *Infect Immun* 1984;43:994-999.
113. Capitini CM, Herrero IA, Patel R, et al. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis* 2002;34:E74-E76.
114. Carballo M, Dillon JR. Evaluation of an enzyme immunoassay and a modified coagglutination assay for typing gonococcal isolates with monoclonal antibodies. *Sex Transm Dis* 1992;19:219-224.
115. Carbonetti NH, Sparling PF. Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9084-9088.

116. Carlson P, Kontiainen S, Anttila P, Eerola E. Septicemia caused by *Neisseria weaveri*. Clin Infect Dis 1997;24:739.
117. Carrick CS, Fyfe JAM, Davies IK. *Neisseria gonorrhoeae* contains multiple copies of a gene that may encode a site-specific recombinase and is associated with DNA rearrangements. Gene 1998;220:21-29.
118. Caner KD, Morgan CM, Otto MH. *Neisseria mucosa* endophthalmitis. Am J Ophthalmol 1987;104:663-664.
119. Canwright KAV. Early management of meningococcal disease. In: Schlad UB, ed.: Infectious Disease Clinics of North America, Vol 13. Bacterial meningitis. Philadelphia: WB Saunders, 1999:661-684.
120. Canwright KAV, Ala'alden DAA. *Neisseria meningitidis*: clinical aspects. J Infect 1997;34:15-19.
121. Canwright KAV, Stuart JM, Robinson PM. Meningococcal carriage in close contacts of cases. Epidemiol Infect 1991;106:133-141.
122. Casellas JM, Gilardoni M, Tome G, et al. Comparative in-vitro activity of levofloxacin against isolates of bacteria from adult patients with community-acquired lower respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother 1999;43(Suppl C):37-42.
123. Catlin BW. Cellular elongation under the influence of antibacterial agents: way to differentiate coccobacilli from cocci. J Clin Microbiol 1975;11:102-105.
124. Catlin BW. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. J Infect Dis 1975;128:178-194.
125. Catlin BW. Branhamaceae fam. nov., a proposed family to accommodate the genera *Branhamella* and *Moraxella*. Int J Syst Bacteriol 1991;41:320-323.
126. Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. APMIS 1998;106:505-525.
127. Caugant DA, Bol P, Hoiby EA, et al. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in the Netherlands, 1958-1986. J Infect Dis 1990;162:867-874.
128. Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. J Clin Microbiol 1994;32:323-330.
129. Caugant DA, Mocca LF, Frach CE, et al. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. J Bacteriol 1987;169:2781-2792.
130. Centers for Disease Control. Chromosomally-mediated resistant *Neisseria gonorrhoeae*—United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1984;33:408-410.
131. Centers for Disease Control. Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae*—Georgia, Pennsylvania, New Hampshire. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1985;34:563-570.
132. Centers for Disease Control and Prevention. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to fluoroquinolones—Ohio and Hawaii, 1992-1994. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994;43:325-327.
133. Centers for Disease Control and Prevention. Serogroup B meningococcal disease—Oregon, 1994. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995;44:121-134.
134. Centers for Disease Control and Prevention. Control and prevention of meningococcal disease and control and prevention of serogroup C meningococcal diseases: evaluation and management of suspected outbreaks. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997;46(RR-5):1-22.
135. Centers for Disease Control and Prevention. Meningococcal disease—New England, 1993-1998. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48:629-633.
136. Centers for Disease Control and Prevention. Meningococcal disease among college students. ACIP modifies recommendations for meningitis vaccination. (Accessed December 1999 at <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/meningococcalcollege.htm>).
137. Centers for Disease Control and Prevention. Serogroup W135 meningococcal disease among travelers returning from Saudi Arabia—United States, 2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49:345-346.
138. Centers for Disease Control and Prevention. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Hawaii, 1999, and decreased susceptibility to azithromycin in N gonorrhoeae Missouri 1999. MMWR Morb Monal Wkly Rep 2000;49:844.
139. Centers for Disease Control and Prevention. Gonococcal Isolate Surveillance Project. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Available at <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/Resist/gisp.html>.
140. Centers for Disease Control and Prevention. 2000 Sexually Transmitted Diseases Surveillance. Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) Supplement. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Available at <http://www.cdc.gov/ncidod/dstd/Stats%20Trends/Stats%20and%20Trends.htm>.
141. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired meningococcal disease—United States, 2000. MMWR Morb Monal Wkly Rep 2002;71:141-144.
142. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. MMWR 2002;51:RR-6.
143. Centers for Disease Control and Prevention. Recall of LC *Neisseria gonorrhoeae* assay and implications for laboratory testing for N. gonorrhoeae and C. rachomatis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:709.
144. Chan EL, Brandt K, Olenius K, et al. Performance characteristics of the Becton Dickinson ProbeTec system for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male and female urine specimens in comparison with the Roche COBAS system. Arch Pathol Lab Med 2000;124:1649-1652.
145. Chapin-Roberston K, Reece EA, Edberg SC. Evaluation of the Gen-Probe PACE 11 assay for the direct detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1992;15:645-649.
146. Chaudhuri AKR, Banatvala, Caugant DA, et al. Phenotypically similar clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing recurrent meningitis in a patient with total C5 deficiency. J Infect 1994;26:236-238.
147. Chen D, Bamiak V, Van Der Meid KR, McMichael JC. The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 and UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis in adults and children. Infect Immun 1999;67:1310-1316.
148. Chen D, McMichael JC, Van Der Meid KR, et al. Evaluation of a 74-kDa transferrin binding protein from *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis as a vaccine candidate. Vaccine 1999;18:109-118.
149. Cher DJ, Maxwell WJ, Frusztajer N, et al. A case of pelvic inflammatory disease associated with *Neisseria meningitidis* bacteremia. Clin Infect Dis 1993;17:134-135.
150. Chong S, Jang D, Song X, et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. J Clin Microbiol 2003;41:778-782.
151. Chtistensen JJ. *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis: clinical, microbiological, and immunological features in lower respiratory tract infections. APMIS 1999;88 (Suppl):1-36.
152. Christensen JJ, Keiding J, Schumacher H, et al. Recognition of a new *Branhamella catarrhalis* β -lactamase—BRO 3. J Antimicrob Chemother 1991;28:774-775.
153. Christian CW, Pinto-Manin JA, McGowan KL. The management of prepubertal children with gonorrhea. Clin Pediatr 1995;34:415-418.
154. Cierns EL, Borenlein LA, Dyer JE, et al. Comparisons of cost and accuracy of DNA probe test and culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in patients attending public health sexually transmitted diseases clinics in Los Angeles County. Sex Transm Dis 1997;24:422-428.
155. Claesson BA, Leionen M. *Moraxella catarrhalis*: an uncommon cause of community-acquired pneumonia in Swedish children. Scand J Infect Dis 1994;26:399-402.
156. Clark VL, Campbell LA, Palermo DA, et al. Induction and repression of outer membrane proteins by anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun 1987;55:1359-1364.
157. Clausen CR, Knapp JS, Toten PA. Lymphadenitis due to *Neisseria cinerea*. Lancet 1984;1:908.
158. Clendenning TE, Echeverria P, Saenguer S, et al. Antibiotic susceptibility survey of *Neisseria gonorrhoeae* in Thailand. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1682-1687.
159. Coe MD, Hamer DH, Levy CS, et al. Gonococcal pericarditis with tamponade in a patient with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1990;33:1118-1141.
160. Connell TD, Black WJ, Kawula TH, et al. Recombination among protein II genes of *Neisseria gonorrhoeae* generates new coding sequences and increase structural variability in the protein II family. Mol Microbiol 1988;2:227-236.
161. Connell TD, Shaffer D, Cannon JG. Characterization of the repertoire of hypervariable regions in the protein II (Opa) gene family of *Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol 1990;4:439-449.
162. Conrads G, Haase G, Schnitzler N, et al. *Neisseria meningitidis* serogroup B peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:341-343.
163. Cook PP, Hecht DW, Snyder DM. Nosocomial *Branhamella catarrhalis* in a paediatric intensive care unit: risk factors for disease. J Hosp Infect 1989;13:299-307.
164. Cooke RP, Williams R, Bannister CM. Shunt-associated ventriculitis caused by *Branhamella catarrhalis*. J Hosp Infect 1990;15:197-198.
165. Cookson ST, Corralle JL, Lolero JO, et al. Disco fever: epidemic meningococcal disease in northeastern Argentina associated with disco patronage. J Infect Dis 1998;178:266-269.
166. Coper ER, Ellison RT, Smith GS, et al. Rifampin-resistant meningococcal disease in a contact patient given prophylactic rifampin. J Pediatr 1985;107:93.
167. Cope LD, LaFontaine ER, Slaughter CA, et al. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* UspA1 and UspA2 genes and their encoded products. J Bacteriol 1999;181:4026-4034.
168. Crawford G, Knapp JS, Hale J. Asymptomatic gonorrhea in men: caused by gonococci with unique nutritional requirements. Science 1977;196:1352-1353.
169. Crotchett KA, Welsh LE, DeBonville D, et al. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay. J Clin Microbiol 1997;35:1536-1540.
170. Cucurull E, Espinoza LR. Gonococcal arthritis. In: Espinoza LR, ed.: Rheumatic Disease Clinic of North America, Vol. 24. Infectious arthritis. Philadelphia: WB Saunders, 1998:305-322.
171. Damany DS, Sherlock DA, Croall J. Primary meningococcal pyoarthrosis of the knee. J Infect 1997;35:320-321.
172. D'Antuono A, Andalo F, Varotti C. Acute urethritis due to *Neisseria meningitidis*. Sex Transm Dis 1999;75:362.
173. Daoud A, Abuckteish F, Masaadeh H. Neonatal meningitis due to *Moraxella catarrhalis* and review of the literature. Ann Trop Paediatr 1996;16:199-201.
174. Darwin LH, Cullen AP, Arthur PM, et al. Comparison of Digene hybrid capture 2 and conventional culture for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. J Clin Microbiol 2002;40:641-644.
175. Davies TA, Kelly LM, Hoelmann DB, et al. Activities and postantibiotic effects of gemifloxacin compared to those of 11 other agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:633-639.
176. Davi CL, Towns M, Henrich WL, et al. *Neisseria mucosa* endocarditis following drug abuse: case report and review of the literature. Arch Intern Med 1983;13:583-385.
177. Dealler SF, Abbott M, Croughan MJ, et al. Identification of *Branhamella catarrhalis* in 2,5 min with an indoxyl butyrate strip test. J Clin Microbiol 1989;27:1390-1391.
178. Dealler SF, Gough KR, Campbell L, et al. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* using the Neistrip rapid enzyme detection tests. J Clin Pathol 1991;44:376-379.

179. Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1020-1023.
180. Demmler GJ, Couch RS, Taber LH. *Neisseria subflava* bacteremia and meningitis in a child: report of a case and review of the literature. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:286.
181. Denning DW, Gill SS. *Neisseria lactamica* meningitis following skull trauma. *Rev Infect Dis* 1991;13:216-218.
182. Derckx B, Witter J, McCloskey R, et al. Randomized, placebo-controlled trial of HA-1A a human monoclonal antibody to endotoxin in children with meningococcal septic shock. *Clin Infect Dis* 1999;28:770-777.
183. Deshpande LM, Jones RN. Antimicrobial activity of advanced-spectrum fluoroquinolones tested against more than 2000 contemporary bacterial isolates of species causing community-acquired respiratory tract infections in the United States (1999). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:139-142.
184. DeVaux DL, Evans GL, Arndt CW, et al. Comparison of the Gono-Pak system with the candle extinction jar for recovery of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1987;25:571-572.
185. DeVries EP, Cole R, Dankert J, et al. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* 1998;7:1203-1212.
186. Dewhirst FE, Paster BJ, Bright BJ, Brighl PL. *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Neisseria*, *Samansella*, and *Vitreoscilla* species comprise a major branch of the β -subgroup of the *Proteobacteria* by 16S ribosomal nucleic acid sequence comparison: transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to the Family *Neisseriaceae* (emend.). *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:258-266.
187. Diemen DJ, Libman MD, Lebel P. Confirmation by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 2002;40:4056-4059.
188. Dillon JR, Carballo M, Pauze M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: *Neisseria*-Kwik, RIM-N, Gonobio Test, Minitex Gonochek II GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI test, and Syva MicroTrak test. *J Clin Microbiol* 1988;26:493-497.
189. Dillon JR, Pauze M, Yeung K-H. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983;1:779-781.
190. DiPersio JR, Jones RN, Barre T, et al. Fluoroquinolone-resistant *Moraxella catarrhalis* in a patient with pneumonia: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:131-135.
191. Division of STD Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 1994. Atlanta: Department of Health and Human Services. Public Health Service 1995.
192. Doern GV. *Branhamella catarrhalis*: phenotypic characteristics. *Am J Med* 1990;88 (Suppl 5A):33S-35S.
193. Doern GV, Blacklow NR, Gantz NM, et al. *Neisseria sicca* osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1982;16:595-597.
194. Doern GV, Gantz NM. Isolation of *Branhamella* (*Neisseria*) *catarrhalis* from men with urethritis. *Sex Transm Dis* 1982;9:202-204.
195. Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, et al. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patient with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada 1997). *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:385-389.
196. Doern GV, Tubert TA. Detection of β -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different β -lactamase assays. *J Clin Microbiol* 1987;25:1380-1383.
197. Doltel J, Bryan L, Janda JM. Evaluation of five rapid systems of the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:265-267.
198. Doltel J, Wong J, Janda JM. Association of *Neisseria cinerea* with ocular infections in paediatric patients. *J Infect* 1998;36:49-52.
199. Domingo P, Coll P, Maroo P, et al. *Neisseria subflava* bacteremia in a neutropenic patient. *Arch Intern Med* 1996;156:1762.
200. Dominguez EA, Smith TL. Endocarditis due to *Neisseria elongata* subspecies nitroreducens: case report and review. *Clin Infect Dis* 1998;26:1471-1473.
201. Dossett JH, Applebaum PC, Knapp JS, et al. Proctitis associated with *Neisseria cinerea* misidentified as *Neisseria gonorrhoeae* in a child. *J Clin Microbiol* 1985;21:575-577.
202. Doyle MB, DeCherney AH, Diamond MP. Epidemiology and etiology of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1991;18:1-17.
203. Du Plessis M. Rapid discrimination between BRO β -lactamases from clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* using restriction endonuclease analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:65-67.
204. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 1993;328:21-28.
205. Edmond MB, Hollis RJ, Houston AK, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of meningococcal disease in a university community. *J Clin Microbiol* 1995;33:2209-2211.
206. Edwards EA, Devine LF, Sellgusbusch CH, et al. Immunological investigations of meningococcal disease. III. Brevity of group C acquisition prior to disease occurrence. *Scand J Infect Dis* 1987;9:105-110.
207. Eisenstein BI, Lee TJ, Sparling PF. Penicillin sensitivity and serum resistance are independent attribute of strains of *Neisseria gonorrhoeae* causing disseminated gonococcal infections. *Infect Immun* 1977;5:834-841.
208. Ejlersten T, Schonheuder HC. *Branhamella catarrhalis* as a cause of multiple subpleural abscess. *Scand J Infect Dis* 1991;23:117-118.
209. Ejlersten T, Thisled E, Edsson F, et al. *Branhamella catarrhalis* in children and adult: a study of prevalence, time of colonisation, and association with upper and lower respiratory tract infection. *J Infect* 1994;29:23-31.
210. Ellis M, Weindling AM, Davidson DC, et al. Neonatal meningococcal conjunctivitis associated with meningococcal meningitis. *Arch Dis Child* 1992;67:1219-1220.
211. Ellison RT III, Curd JG, Kohler PF, et al. Undeclined complement deficiency in patients with disseminated gonococcal infection. *Sex Transm Dis* 1988;4:201-204.
212. Eng J, Holten E. Gelatin neutralization of the inhibitory effect of sodium polyanethanol sulfonate on *Neisseria meningitidis* in blood culture media. *J Clin Microbiol* 1977;6:1-3.
213. Enright MC, McKenzie H. *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*: clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J Med Microbiol* 1997;46:360-371.
214. Erdem G, Schleiss MR. Gonococcal bacteremia in a neonate. *Clin Pediatr* 2000;39:43-44.
215. Erickson L, De Wals P. Complications and sequelae of meningococcal disease in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 1998;26:1159-1164.
216. Facci D, Meyer TF. A novel determinant (comA) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a comA defect on pilin variation. *Mol Microbiol* 1993;10:699-712.
217. Faden H, Harabuchi Y, Hong JJ, et al. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first two years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis* 1994;169:1312-1317.
218. Farhat SE, Thibault M, Devlin R. Efficacy of a swab transport system in maintaining the viability of *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2001;39:2958-2960.
219. Fairley CK, Beggs N, Borrow R, et al. Conjugate meningococcal serogroup A and C vaccine reactogenicity and immunogenicity in United Kingdom infants. *J Infect Dis* 1996;174:1360-1363.
220. Farrell DJ. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cypB nested PCR and 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:386-399.
221. Faur YC, Weisburd MH, Wilson ME, et al. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). *Health Lab Sci* 1973;10:44-54.
222. Feavers IM, Gray SJ, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1999;37:3883-3887.
223. Feliciano R, Swedler W, Varga J. Infection with uncommon subgroup Y *Neisseria meningitidis* in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:737-740.
224. Felmingham D, Grunberg RN, Alexander Project Group. The Alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:191-203.
225. Fenton AC, Foweraker JE, Pearson GA, et al. Bronchopulmonary infection with *Moraxella catarrhalis* in infants requiring extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Pulmonol* 1994;17:393-395.
226. Fernandez-Guerrero ML, Barros C, Rodriguez Tedula JL. Endocarditis due to *Neisseria mucosa* complicated by myocardial abscess. *J Infect* 1989;18:294-295.
227. Figueroa J, Andreoni J, Densen P. Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol Res* 1993;12:295-311.
228. Fijen CAP, Kuijper EJ, Te Bulte MT, et al. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 1999;28:98-105.
229. Fijen CAP, Kuijper EJ, Tjia HG, et al. Complement deficiency predisposes for meningitis due to nongroupable meningococci and *Neisseria*-related bacteria. *Clin Infect Dis* 1994;18:780-78.
230. Filippatos GS, Kartera D, Paramithiotou E, et al. Acute myocardial infarction with normal coronary artery during septic shock from *Neisseria meningitidis*. *Intensive Care Med* 2000;26:252.
231. Finne J, Leinonen M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 1983;2:355.
232. Firiyis N, Sullan Y, Frenk RW, Jr, et al. Azithromycin compared with rifampin for eradication of nasopharyngeal colonization by *Neisseria meningitidis*. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:816.
233. Fischer SH, Rest RF. Gonococci possessing only certain PII outer membrane protein interact with human neutrophils. *Infect Immun* 1988;56:1574-1579.
234. Fitzgerald M, Mulcahy R, Murphy S, et al. A 200 ka protein is associated with haemagglutinating isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;18:209-217.
235. Fleming TJ, Wallsmith DE, Rosenthal RS. Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments: implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. *Infect Immun* 1986;52:600-608.
236. Florez C, Garcia-Lopez JL, Martin-Mazuelos E. Susceptibilities of 55 strains of *Neisseria meningitidis* isolated in Spain in 1993 and 1994. *Chemotherapy* 1997;43:168-170.
237. Fontana D, Pineda V, Pons I, et al. Penicillin-resistant β -lactamase-producing *Neisseria meningitidis* isolated in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:90-91.
238. Fox KK, Del Rio C, Holne KK, et al. Gonorrhea in the HIV era: a reversal trends among men who have sex with men. *Am J Public Health* 2001;91:959-964.
239. Fox KK, Knapp JS. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Opin Urol* 1999;9:65-70.
240. Fox KK, Knapp JS, Holmes KK, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States, 1988-1994: the emergence of decreased susceptibility to the fluoroquinolones. *J Infect Dis* 1997;175:1396-1403.
241. Frasch CE, Zahrdnik JM, Wang LY, et al. Antibody response in adults in an aluminum hydroxide adsorbed *Neisseria meningitidis* serotype 2b protein group B-polysaccharide vaccine. *J Infect Dis* 1988;158:710-718.

242. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Proposed scheme for identification of serotypes of *Neisseria meningitidis*. In: Schoolnik GK, ed. *The Pathogenic Neisseriae*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1985:519-524.
243. Froeschle JE. Meningococcal disease in college students. *Clin Infect Dis* 1999;29:215-216.
244. Fusco PC, Michon F, Tai JY, et al. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates. *J Infect Dis* 1997;175:364-372.
245. Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. *Antimicrob Agent Chemother* 2000;44:1365-1366.
246. Galimand M, Gerbaud G, Guibourdenche M, et al. High level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med* 1998;339:868-874.
247. García Lechuz JM, Alcalá L, Gijón P, et al. Primary meningococcal conjunctivitis in a human immunodeficiency virus infected adult. *Clin Infect Dis* 1998;27:1556-1557.
248. Garrity GM, Holt JG. An overview of the road map in the manual. New York: Bergey's Trust-Springer, 2000.
249. Gaunt PN, Lambert PE. Single-dose ciprofloxacin for the eradication of pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 1988;21:489-496.
250. Gaydos CA, Quinn TC, Willis D, et al. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:304-309.
251. Geisler WM, Markovitz DM. Septic arthritis caused by *Neisseria sicca*. *J Rheumatol* 1998;25:826-828.
252. Gelfand MS, Cleveland KO, Campayn C, Zolyomi A. Meningococcal cellulitis and sialadenitis. *South Med J* 1998;91:287-288.
253. George MJ, DeBin JA, Preon KE, et al. Recurrent bacterial peritonitis caused by *Neisseria cinerea* in a chronic ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;26:91-93.
254. Germer JJ, Washington JA. Evaluation of a rapid identification method for *Neisseria* spp. *J Clin Microbiol* 1985;21:987-988.
255. Gilbert M, Wwatson DC, Cunningham AM, et al. Cloning of the lipooligosaccharide α -2,3 sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* 1996;271:28271-28276.
256. Gilja OH, Halstensen A, Digraanes A, et al. Use of single-dose ofloxacin to eradicate tonsillopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2024-2026.
257. Gill MJ. Serotyping *Neisseria gonorrhoeae*: a report of the fourth international workshop. *Genitourin Med* 1991;67:53-57.
258. Gilrane T, Tracy JD, Greenlee RM, et al. *Neisseria sica* pneumonia: report of two cases and review of the literature. *Am J Med* 1985;78:1038-1040.
259. Ghi GA. Ocular infection in a newborn caused by *Neisseria mucosa*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1574-1575.
260. Girior BP, Quint PA, Barton PA, et al. Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. *Lancet* 1997;350:1439-1443.
261. Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* 1978;137:112-121.
262. Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Gotschlich ECL. Immune response of human infant to polysaccharide vaccines of group A and group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1977;136(Suppl):S31-S35.
263. Goldani LZ. Inducement of *Neisseria meningitidis* resistance to ampicillin and penicillin in a patient with meningococcemia treated with high doses of ampicillin. *Clin Infect Dis* 1998;26:772.
264. Gorwitz RJ, Nakahima AK, Moran J, et al. Sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*—United States, 1988-1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42(Suppl):29-39.
265. Gotschlich EC, Seiff M, Blake MS. The DNA sequence of the structural gene of gonococcal protein III and the flanking region containing a repetitive sequence: homology of protein III with enterobacterial OmpA proteins. *J Exp Med* 1987;165:471-481.
266. Granato PA, Howard R, Wilkinon B, et al. Meningitis caused by multise-negative variant of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1980;11:270-271.
267. Gransden WR, Warren C, Phillips I. 4-Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom. *J Med Microbiol* 1991;34:23-27.
268. Grant PE, Brenner DJ, Steigerwalt AG, et al. *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* subsp. nov., formerly CDC group M-6, a gram-negative bacterium associated with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2591-2596.
269. Gray LD, Van Scoy RE, Anhalt JP, et al. Wound infection caused by *Branhamella catarrhalis*. *J Clin Microbiol* 1989;27:818-820.
270. Gray SJ, Sobanski MA, Kaczmarek EB, et al. Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR a complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 1999;37:1797-1801.
271. Gregg CR, Melly MA, Helliguist CG, et al. Toxic activity of purified lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* for human Fallopian tube mucosa. *J Infect Dis* 1985;43:432-434.
272. Griffiths JM, Schneider H, Mandrell RE, et al. Lipooligosaccharide: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev Infect Dis* 1988;10:S87-S95.
273. Gris P, Vincke G, Delmeze JP, et al. *Neisseria sicca* pneumonia and bronchiectasis. *Eur Respir J* 1989;2:685-687.
274. Gu XX, Chell J, Barenkamp SJ, et al. Synthesis and characterization of lipooligosaccharide-based conjugates as vaccine candidate for *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Infect Immun* 1998;66:1891-1897.
275. Guibourdenche M, Cautant DA, Herve V, et al. Characteristics of serogroup A *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Central African Republic in February. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:174-177.
276. Guibourdenche M, Darchis J-P, Boisvion A, et al. Enzyme electrophoresis, sero- and subtyping, and outer membrane protein characterization of two *Neisseria meningitidis* strains involved in laboratory acquired infections. *J Clin Microbiol* 1994;170:1-704.
277. Guibourdenche M, Giorgini D, Gueye A, et al. Genetic analysis of a meningococcal population based on polymorphism of the pilA-pilB locus: a molecular approach for meningococcal epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:745-750.
278. Guibourdenche M, Hoiby EA, Riou JY, et al. Epidemics of serogroup A *Neisseria meningitidis* of subgroup III in Africa, 1989-1994. *Epidemiol Infect* 1996;116:115-120.
279. Guibourdenche M, Lambert T, Riou JY. Isolation of *Neisseria canis* in mixed culture from a patient after a cat bite. *J Clin Microbiol* 1989;27:1673-1674.
280. Hale YM, Melton ME, Lewi JS, et al. Evaluation of the PACE 2 *Neisseria gonorrhoeae* assay by three public health laboratories. *J Clin Microbiol* 1993;31:451-453.
281. Halla JT. Septic olecranon bursitis caused by *Neisseria sicca*. *J Rheumatol* 1990;17:1240-1241.
282. Hammerschmidt S, Hilde R, Van Putten JP, et al. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* 1996;15:192-198.
283. Hammerschmidt S, Muller A, Sillman H, et al. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped strand mispairing in the polysialyltransferase gene (staD) correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 1996;20:1211-1220.
284. Handsfield HH, Dalu ZA, Martin DH, et al. Multicenter trial of single-dose azithromycin vs. ceftriaxone in the treatment of uncomplicated gonorrhea. *Sex Transm Dis* 1994;21:107-111.
285. Hanks JW, Scott CT, Butler CE, et al. Evaluation of a DNA probe assay (Gen-Probe PACE 2) as the test of cure for *Neisseria gonorrhoeae* genital infection. *J Pediatr* 1994;125:161-162.
286. Hanna LS, Girgis NI, Farid Z, et al. Transient cataracts in a young child with meningococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:802-803.
287. Harrison LH. Preventing meningococcal infection in college students. *Clin Infect Dis* 2000;30:648-651.
288. Harrison LH, Dwyer DM, Maples CT, Billman L. The risk of meningococcal infection in college students. *JAMA* 1999;281:1906-1910.
289. Hauck CR, Meyer TF. "Small talk": Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host cell communication. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:43-49.
290. Hauri AM, Ehrhard I, Frank U, et al. Serogroup C meningococcal disease outbreak associated with discotheque attendance during carnival. *Epidemiol Infect* 2000;124:69-73.
291. Hay PE, Murphy SM, Chinn RJS. Acute urethritis due to *Neisseria meningitidis* group A acquired by oro-genital contact: case report. *Genitourin Med* 1989;65:285-286.
292. Heckels JE. Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):S66-S73.
293. Heiddal S, Sverrisson JT, Yngvason FE, et al. Native valve endocarditis due to *Neisseria sicca*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:667-670.
294. Hodge DS, Ashton FE, Terro R, et al. Organism resembling *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1546-1547.
295. Hofstad T, Hope O, Falsen E. Septicemia with *Neisseria elongata* ssp. *nitroreducens* in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Scand J Infect Dis* 1998;30:200-201.
296. Hol C, Van Dijke EEM, Verduin CM, et al. Experimental evidence for *Moraxella*-induced penicillin neutralization in pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1994;170:1613-1616.
297. Hollis DG, Wiggins GL, Weaver RE. *Neisseria lactamica* sp. nov., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl Microbiol* 1969;17:71-77.
298. Hollis DG, Wiggins WL, Weaver RE. An unclassified gram-negative rod isolated from the pharynx on Thayer-Martin medium (selective agar). *Appl Microbiol* 1972;24:772-777.
299. Holmes B, Costa M, On SLW, et al. *Neisseria weaveri* sp. nov. (formerly CDC group M-5), from dog bite wound of humans. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:687-693.
300. Holmes KK, Johnson DW, Trostle JH. An estimate of the risk of men acquiring gonorrhea by sexual contact with infected females. *Am J Epidemiol* 1970;91:170-174.
301. Hook EW, Brady WE, Reichart CA, et al. Determinants of emergence of antibiotic-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1989;159:900-907.
302. Hook EW, Chiny SF, Sephens J, et al. Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infections in women by using the ligase chain reaction on patient-obtained vaginal swabs. *J Clin Microbiol* 1997;35:2129-2132.
303. Hook EW III, Handsfield HH. Gonococcal infections in the adult. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparring PF, et al., eds.: *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd Ed. New York: McGraw Hill, 1999:451-466.
304. Hornyk G, Piatt JH Jr. Cerebrospinal fluid shunt infection by *Neisseria sica*. *Pediatr Neurosurg* 1994;21:189-191.
305. Hughes J, Biedenbach DJ, Erwin ME, et al. E test as susceptibility test and epidemiologic tool for evaluation of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol* 1993;31:3255-3259.
306. Hughes J, Goldsmith C, Shields MD, et al. Primary meningococcal pericarditis with tamponade in an infant. *J Infect* 1994;29:339-341.
307. Husain Z, Lannigan R, Autin TW. Pulmonary cavitation due to *Neisseria mucosa* in a child with chronic neutropenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:175-176.
308. Ikeda F, Yokota Y, Mine Y, et al. Characterization of BRO enzymes and β -lactamase transfer of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* isolated in Japan. *Chemotherapy* 1993;39:88-95.

309. Ikram RB, Nixon M, Aitken J, et al. A prospective study of isolation of *Moraxella catarrhalis* in a hospital during the winter months. *J Hosp Infect* 1993;25:7-14.
310. Imrey PB, Jackson LA, Ludwinski PH, et al. Meningococcal carriage, alcohol consumption, and campus bar patronage in a serogroup C meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1995;33:3133-3137.
311. Imrey PB, Jackson LA, Ludwinski PH, et al. Outbreak of serogroup C meningococcal disease associated with campus bar patronage. *Am J Epidemiol* 1996;143:624-630.
312. Ioannidis JPA, Worthington M, Griffiths JK, et al. Spectrum and significance of bacteremia due to *Moraxella catarrhalis*. *Clin Infect Dis* 1995;21:390-397.
313. Jackson LA, Schuchal A, Reeves MW, et al. Serogroup C meningococcal out-breaks in the United States: an emerging threat. *JAMA* 1995;273:383-389.
314. Jackson LA, Tenover FC, Baker C, et al. Prevalence of *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in the United States, 1991. *J Infect Dis* 1994;169:438-441.
315. Jackson LA, Wenger JD. Laboratory-based surveillance for meningococcal disease in selected areas. United States, 1989-1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;42:21-30.
316. Jacoby HM, Mady BJ. Acute gonococcal sepsis in an HIV-infected woman. *Sex Transm Dis* 1995;22:380-382.
317. Janda WM, Bohnhoff M, Morello JA, Lerner SA. Prevalence and site-pathogen studies of *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae* in homosexual men. *JAMA* 1980;244:2060-2064.
318. Janda WM, Bradna JJ, Ruther P. Identification of *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., and other fastidious gram-negative bacteria with the MicroScan *Haemophilus-Neisseria* identification panel. *J Clin Microbiol* 1989;27:869-873.
319. Janda WM, Malloy PJ, Schreckenberger PC. Clinical evaluation of the Vitek *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol* 1987;25:37-41.
320. Janda WM, Montero M, Wilcoski LM. Evaluation of the BactiCand *Neisseria* for identification of pathogenic *Neisseria* species and *Moraxella catarrhalis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:875-879.
321. Janda WM, Sensung C, Todd KM, et al. Asymptomatic *Neisseria subflava* biovar. *perflava* bacteriuria in a child with obstructive uropathy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:540-542.
322. Janda WM, Ulanday MG, Bohnhoff M, et al. Evaluation of the RIM-N, Gonochek 11, and Phadebact systems for the identification of pathogenic *Neisseria* spp. and *Branhamella catarrhalis*. *J Clin Microbiol* 1985;21:734-737.
323. Janda WM, Wilcoski LM, Mandel KL, et al. Comparison of monoclonal anti-body-based methods and a ribosomal ribonucleic acid probe test for *Neisseria gonorrhoeae* culture confirmation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:177-184.
324. Jennings HJ, Gamian A, Ashton FE. N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group B *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 1987;165:1207-1211.
325. Jennings HJ, Lugowski C. Immunochemistry of group A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Immunol* 1981;127:1011-1018.
326. Jerse AE, Cohen MS, Drown PM, et al. Multiple gonococcal opacity proteins are expressed during experimental urethral infection in the male. *J Exp Med* 1994;179:911-920.
327. Johnson DH, Febre E, Schoch PE, et al. *Neisseria cinerea* bacteremia in a patient receiving hemodialysis. *Clin Infect Dis* 1994;19:990-991.
328. Jones DM, Borrow R, Fox AJ, et al. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1992;13:219-224.
329. Jones RN, Gavan TL, Thornsberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin and tetracycline. *J Clin Microbiol* 1989;27:2758-2766.
330. Jonsson AB, Nyberg G, Normark S. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* 1991;10:477-488.
331. Jonsson I, Holme T, Krook A. Significance of isolation of *Moraxella catarrhalis* in routine cultures from the respiratory tract in adults: antibody response studied in a whole cell EIA. *Scand J Infect Dis* 1994;26:553-558.
332. Jousimies-Somer HR, Savolainen S, Ylikoski JS. Comparison of the nasal bacterial floras in two groups of healthy subjects and in patients with acute maxillary sinusitis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2836-2743.
333. Jungkind D, DiRenzo S, Beavis KG, Silverman NS. Evaluation of automated COBAS AMPLICOR PCR system for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management. *J Clin Microbiol* 1996;34:2778-2783.
334. Juni E, Heym GA. *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:366-391.
335. Kaczmarek EB, Ragunathan PL, Marsh J, et al. Creating a national service for the diagnosis of meningococcal disease by polymerase chain reaction. *Commun Dis Public Health* 1998;1:54-56.
336. Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1997;25:639-647.
337. Kam KM, Lo KK, Chong LY, et al. Correlation between in vitro quinolone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* and outcome of treatment of gonococcal urethritis with single-dose ofloxacin. *Clin Infect Dis* 1999;28:1165-1166.
338. Kam KM, Wong PW, Cheung MM, Ho NKY. Detection of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1462-1464.
339. Kamme C, Vang M, Stahl M. Intragenetic and intergenetic transfer of *Branhamella catarrhalis* β -lactamase production. *Scand J Infect Dis* 1984;16:153-155.
340. Kaplan SL. Clinical presentations, diagnosis, and prognostic factors of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed.: *Infectious Disease Clinics of North America*. Vol. 13. Bacterial meningitis. Philadelphia: WB Saunders, 1999;579-594.
341. Karaius R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* 2000;2:547-559.
342. Karlowsky JA, Jones ME, Mayfield DC, et al. Ceftriaxone activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens isolated in U.S. clinical microbiology laboratories from 1996 to 2000: results from the Surveillance Network (TSN) database—USA. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:413-426.
343. Kawula TH, Spinola SM, Klapper DG, Cannon JG. Localization of a conserved epitope and azurin-like domain in the H.8 protein of pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1987;1:179-185.
344. Kayhty H, Karenko V, Peltola H, et al. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A *Neisseria meningitidis* followed for three year in infants and children. *J Infect Dis* 1980;142:861-868.
345. Kellogg DS, Peacock WL, Deacon WE, et al. *Neisseria gonorrhoeae*. I. Virulence genetically linked to clonal variation. *J Bacteriol* 1963;94:1274-1279.
346. Kellogg JA, Orwig LK. Comparison of GonoGen, GonoGen II, and MicroTrak direct fluorescent antibody test with carbohydrate fermentation for confirmation of culture isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:474-476.
347. Kertesz DA, Byrne SK, Chow AW. Characterization of *Neisseria meningitidis* by polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion of the porA gene. *J Clin Microbiol* 1993;31:2594-2598.
348. Keys TF, Hecht RH, Chow AW. Endocervical *Neisseria meningitidis* with meningococemia. *N Engl J Med* 1971;285:505-506.
349. Kirchgessner V, Plesia P, DuPont MJ, et al. Meningitis and septicemia due to *Neisseria cinerea*. *Clin Infect Dis* 1995;21:1351.
350. Kleris GS, Arnold AJ. Differential diagnosis of urethritis: predictive value and therapeutic implications of the urethral smear. *Sex Transm Dis* 1981;8:810-816.
351. Klingman KL, Pye A, Murphy TF, Hill SL. Dynamics of respiratory tract colonization by *Branhamella catarrhalis* in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1072-1078.
352. Knapp JS. Reduction of nitrite by *Neisseria gonorrhoeae*. In *J Syst Bacteriol* 1984;34:376-377.
353. Knapp JS, Clark VI. Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. *Infect Immun* 1984;46:176-181.
354. Knapp JS, Fox KK, Trees DL, Whittington WL. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Emerg Infect Dis* 1997;3:33-39.
355. Knapp JS, Hale JA, Wintersheid K, et al. Proposed criteria for the interpretation of susceptibilities of strains of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin, ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2442-2445.
356. Knapp JS, Holmes KK. Disseminated gonococcal infections caused by *Neisseria gonorrhoeae* strains with unique nutritional requirements. *J Infect Dis* 1975;132:204-208.
357. Knapp JS, Hook EW. Prevalence and persistence of *Neisseria cinerea* and other *Neisseria* spp. in adults. *J Clin Microbiol* 1988;26:896-900.
358. Knapp JS, Johnson SR, Zenilman JM, et al. High-level tetracycline resistance resulting from TetM in strains of *Neisseria* spp., *Kingella denitrificans* and *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:765-767.
359. Knapp JS, Ohye R, Neal SW, et al. Emerging in vitro resistance to quinolones in penicillinae-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hawaii. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2200-2203.
360. Knapp JS, Tam MR, Nowinski RC, et al. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I. *J Infect Dis* 1984;150:44-48.
361. Knapp JS, Totten PA, Mulks MH, et al. Characterization of *Neisseria cinerea* a non-pathogenic species isolated on Manin-Lewis medium selective for pathogenic *Neisseria* spp. *J Clin Microbiol* 1984;19:63-67.
362. Knapp JS, Washington JA, Doyle LJ, et al. Persistence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibilities to ciprofloxacin and ofloxacin in Cleveland, Ohio, from 1992 through 1993. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2194-2196.
363. Knapp JS, Wongba C, Limpakarnjanarat K, et al. Antimicrobial susceptibilities of strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Bangkok, Thailand: 1994-1995. *Sex Transm Dis* 1997;24:142-148.
364. Knapp JS, Zenilman JM, Biddle JW, et al. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. *J Infect Dis* 1987;155:819-822.
365. Koppes GM, Ellenbogen C, Gebbart RJ. Group Y meningococcal disease in United States Air Force recruits. *Am J Med* 1977;62:661-666.
366. Kornelisse RF, Hazelzet JA, Hop WCJ, et al. Meningococcal septic shock in children: clinical and laboratory features, outcome, and development of a prognostic score. *Clin Infect Dis* 1997;35:640-646.
367. Korppi M, Katila ML, Jaaskelainen J, et al. Role of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* as a respiratory pathogen in children. *Acta Paediatr* 1992;81:993-996.
368. Koumans EH, Johnson RE, Knapp JS, St. Louis ME. Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture tests: a performance review with clinical and public health considerations. *Clin Infect Dis* 1998;27:1171-1180.
369. Knstiansen B-E, Fermer C, Jenkins A, et al. PCR amplicon restriction endonuclease analysis of the chromosomal dhps gene of *Neisseria meningitidis*: a method for studying spread of the disease-causing strain in contacts of patients with meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:1174-1179.
370. Kupsch E-M, Knepper B, Kuroki T, et al. Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J* 1993;12:641-650.
371. Kunynski TA, Kimball IL, Polyak MB. Evaluation of the Phadebact and Bactigen reagents for detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1985;21:989-990.

372. Lafferty W, Hughes JP, Handfield HH. Sexually transmitted diseases among men who have sex with men: acquisition of gonorrhea and non-gonococcal urethritis by fellatio and implications for STD/HIV prevention. *Sex Transm Dis* 1997;24:272-278.
373. LaFontaine ER, Cope LD, Aebi C, et al. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* 2000;182:1364-1373.
374. Lairscey RC, Kelly MT. Evaluation of a one-hour test for identification of *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 1985;22:238-240.
375. Lansa N, Picard FJ, Menard C, et al. Novel genus-specific PCR-based assays for rapid identification of *Neisseria* species and *Neisseria meningitidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:443-451.
376. Lauer BA, Fisher E. *Neisseria lactamica* meningitis. *Am J Dis Child* 1976;130:198-199.
377. Lauer BA, Masters HB. Toxic effect of calcium alginate swabs on *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:54-56.
378. Laughon BE, Ehret JM, Tanino TT, et al. Fluorescent monoclonal antibody for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* cultures. *J Clin Microbiol* 1987;25:2388-2390.
379. Lawton WD, Battaglioli GJ. GonoGen coagglutination test for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1983;18:1264-1265.
380. Leach A, Twumasi PA, Kumah S, et al. Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1997;175:200-204.
381. Lee AH, Chin AE, Ramanujam T, et al. Gonococcal septic arthritis of the hip. *J Rheumatol* 1991;18:1932-1933.
382. Lee BC, Hill P. Identification of an outer-membrane haemoglobin binding protein in *Neisseria meningitidis*. *J Gen Microbiol* 1992;138:2647-2656.
383. Leggiadro RJ, Lazar LF. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Neisseria meningitidis* serogroup Z in an infant with liver failure. *Clin Pediatr* 1991;30:350-352.
384. Lepow ML, Beeler J, Randolph M, et al. Reactogenicity and immunogenicity of a quadrivalent combined meningococcal polysaccharide vaccine in children. *J Infect Dis* 1986;154:1033-1036.
385. Lewis JS, Fakile O, Foss E, et al. Direct DNA probe assay for *Neisseria gonorrhoeae* in pharyngeal and rectal specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:2783-2785.
386. Lewis JS, Kranig-Brown D, Trainor DA. DNA probe confirmatory test for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2349-2350.
387. Lewis LA, Gipson M, Hanman K, et al. Rhase variation of HpuAB and HmbR, two distinct hemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Mol Microbiol* 1999;32:977-989.
388. Leis LA, Gray E, Wang YP, et al. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 1997;23:737-749.
389. Lewis LS, Glauser TA, Joffe MD. Gonococcal conjunctivitis in prepubertal children. *Am J Dis Child* 1990;144:546-548.
390. Li Z, Yokoi S, Kawamura Y, et al. Rapid detection of quinolone resistance-associated gyrA mutations in *Neisseria gonorrhoeae* with a LightCycler. *J Infect Chemother* 2002;8:145-150.
391. Lieberman JM, Chiu SS, Wong VK, et al. Safety and immunogenicity of a serogroups A/C *Neisseria meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in young children. A randomized controlled trial. *JAMA* 1996;275:1499-1503.
392. Liebling MR, Arkfeld DG, Michelini GA, et al. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in synovial fluid using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 1994;37:702-709.
393. Lim YT, Lim MC, Choo MH, Gamini K. Severe aortic regurgitation due to *Neisseria mucosa* endocarditis. *Singapore Med J* 1994;35:650-652.
394. Limberger RJ, Biega R, Evancoe A, et al. Evaluation of culture and the GenProbe PACE 2 assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamidia trachomatis* in endocervical specimens transported to a state health laboratory. *J Clin Microbiol* 1992;30:1162-1166.
395. Linquist PR, Linquist JA. *Neisseria mucosa* bursitis: a rare case of gas in soft tissue. *Clin Orthop* 1988;231:222-224.
396. Lipman RM, Deutsch TA. Late-onset *Moraxella catarrhalis* endophthalmitis after filtering surgery. *Can J Ophthalmol* 1992;27:249-250.
397. Little MC, Andrews J, Moore R, et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated into a second-generation DNA probe system. *BD DNA ProbeTec ET*. *Clin Chem* 2000;45:777-784.
398. Littman H, Iazebnik R, Hall GS, et al. Isolation of *Neisseria gonorrhoeae*: directly plated cultures versus transport cultures. *Clin Pediatr* 1996;35:329-330.
399. Livengood CH III, Wrenn JW. Evaluation of COBAS AMPLICOR (Roche): accuracy in detecting *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:2928-2932.
400. Lopez-Velez R, Fonun J, de Pablo C, et al. Native valve endocarditis due to *Neisseria sicca*. *Clin Infect Dis* 1994;18:660-661.
401. Lossick JG, Smeltzer MP, Curran JW. The value of the cervical Gram stain in the diagnosis of gonorrhea in women in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis* 1982;9:124-127.
402. Louie M, Oongsansoy EG, Forward KR. Rapid identification of *Branhamella catarrhalis*: a comparison of five rapid methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:205-208.
403. Louv WC, Austin H, Alexander WJ, et al. A clinical trial of monoxynol-9 for preventing gonococcal and chlamydial infections. *J Infect Dis* 1988;158:518-523.
404. Louv WC, Austin H, Perlman J, Alexander WJ. Oral contraceptive use and the risk of chlamydial and gonococcal infections. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:396-402.
405. Lujan R, Zhang Q-Y, Saez-Nieto JA, et al. Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:301-304.
406. MacArthur RD. *Branhamella catarrhalis* peritonitis in two continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Pent Dial Int* 1990;11:185.
407. Macia M, Vega N, Elcuaz R, et al. *Neisseria mucosa* peritonitis in CAPD: another case of "non-pathogenic" neisseriae infection. *Pent Dial Int* 1993;13:72-73.
408. MacLennan JM, Shackley F, Heath PT, et al. Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in infants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000;283:2795-2801.
409. Malhotra A, Krilov LR. Isolated *Neisseria meningitidis* endophthalmitis. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:839-840.
410. Malhotra R, Karim QN, Acheon JF. Hospital-acquired adult gonococcal conjunctivitis. *J Infect* 1998;37:305-312.
411. Mandrell RE, Griffiss JM, Macher BA. Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunologically similar to precursors of human blood group antigens: carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. *J Exp Med* 1988;168:107-126.
412. Mandrell RE, Zollinger WD. Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition. *Infect Immun* 1977;16:471-475.
413. Manfredi R, Nanetti A, Valenini R, Chiodo F. *Moraxella catarrhalis* pneumonia during HIV disease. *J Chemother* 2000;12:400-411.
414. Marchant CD. Spectrum of disease due to *Branhamella catarrhalis* in children with particular reference to acute otitis media. *Am J Med* 1990;88(Suppl 5A):155-159.
415. Marrs CF, Weir S. Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am J Med* 1990;88(Suppl 5A):36S-40S.
416. Martin DH, Cammarata C, Van der Pol B, et al. Multicenter study of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3544-3549.
417. Martin JE, Jackson RL. A biological environmental chamber for the culture of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Am Vener Dis Assoc* 1975;2:28-30.
418. Martinez G, Ahmed K, Zheng CH, et al. DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis in *Moraxella catarrhalis* isolated from different geographical areas. *Epidemiol Infect* 1999;122:417-422.
419. Maskell JP, Whitley AC, Sefton AM. In vitro activity of gatifloxacin against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:293-299.
420. Maslanka SE, Tappero JW, Plikaytis BD, et al. Age-dependent *Neisseria meningitidis* serogroup C class-specific antibody concentrations and bactericidal titers in sera from young children from Montana immunized with a licensed polysaccharide vaccine. *Infect Immun* 1998;66:2453-2459.
421. Mastrantonio P, Congiu ME, Selander RK, et al. Genetic relationships among strains of *Neisseria meningitidis* causing disease in Italy, 1984-1987. *Epidemiol Infect* 1991;106:143-150.
422. Mastrolonardo M, Loconsole F, Conte A, et al. Cutaneous vasculitis as the sole manifestation of disseminated gonococcal infection: case report. *Genitorin Med* 1994;70:130-131.
423. Mathers K, Leinonen M, Goldblatt D. Antibody response to outer membrane proteins of *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:982-988.
424. Mattila PS, Carlson P. Pharyngolaryngitis caused by *Neisseria meningitidis*. *Scand J Infect Dis* 1998;30:198-200.
425. Mayatepek E, Grauer M, Hansch GM, et al. Deafness, complement deficiencies and immunoglobulin status in patients with meningococcal disease due to uncommon serogroups. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:808-811.
426. Mazloum H, Totten PA, Brooks GF, et al. An unusual *Neisseria* isolated from conjunctival cultures in rural Egypt. *J Infect Dis* 1986;154:212-224.
427. McGee L, Koornhof HJ, Caugant DA. Epidemic spread of subgroup III of *Neisseria meningitidis* serogroup A to South Africa in 1996. *Clin Infect Dis* 1998;27:1214-1220.
428. McGregor K, Chang BJ, Mee BJ, Riley TV. *Moraxella catarrhalis*: clinical significance, antimicrobial susceptibility, and BRO β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:219-234.
429. McKenzie H, Morgan MG, Jordens JZ, et al. Characterization of hospital isolates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* by SDS-PAGE of whole cell proteins, immunoblotting and restriction endonuclease analysis. *J Med Microbiol* 1992;37:70-76.
430. McMichael JC. Progress toward the development of a vaccine to prevent *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* infections. *Microbes Infect* 2000;2:561-568.
431. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 2001;19:S101-S107.
432. McMichael JC, Fike MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* 1998;66:4374-4381.
433. Mehrany K, Kist JM, O'Connor WJ, DiCauda DJ. Disseminated gonococcalemia. *Int J Dermatol* 2003;42:208-209.
434. Melendez PR, Johnson RH. Bacteremia and septic arthritis caused by *Moraxella catarrhalis*. *Rev Infect Dis* 1991;13:428-429.
435. Mendelman PM, Campos J, Chaffin DO, et al. Relative penicillin G resistance in *Neisseria meningitidis* and reduced affinity of penicillin-binding protein 2. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:706-709.
436. Meningococcal Disease Surveillance Group. Analysis of endemic meningococcal disease by serogroup and evaluation of chemoprophylaxis. *J Infect Dis* 1976;134:201-204.
437. Meuleman P, Erard K, Herregods MC, et al. Bioprosthetic valve endocarditis caused by *Neisseria elongata* subspecies nitroreducens. *Infection* 1996;24:258-260.
438. Meyer GA, Shope TR, Waecker NJ Jr, Lanningham BH. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* bacteremia in children. *Clin Pediatr* 1995;34:146-150.

439. Meyer TF. Pathogenic neisseriae: complexity of pathogen-host cell interplay. *Clin Infect Dis* 1999;28:433-441.
440. Meyer TF, Van Putten JPM. Genetic mechanisms and biological implications of phase variation in pathogenic neisseriae. *Clin Micro Rev* 1989;2(Suppl): S139-S145.
441. Mietzner TA, Bolan G, Schoolnik GK, Morse SA. Purification and characterization of the major iron-regulated protein expressed by pathogenic *Neisseria*. *J Exp Med* 1987;165:1041-1057.
442. Mietzner TA, Laginbuhl GH, Sandstrom E, Morse SA. Identification of an iron-regulated 37,000-dalton protein in the cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1984;45:410-416.
443. Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup b outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun* 1994;62:4419-4424.
444. Mlshew BH, Beardsley JL, Knapp JS. Evaluation of GenoGen coagglutination test for serodiagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: identification of problem isolates by auxotyping, serotyping, and with a fluorescent antibody reagent. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1985;3:41-46.
445. Modarress KJ, Cullen AP, Jaffurs WJS, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in swab specimen by the Hybrid Capture II and PACE 2 nucleic acid probe tests. *Sex Transm Dis* 1999;26:303-308.
446. Molling P, Jacobsson S, Backman A, Olcen P. Direct and rapid identification and genotyping of meningococci and porA amplification by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4531-4535.
447. Montgomery K, Raymundo L, Drew WL. Chromogenic cephalosporin spot test to detect β -lactamase in clinically significant bacteria. *J Clin Microbiol* 1979;9:205-207.
448. Moon T, Lin RY, Jahn AF. Fatal frontal sinusitis due to *Neisseria sicca* and *Eubacterium lentum*. *J Otolaryngol* 1986;15:193-195.
449. Moore PS. Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. *Clin Infect Dis* 1992;14:515-525.
450. Moore PS, Hierholzer J, DeWitt W, et al. Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis. *JAMA* 1990;264:1271-1275.
451. Moore PS, Reeves MW, Schwartz B, et al. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet* 1989;2:260-263.
452. Moraes IC, Perkins BA, Camargo MCC, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brasil. *Lancet* 1992;340:1074-1078.
453. Morello JA, Lerner SA, Bohnhoff M. Characteristics of atypical *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and localized infections. *Infect Immun* 1976;13:1510-1516.
454. Morgan MG, McKenzie H, Enright MC, et al. Use of molecular methods to characterize *Moraxella catarrhalis* strains in a suspected outbreak of nosocomial infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:305-312.
455. Morla N, Guibourdenche M, Riou J-Y. *Neisseria* spp. and AIDS. *J Clin Microbiol* 1992;30:2290-2294.
456. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, et al. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is a result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:664-670.
457. Mulks MH, Plaut AG. IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless *Neisseriaceae*. *N Engl J Med* 1978;299:973-976.
458. Muller A, Gunther D, Du F, et al. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO* 1999;18:339-352.
459. Muralidhar B, Rumore PM, Steinman CR. Use of the polymerase chain reaction to study arthritis due to *Neisseria gonorrhoeae*. *Arthritis Rheum* 1994;37:710-717.
460. Murphy S, Fitzgerald M, Mulcahy R, et al. Studies on haemagglutination and serum resistance status of strains of *Moraxella catarrhalis* isolated from the elderly. *Gerontology* 1997;43:277-282.
461. Murphy TF. *Branhamella catarrhalis*: epidemiological and clinical aspects of a human respiratory tract pathogen. *Thora* 1998;53:124-128.
462. Murphy TF, Kirkham C, Lesse AJ. The major heat-modifiable outer membrane protein CD is highly conserved among strains of *Moraxella catarrhalis*. *Mol Microbiol* 1993;10:87-97.
463. Murphy TF, Kyd JM, John A, et al. Enhancement of pulmonary clearance of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* following immunization with outer membrane protein CD in a mouse model. *J Infect Dis* 1998;178:1667-1675.
464. Myers LE, Yang YP, Du RP, et al. The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine antigen. *Infect Immun* 1998;66:4183-4192.
465. Naqvi SH, Kilpatrick B, Bouhasin J. *Branhamella catarrhalis* meningitis following otolaryngologic surgery. *APMIS Suppl* 1988;3:74-75.
466. Nasit X, Beretti IL, Lowy J, et al. Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3769-3773.
467. Nassif X, Lowy J, Stenberg P, et al. Antigenic variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1993;8:719-725.
468. Nassif X, So M. Interaction of pathogenic *Neisseria* with nonphagocytic cells. *Clin Micro Rev* 1995;8:376-388.
469. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement. Wayne PA: author, 2002. NCCLS document M100-S12.
470. Nawaa T, Hardy DJ, Bonnez W. *Neisseria elongata* subsp. *elongata*: a case of human endocarditis complicated by pseudoaneurysm. *J Clin Microbiol* 1996;34:756-758.
471. Neal KR, Nguyen-van-Tam IS, Slack RCB, et al. Seven-week interval between acquisition of a meningococcus and the onset of invasive disease: a case report. *Epidemiol Infect* 1999;123:507-509.
472. Nelson K, Watkins DA, Watanakunakorn C. Acute epiglottitis due to serogroup Y *Neisseria meningitidis* in an adult. *Clin Infect Dis* 1996;23:1192-1193.
473. Neu AM, Case B, Lederman HM, et al. *Neisseria sicca* peritonitis in a patient maintained on chronic peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1994;8:601-602.
474. Neubert AG, Schwart PA. *Neisseria meningitidis* sepsis as a complication of labor. *J Reprod Med* 1994;39:749-751.
475. Neumayer U, Schmidt HK, Mellwig KP, Kleinkamp G. *Moraxella catarrhalis* endocarditis: report of a case and literature review. *J Heart Valve Dis* 1999;8:114-117.
476. Ng L-K, Carballo M, Dillon JR. Differentiation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates requiring proline, citrulline, and uracil by plasmid content, serotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1039-1041.
477. Ng L-K, Dillon JR. Typing by serovar, antibiogram, plasmid content, ribotyping, and isoenzyme typing to determine whether *Neisseria gonorrhoeae* isolates requiring proline, citrulline, and uracil for growth are clonal. *J Clin Microbiol* 1993;31:1555-1561.
478. Novelli VM, Lewis RC, Dawood ST. Epidemic group A meningococcal disease in Haj pilgrims. *Lancet* 1987;2:863.
479. Obeid EMH. *Neisseria subflava* causing septic arthritis of the ankle of a child. *J Infect* 1993;27:100-101.
480. Olsen CC, Schwelke IR, Benjamin WH Jr, et al. Comparison of direct inoculation and Copan transport systems for isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:3583-3585.
481. Olsen SF, Djurhuus B, Rasmussen K, et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol Infect* 1991;106:445-457.
482. Oppenheim BA. Antibiotic resistance ID *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis* 1997;24(Suppl 1):S98-S101.
483. Orden B, Amerigo MA. Acute otitis media caused by *Neisseria lactamica*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:986-987.
484. O'Rourke M, Ison CA, Renton AM, Spratt BG. Opa typing: a high resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhea. *Mol Microbiol* 1995;17:865-875.
485. Orsson B, Haraldsdottir V, Kristjansson M. *Moraxella catarrhalis* bacteraemia: a report on 3 cases and a review of the literature. *Scand J Infect Dis* 1998;30:105-109.
486. Orvelid P, Backman A, Olcen P. PCR identification of the group A *Neisseria meningitidis* gene in cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis* 1999;31:481-483.
487. Pai CH, Sorger S. Enhancement of recovery of *Neisseria meningitidis* by gelatin in blood culture media. *J Clin Microbiol* 1981;14:20-23.
488. Palladino S, Pearnan IW, Kay ID, et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* genitourinary infections in males by the AMPLICOR PCR assay of urine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:141-146.
489. Palmer HM, Arnold C. Genotyping *Neisseria gonorrhoeae* using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:2325-2329.
490. Palmer HM, Leeming JP, Tumer A. Investigation of an outbreak of ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* using a simplified Opa-typing method. *Epidemiol Infect* 2001;126:219-224.
491. Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2003;41:835-837.
492. Panagea S, Biboux R, Corkill JE, et al. A case of lower respiratory tract infection caused by *Neisseria weaveri* and review of the literature. *J Infect* 2002;44:96-98.
493. Parsons NJ, Curry A, Fox AJ, et al. The serum resistance of gonococci in the majority of urethral exudates is due to sialylated lipooligosaccharide seen as a surface coat. *FEMS Microbiol Lett* 1992;90:295-300.
494. Panerson TF, Patterson EJ, Masecar BL, et al. A nosocomial outbreak of *Branhamella catarrhalis* confirmed by restriction endonuclease analysis. *J Infect Dis* 1988;157:996-1001.
495. Peixuan Z, Xu Jing H, Li X. Typing *Neisseria meningitidis* by analysis of restriction fragment length polymorphisms in the gene encoding the class I outer membrane protein: application to assessment of epidemics through the last four decades in China. *J Clin Microbiol* 1995;33:458-462.
496. Peltola H. Prophylaxis of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed. *Infectious Disease Clinics of North America*. Vol 13. Bacterial meningitis. Philadelphia: WB Saunders, 1999:685-710.
497. Peltola H, Makela PH, Kayhty H, et al. Clinical efficacy of meningococcus group A capsular polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. *N Engl J Med* 1977;297:686-691.
498. Peltola H, Safary A, Kayhty H, et al. Evaluation of 2 tetravalent (ACYW135) meningococcal vaccines in infants and small children: a clinical study comparing immunogenicity of O-acetyl-negative and O-acetyl-positive group C polysaccharides. *Pediatrics* 1985;76:91-96.
499. Perez-Trallero E, Garcia-Arenzana JM, Ayestaran I, et al. Comparative activity in vitro of 16 antimicrobial agents against penicillin-susceptible meningococci and meningococci with diminished susceptibility to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1622-1623.
500. Perez-Trallero E, Gomez N, Garcia-Arenzana IM. E test as susceptibility test for evaluation of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:2341-2342.
501. Perry IL, Ballou DR, Salyer JL. Inhibitory properties of a swab transport device. *J Clin Microbiol* 1997;35:3367-3368.
502. Pettersson A, Prinz T, Umar A, et al. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 1998;27:599-610.
503. Pettersson B, Kodjo A, Ronaghi M, et al. Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 1998;48:75-89.

504. Pfaller MA, Jones RN. A review of the in vitro activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30,254 aerobic and anaerobic pathogens isolated worldwide. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:157-163.
505. Phillips EA, Schultz TR, Tapsall JW, et al. Maltose-negative *Neisseria meningitidis* isolated from a case of male urethritis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2851-2852.
506. Pinner R, Onyango F, Perkins BA, et al. Epidemic meningococcal disease in Nairobi, Kenya, 1989. *J Infect Dis* 1992;166:359-364.
507. Pinner R, Spellman P, Stephens DS. Evidence for functionally distinct pili expressed by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1991;59:3169-3175.
508. Poh CL, Lau QC. Subtyping of *Neisseria gonorrhoeae* auxotype-serovar groups by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1993;38:366-370.
509. Pollard AJ, Levin M. Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:333-345.
510. Pomeranz HD, Storch GA, Lueder GT. Pediatric meningococcal conjunctivitis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1999;36:161-163.
511. Pon E, Batchelor RA, Howell HB, et al. An unusual case of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* resistant to spectinomycin in California. *Sex Transm Dis* 1986;13:47-49.
512. Pontani D, Washton H, Bouchillon S, Johnson J. Susceptibility of European respiratory tract isolates to trovafloxacin, ciprofloxacin, clarithromycin, azithromycin, and ampicillin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:413-419.
513. Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW, et al. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerg Infect Dis* 2000;6:428-429.
514. Porritt RJ, Mercer JL, Munro R. Detection and serogroup determination of *Neisseria meningitidis* in CSF by polymerase chain reaction. *Pathology* 2000;32:42-45.
515. Potocki de Montak G, Remaud-Simeon M, Willemot RM, et al. Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties. *FEBS Lett* 2000;471:219-223.
516. Powars D, Larsen R, Johnson J, et al. Epidemic meningococemia and purpura fulminans with induced protein C deficiency. *Clin Infect Dis* 1993;17:254-261.
517. Pugles PM, Dworzack DL, Horowitz EA, et al. Efficacy of ciprofloxacin in the treatment of nasopharyngeal carriers of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1987;156:211-213.
518. Pujol C, Eugene E, Marceau M, Nassif X. The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilum-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4017-4022.
519. Raccoon JA, Whitney CG, Conova CS, Diaz PS. Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. *JAMA* 1998;280:2094-2098.
520. Radstrom P, Ferner C, Kristiansen B-E, et al. Transformational exchanges in the dihydropteroate synthase gene of *Neisseria meningitidis*: a novel mechanism of sulfonamide resistance. *J Bacteriol* 1992;174:6386-6393.
521. Rahman M, Kallstrom H, Normark S, Jonsson AB. PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 1997;25:11-25.
522. Read RC, Zimmerli S, Broadbent C, et al. The (α -8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun* 1996;64:3210-3217.
523. Reddy MS, Murphy TF, Faden HS, Bernstein JM. Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116:175-180.
524. Reddy TS, Smith D, Roy TM. Primary meningococcal pneumonia in elderly patient. *Am J Med Sci* 2000;319:255-257.
525. Reller BL, MacGregor RR, Beaty HN. Bactericidal antibody after colonization with *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1973;127:56-62.
526. Rice PA, Vayo HE, Tam MR, et al. Immunoglobulin G antibodies directed against protein III block killing of serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by immune serum. *J Exp Med* 1986;164:1735-1748.
527. Rice RJ, Biddle JW, Jean-Louis YA, et al. Chromosomally-mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: results of surveillance and reporting, 1983-1984. *J Infect Dis* 1986;153:340-345.
528. Rice RJ, Knapp JS. Antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* strains representing five distinct resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:155-158.
529. Rice RJ, Knapp JS. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* associated with pelvic inflammatory disease to cefoxitin, ceftriaxone, clindamycin, gentamicin, doxycycline, azithromycin, and other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1688-1691.
530. Rice RJ, Schalla WO, Whittington WL, et al. Phenotypic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from three cases of meningitis. *J Infect Dis* 1986;153:362-365.
531. Richards SJ, Greening AP, Enright MC, et al. Outbreak of *Moraxella catarrhalis* in a respiratory unit. *Thorax* 1993;48:91-92.
532. Richmond P, Goldblatt D, Fusco PC, et al. Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* 1999;18:641-646.
533. Richter SS, Winokur PL, Brueggemann AB, et al. Molecular characterization of the β -lactamases from clinical isolates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* obtained from 24 U.S. medical centers during 1994-1995 and 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:444-446.
534. Riedo FX, Plikaytis BD, Broome CV. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:643-657.
535. Riesbeck K, Orvelid-Molling P, Fredlund H, Olcen P. Long-term persistence of a dis-cothèque-associated invasive *Neisseria meningitidis* group C strain as proven by pulsed-field gel electrophoresis and porA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2000;38:1638-1640.
536. Ringuette L, Lorange M, Ryan A, et al. Meningococcal infections in the province of Quebec, Canada, during the period 1991 to 1992. *J Clin Microbiol* 1995;33:53-57.
537. Ringuette L, Trudeau T, Turcotte T, et al. Emergence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin—Quebec, 1994-1995. *Can Commun Dis Rep* 1996;22:121-125.
538. Riou JY, Guibourdenche M. *Neisseria polysaccharea* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:163-165.
539. Riou JY, Guibourdenche M, Perry MB, et al. Structure of the extracellular D-glucan produced by *Neisseria polysaccharea*. *Can J Microbiol* 1986;32:909-911.
540. Risher WH, McFadden PM. *Neisseria gonorrhoeae* mycotic ascendit; aortic aneurysm. *Ann Thorac Surg* 1994;57:748-750.
541. Robens MC, Knapp JS. Host range of the conjugative 25.2 megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and related species. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:488-491.
542. Roberts MC, Knapp JS. Transfer of β -lactamase plasmids from *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species by the 25.2-megadalton conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1430-1432.
543. Robinson A, Griffith SB, Moore DG, et al. Evaluation of the RIM system and Gonogen test for identification of *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1985;3:125-130.
544. Robinson AJ, Watkeys JEM, Ridgway GL. Sexually transmitted organisms in sexually abused children. *Arch Dis Child* 1998;79:356-358.
545. Roche Diagnostic Systems Inc. AMPLICOR™ *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG) test package insert. Branchburg, NJ: Roche Diagnostic Systems, 1999.
546. Rokki B, Mazarin V, Maitre-Wilmotte G, Quentin-Millet MJ. Identification of two major families of transferrin receptors among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. *FEMS Microbiol Lett* 1993;110:51-57.
547. Rompalo AM. Diagnosis and treatment of sexually acquired proctitis and proctocolitis: an update. *Clin Infect Dis* 1994;28(Suppl):S84-S90.
548. Ronne T, Benhelsen L, Buhl L, et al. Comparative studies on pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* during a localized outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Scand J Infect Dis* 1993;25:331-339.
549. Rosenqvist E, Wedge E, Hoiby EA, et al. Serogroup determination of *Neisseria meningitidis* by whole-cell, ELISA, dot-blotting, and agglutination. *APMIS* 1990;98:501-506.
550. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephen DS, et al. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis* 1999;180:1894-1901.
551. Rosenstein NE, Stocker SA, Popovic T, et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria meningitidis* in the United States, 1997. *Clin Infect Dis* 2000;30:212-213.
552. Ross JDC. Systemic gonococcal infection. *Genitourin Med* 1996;72:404-407.
553. Rossau R, Kerster K, Falsen E, et al. *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IV): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:198-210.
554. Rossau R, Vandenbusche G, Thielemans S, et al. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and deoxyribonucleic acid homology of *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysella*, and Centers for Disease Control groups EF-4 and M-5 in the emended Family *Neisseriaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:185-198.
555. Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:310-319.
556. Rotta AT, Amar BI, Ballal N, et al. *Moraxella catarrhalis* ventriculitis in a child with hydrocephalus and an external ventricular drain. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:397-398.
557. Rudel T, Faciu D, Banen R, et al. Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7986-7990.
558. Rudel T, Schaeurpflug I, Meyer TF. *Neisseria* PilC protein identified as a type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* 1995;373:357-359.
559. Sacchi CT, Tondella MLC, de Lemos APS, et al. Characterization of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in several Brazilian states. *J Clin Microbiol* 1994;32:1783-1787.
560. Saez-Llorens X, McCracken GH Jr. Antimicrobial and anti-inflammatory treatment of bacterial meningitis. In: Schaad UB, ed. *Infectious Diseases Clinics of North America*. Vol. 13. Bacterial meningitis. Philadelphia: WB Saunders, 1999:619-636.
561. Saez-Nieto JA, Campos J. Penicillin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* in Spain. *Lancet* 1988;1:1452-1453.
562. Saez-Nieto JA, Fenoll A, Vasquez J, et al. Prevalence of maltose-negative *Neisseria meningitidis* variants during an epidemic period in Spain. *J Clin Microbiol* 1982;15:78-81.
563. Saez-Nieto JA, Fontanals D, Garcia De Jalon J, et al. Isolation of *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. *Epidemiol Infect* 1987;99:463-469.
564. Saez-Nieto JA, Lujan R, Berron S, et al. Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin Infect Dis* 1992;14:394-402.
565. Saez Nieto JA, Lujan R, Martinez-Suarez JV, et al. *Neisseria lactamica* and *Neisseria polysaccharea* as possible sources of meningococcal β -lactam resistance by genetic transformation. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2269-2272.
566. Safton S, Cooper G, Hamson M, et al. *Neisseria anis* infection: a case report. *Commun Dis Intell* 1999;23:221.
567. Saginur R, Clecner B, Portnoy J, et al. Superoxol (catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1982;15:475-477.
568. Sahn DF, Jones ME, Hickey ML, et al. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:457-466.

569. Saito H, Annaissie EJ, Khardon N, et al. *Branhamella catarrhalis* septicemia in patients with leukemia. *Cancer* 1988;61:3215-3217.
570. Salzman MB, Rubin LG. Meningococcemia. In: Litwick LI, ed.: Infectious Disease Clinics of North America. Vol. 10. Infectious disease emergencies. Philadelphia: WB Saunders, 1996;709-725.
571. Satnuelsson S, Gustavsen S, Ronne T. Epidemiology of meningococcal disease in Denmark, 1980-1988. *Scand J Infect Dis* 1991;23:723-730.
572. Samuelsson S, Handysides S, Ramsay M, et al. Meningococcal infection in pilgrims returning from the Hajj: update from Europe and beyond. *Eurosurveill Wkly* 2000;17:1-5.
573. Sandstrom EG, Ruden A-K. Markers of *Neisseria gonorrhoeae* for epidemiological studies. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990;69:149-156.
574. Sanyal SK, Wilson N, Twum-Danso K, et al. *Moraxella* endocarditis following balloon angioplasty of aortic coarctation. *Am Heart J* 1991;119:1421-1423.
575. Saperstein DA, Bennett MD, Steinberg JP, et al. Exogenous *Neisseria meningitidis* endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1997;123:135-136.
576. Sanin JS. *Neisseria sicca* meningitis in a woman with nascent pernicious anemia. *Am J Med* 2000;109:175-176.
577. Saunders N B, Shoemaker DR, Brandt BL, Zollinger WD. Confirmation of suspicious case of meningococcal meningitis by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:3215-3219.
578. Saunderson NB, Zollinger WD, Rao VB. A rapid and sensitive PCR strategy employed for amplification and sequencing of porA from a single colony forming unit of *Neisseria meningitidis*. *Gene* 1993;137:153-162.
579. Schachter J, Hook EW, McConakk WM, et al. Ability of the Digene hybrid capture II test to identify *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:3668-3671.
580. Schitman RB, Ryan KJ. *Neisseria lactamica* septicemia in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* 1983;17:935-937.
581. Schneider H, Griffiss JM, Mandrell RE, et al. Elaboration of a 3.6-kilodalton lipooligosaccharide, antibody against which is absent from human sera, is associated with serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1985;50:672-677.
582. Schneider H, Hanmack CA, Apicella MA, et al. Instability of expression of lipooligosaccharides and their epitope in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1988;56:942-946.
583. Scholten RJPM, Bijlmer HA, Poolman JT, et al. Meningococcal disease in the Netherlands, 1958-1990: a steady increase in the incidence since 1982 partially caused by new serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis* 1993;16:237-246.
584. Scholten RJPM, Poolman JT, Valkenburg HA, et al. Phenotypic and genotypic changes in a new clone complex of *Neisseria meningitidis* causing disease in the Netherlands, 1958-1990. *J Infect Dis* 1994;169:673-676.
585. Schoolnik GK, Buchanan TM, Holmes KK. Gonococci causing disseminated gonococcal infections are resistant to the bactericidal action of normal human serum. *J Clin Invest* 1976;8:1163-1173.
586. Schoolnik GK, Fernandez R, Tai J-Y. Gonococcal pili: primary structure and receptor binding domain. *J Exp Med* 1984;159:1351-1370.
587. Schull TR, Tapall JW, White PA, Newton PJ. An invasive isolate of *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to the quinolones. *Antimicrob Agent Chemother* 2000;45:909-911.
588. Schwam E, Cox J. Fulminant meningococcal supraglottitis: an emerging infectious syndrome. *Emerg Infect Dis* 1999;5:464-467.
589. Shwarc SK, Bolan GA, Fullilove M, et al. Crack cocaine and the exchange of sex for money for drugs. *Sex Transm Dis* 1992;19:7-13.
590. Schwan B, Al-Ruwais A, A'shi J, et al. Comparative efficacy of ceftriaxone and rifampicin in eradicating pharyngeal carriage of group A *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1988;1:1239-1242.
591. Schwelke JR, Zajackowski ME. Comparison of DNA probe (Gen-Probe) with culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in an urban STD program. *Genitourin Med* 1996;72:108-110.
592. Scott MJ, Scott MJ. Primary cutaneous *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Arch Dermatol* 1982;118:351-352.
593. Scribner RK. Neutralization of the inhibitory effect of sodium polyanethanol sulfonate on *Neisseria meningitidis* in blood cultures processed with the DuPont Isolator system. *J Clin Microbiol* 1984;20:40-42.
594. Seddon PC, Sundertand D, O'Halloran SM, et al. *Branhamella catarrhalis* colonization in pre-school asthmatics. *Pediatr Pulmonol* 1992;13:133-135.
595. Seidemann K, Lauten M, Gappa M, et al. Obstructive airway disease cause by *Moraxella catarrhalis* after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2000;14:707-709.
596. Seifert HS, Wright CJ, Jerse AE, et al. Multiple gonococcal pili antigenic variants are produced during experimental human infections. *J Clin Invest* 1994;93:2744-2749.
597. Seilander RK, Callgant DA, Ochman H, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873-884.
598. Sethi S, Surface JM, Murphy TF. Antigenic heterogeneity and molecular analysis of CopB of *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun* 1997;65:3666-3671.
599. Shinnors EN, Catlin BW. Arginine and pyrimidine biosynthetic defects in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from patients. *J Bacteriol* 1982;151:295-302.
600. Simmons G, Jones N, Calder L. Equivalence of ceftriaxone and rifampicin in eliminating nasopharyngeal carriage of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:909-911.
601. Simmons WP. *Moraxella catarrhalis* pneumonia and bacteremia in an otherwise healthy child. *Clin Pediatr* 1999;38:560-561.
602. Sinave CP, Rat KR. Infective endocarditis caused by *Neisseria fluvescens*. *Am J Med* 1987;82:153-164.
603. Singh RP, Marwaha RK. Fulminant *Branhamella catarrhalis* tracheitis. *Ann Trop Paediatr* 1990;10:221-222.
604. Sivalingam P, Tully AM. Acute meningococcal epiglottitis and septicemia in a 65-year-old man. *Scand J Infect Dis* 1998;30:196-198.
605. Sjöholm AG, Kuijper EJ, Tijssen CC, et al. Dysfunctional properdin in a Dutch family with meningococcal disease. *N Engl J Med* 1988;19:33-37.
606. Smith I, Lehmann AK, Lie L, et al. Outbreak of meningococcal disease in western Norway due to a new serogroup C variant of the ET-5 clone: effect of vaccination and selective carriage eradication. *Epidemiol Infect* 1999;123:373-382.
607. Smith KR, Fisher HC III, Hook EW III. Prevalence of fluorescent monoclonal antibody-nonreactive *Neisseria gonorrhoeae* in five North American sexually transmitted disease clinics. *J Clin Microbiol* 1996;34:1551-1552.
608. Sneath PH, Barrett SJ. A new species of *Neisseria* from the dental plaque of the domestic cow. *Neisseria dentiae* sp. nov. *Lett Appl Microbiol* 1996;23:355-358.
609. Sohanki MA, Barnes RA, Gray SJ, et al. Measurement of serum antigen concentration by ultrasound-enhanced immunoassay and correlation with clinical outcome in meningococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:260-266.
610. Southern PM, Klncher AE. Bacteremia due to *Neisseria cinerea*: report of two cases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987;17:143-147.
611. Sow AI, Caugant DA, Cisse MF, et al. Molecular characteristics and susceptibility to antibiotics of serogroup A *Neisseria meningitidis* strains isolated in Senegal in 1999. *Scand J Infect Dis* 2000;32:185-187.
612. Spaargaren J, Stoof J, Fenema R, et al. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of a core group of *Neisseria gonorrhoeae* transmitters in the population attending a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2001;39:2335-2337.
613. Sparling PF. Biology of *Neisseria gonorrhoeae*. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, et al. eds.: Sexually Transmitted Diseases. 3rd Ed. New York: McGraw-Hill, 1999;433-449.
614. Sparling PF, Handsfield HH. *Neisseria gonorrhoeae*. In: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, eds.: Mandell, Douglas, and Bennett Principle and Practice of Infectious Diseases. 5th Ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2000;2242-2258.
615. Speeleld E, Fossepre J-M, Gordts B, et al. Comparison of three rapid methods, tributyrine, 4-methylumbelliferyl butyrate, and indoxyl acetate, for rapid identification of *Moraxella catarrhalis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1362-1363.
616. Spratt BG, Zhang Q-Y, Jone DM, et al. Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria fluvescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8988-8992.
617. Stackebrandt E, Murray RGE, Truper HG. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives." *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:321-325.
618. Stansfield RE, Masterson RG, Dale BAS, et al. Primary meningococcal conjunctivitis and the need for prophylaxis in close contacts. *J Infect* 1994;29:211-214.
619. Stanwell-Smith RE, Stuan JM, Hughes AO, et al. Smoking, the environmental and meningococcal disease: a case-control study. *Epidemiol Infect* 1994;112:315-328.
620. Stetanou J, Agelopoulos AV, Sipas NV, et al. *Moraxella catarrhalis* endocarditis: case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2000;32:217-218.
621. Stein DC, Danaher RJ, Cook TM. Characterization of a gyrB mutation responsible for low-level nalidixic acid resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:622-626.
622. Steingrube VA, Wallace RJ Jr, Beaulieu D. A membrane-bound precursor β -lactamase in strains of *Moraxella catarrhalis* and *Moraxella nonliquefaciens* that produce BRO-I and BRO-2 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:237-244.
623. Stenfors L-E, Raisanen S. Abundant attachment of bacteria to nasopharyngeal epithelium in otitis-prone children. *J Infect Dis* 1992;165:1148-1150.
624. Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 1983;148:369-376.
625. Stephens DS, Spellman PA, Swartley JS. Effect of the (α 2-8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* 1993;167:475-479.
626. Stern A, Brown M, Nickel P, et al. Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* 1986;47:61-71.
627. Stojilkovic I, Larson J, Hwa V, et al. HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J Bacteriol* 1996;178:4670-4678.
628. Stotka JL, Rupp ME, Meier FA, et al. Meningitis due to *Neisseria mucosa*: case report and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:837-841.
629. Strathee CA, Tyler SD, Ryan JA, et al. Genomic fingerprinting of *Neisseria meningitidis* associated with group C meningococcal disease in Canada. *J Clin Microbiol* 1993;31:2506-2508.
630. Strongin IS, Kale SA, Raymond MK, et al. An unusual presentation of gonococcal arthritis in an HIV positive patient. *Ann Rheum Dis* 1991;50:572-573.
631. Struillou L, Raffi F, Barrier JH. Endocarditis caused by *Neisseria elongata* subspecies nitroreducens: case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:625-627.
632. Sutcliffe EM, Jones DM, El-Sheikh S, et al. Penicillin-insensitive meningococci in the U.K. *Lancet* 1988;1:657-658.
633. Swanon J. Colony opacity and protein II compositions of gonococci. *Infect Immun* 1982;37:359-368.

634. Swartley JS, Ahn JH, Liu JJ, et al. Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J Bacteriol* 1996;178:4052-4059.
635. Swanley JS, Liu LJ, Miller YK, et al. Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the (α 1-6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1998;180:1533-1539.
636. Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:271-276.
637. Sweet RL. Pelvic inflammatory disease. *Hosp Pract* 1993;28(Suppl):S25-S30.
638. Taha M-K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:855-857.
639. Taha M-K, Morand PC, Pereira Y, et al. Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* 1998;28:1153-1163.
640. Takahashi H, Tanaka H, Inouye H, et al. Isolation from a healthy carrier and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain that is deficient in γ -glutamyl aminopeptidase activity. *J Clin Microbiol* 2002;40:3035-3037.
641. Tanaka M, Matsulloto T, Kobayashi T, et al. Emergence of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2367-2370.
642. Tappero JW, Reporter R, Wenger JD, et al. Meningococcal disease in Los Angeles County, California, and among men in the country jails. *N Engl J Med* 1996;335:833-840.
643. Tapsall JW, Lovett R, Munro R. Failure of 500 mg ciprofloxacin therapy in male urethral gonorrhea. *Med J Aust* 1992;156:143.
644. Tapsall JW, Phillips EA, Schultz TR, Thacker CL. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney, Australia, 1991 to 1995. *Sex Transm Dis* 1996;23:425-428.
645. Tapsall JW, Phillips EA, Schultz TR, et al. Strain characteristics and antibiotic susceptibility of isolates of *Neisseria gonorrhoeae* causing disseminated gonococcal infection in Australia. *Int J STD AIDS* 1992;273-277.
646. Tapsall JW, Schultz TR, Limnios EA, et al. Failure of azithromycin therapy in gonorrhea and discordance with laboratory test parameters. *Sex Transm Dis* 1998;25:505-508.
647. Teller Brunton WA, Young H, Fraser DR. Isolation of *Neisseria lactamica* from the female genital tract: a case report. *Br J Vener Dis* 1980;56:325-326.
648. Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria meningitidis*. *Clin Microbiol Newslett* 1993;15:37-38.
649. Tesoro LJ, Selbst SM. Factor affecting outcome in meningococcal infection. *Am J Dis Child* 1991;145:218-220.
650. Thompson DK, Deal CD, Ison CA, et al. A typing system for *Neisseria gonorrhoeae* based on biotinylated oligonucleotide probes to PIB gene variable regions. *J Infect Dis* 2000;181:1652-1660.
651. Thompson DS, French SA. Comparison of commercial Amies transport systems with in-house Amies medium for recovery of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3020-3021.
652. Thompson EC, Brantley D. Gonococcal endocarditis. *J Natl Med Assoc* 1996;8:353-356.
653. Thornsberry C, Jones ME, Hickey ML, et al. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated in the United States. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:749-759.
654. Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahm DF. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2612-2623.
655. Tikly M, Diese M, Zannettou N, Essor R. Gonococcal endocarditis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1997;36:270-272.
656. Tinsley CR, Heckels JE. Variation in the expression of pili and outer membrane protein by *Neisseria meningitidis* during the course of meningococcal infection. *J Gen Microbiol* 1986;132:2483-2490.
657. Tondella ML, Popovic T, Rosenstein NE, et al. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B subserotypes and serotypes circulating in the United States. *J Clin Microbiol* 2000;38:3323-3328.
658. Tondella MLC, Sacchi CT, Neves BC. Ribotyping as an additional molecular marker for studying *Neisseria meningitidis* serogroup B epidemic strains. *J Clin Microbiol* 1994;32:2745-2748.
659. Tonjum T, Cagan DA, Dunham SA, Koomey M. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein. *Mol Microbiol* 1998;29:111-124.
660. Tonjum T, Freitag NE, Namork E, Koomey M. Identification and characterization of pilQ, a highly-conserved pilus assembly gene in pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1995;16:451-464.
661. Tramont EC. Gonococcal vaccine. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):S74-S77.
662. Treec DL, Schultz AJ, Knapp JS. Use of the neisserial lipoprotein (Lip) for subtyping *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2914-2916.
663. Triton D, Wats T, Sieratzki JS. Peri-orbital cellulitis and sepsis by *Branhamella catarrhalis*. *Eur J Pediatr* 1998;157:611-612.
664. Tronel H, Chaudemanche H, Pechier N, et al. Endocarditis due to *Neisseria mucosa* after tongue piercing. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:275-276.
665. Tsai CM, Civin CI. Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetrose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GLc). *Infect Immun* 1991;59:3604-3609.
666. Tsipouchidis A, Hurwitz R, Brinkman V, et al. Neisserial immunoglobulin A1 protease induces specific T-cell response in human. *Infect Immun* 2002;70:335-344.
667. Turner A, Jephcott AE, Gough KR. Tetracycline-resistant meningococci. *Lancet* 1988;1:1454.
668. Turner PC, Southern KW, Spencer NJB, Pullen H. Treatment failure in meningococcal meningitis. *Lancet* 1990;335:732-733.
669. Twumai PA Jr, Kumah S, Leach A, et al. A trial of a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in African infants. *J Infect Dis* 1996;174:1360-1363.
670. Tzanakaki G, Blackwell CC, Kremasthou J, et al. Antibiotic sensitivities of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and carriers in Greece. *Epidemiol Infect* 1992;108:449-455.
671. Tzeng Y-L, Stephen DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbe Infect* 2000;2:687-700.
672. Unemo M, Berglund T, Olcen P, Fredlund H. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for *Neisseria gonorrhoeae*: identification of clusters within serovars. *Sex Transm Dis* 2002;29:25-31.
673. Unemo M, Olcen P, Berglund T, et al. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae*: sequence analysis of the porB gene confirms presence of two circulating strains. *J Clin Microbiol* 2002;40:3741-3749.
674. United States Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. National Institutes of Health. Appendix I. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BM BL). In: Fleming DO, Hunt DL, eds.: *Biological Safety: Principles and Practices*. 3rd Ed. Washington, DC: ASM Press. 2000:609-700.
675. Uriz S, Pineda V, Grau M, et al. *Neisseria meningitidis* with reduced sensitivity to penicillin: observation in 10 children. *Scand J Infect Dis* 1991;23:171-174.
676. Valenzuela GA, Davis TD, Pizzani E, et al. Infective endocarditis due to *Neisseria sicca* and associated with intravenous drug abuse. *South Med J* 1992;85:929.
677. Van Der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington, et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2001;39:1008-1016.
678. Van Der Pol B, Martin DH, Schachter J, et al. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for *Neisseria gonorrhoeae* by retesting specimens with equivocal result. *J Clin Microbiol* 2001;39:3092-3098.
679. Van Der Pol B, Williams JA, Smith NJ, et al. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II assay with the rapid capture system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:3558-3564.
680. Van Deuren M, Brandzaeg P, Van der Meer JWM. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000;12:144-166.
681. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 2001;39:1751-1756.
682. Van Dyck F, Smet H, Piot P. Comparison of E-test with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1586-1588.
683. Vanechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Flamen P. Rapid identification of *Branhamella catarrhalis* with 4-methylumbelliferyl butyrate. *J Clin Microbiol* 1988;26:1227-1228.
684. Vanechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Van Den Abeele AMD. Selective medium for *Branhamella catarrhalis* with acetazolamide as a specific inhibitor of *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 1988;26:2544-2548.
685. Vanechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Van Den Abeele AMD. Serological typing of *Moraxella catarrhalis* strain on the basis of lipopolysaccharide antigens. *J Clin Microbiol* 1990;28:182-187.
686. Vanechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, et al. Respiratory tract carrier rates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in adults and children and interpretation of the isolation of M. catarrhalis from sputum. *J Clin Microbiol* 1990;28:2674-2680.
687. Van Eso D, Fontanels D, Uriz S, et al. *Neisseria meningitidis* strains with 687 created susceptibility to penicillin. *Pediatr Infect Dis* 1987;6:438-439.
688. Van Hare GF, Shurin PA, Marchant CD, et al. Acute otitis media caused by *Branhamella catarrhalis*: biology and therapy. *Rev Infect Dis* 1987;9:16-27.
689. Van Looveren M, Ison CA, Ieven M, et al. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2181-2188.
690. Van Looveren M, Van Damme P, Hauchecorne M, et al. Molecular epidemiology of recent Belgian isolated of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Clin Microbiol* 1998;16:2828-2834.
691. Vedros NA, Genus I, *Neisseria* Trevisan 1885, 105AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984:190-196.
692. Vermeij CG, Van Dam SW, Oosterkamp HM, Verburgh CA. *Neisseria subflava* biovar perflava peritonitis in a continuous cyclic peritoneal dialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1608.
693. Verham GA, Crowther JA. Acute myeloid leukaemia presenting with acute *Branhamella catarrhalis* epiglottitis. *J Infect* 1993;26:93-95.
694. Viagapan GM, Cudlip S, Lee PYC, et al. Brain abscess caused by infection with *Moraxella catarrhalis* following a penetrating injury. *J Infect* 1998;36:130-131.
695. Virji M, Heckels JE. The role of common and type-specific pilus antigenic domains in adhesion and virulence of gonococci for human epithelial cell. *J Gen Microbiol* 1984;130:1089-1095.
696. Virji MHJ, Potts WJ, Hart CA, Saunders JR. Identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies SM1 and SM2 which react with all pili of *Neisseria meningitidis* and the distribution their encoding sequences in the genomes of *Neisseria* species. *J Gen Microbiol* 1989;115:3239-3251.

697. Virji M, Watt SM, Barker S, et al. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1996;22:929-939.
698. Vlapolder F, Mutsaers JAEM, Blog F, et al. Value of a DNA probe assay (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of gonococcal infection. *J Clin Microbiol* 1993;31:107-110.
699. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, et al. The complex pattern of cytokine in serum from patients with meningococcal septic shock. *J Exp Med* 1989;169:333-338.
700. Walker ES, Neal CL, Laffan E, et al. Long-term trends in susceptibility of *Moraxella catarrhalis*: a population analysis. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:175-182.
701. Wallilice RJ Jr, Nash DR, Steingrube VA. Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Am J Med* 1990;88(Suppl 5A):46S-50S.
702. Wallace RJ Jr, Steingrube VA, Nash DR, et al. BRO β -lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *moraxella*, including evidence for chromosomal β -lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens*, and *M. lacunata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1845-1854.
703. Walton DT. Fluorescent antibody-negative penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1989;27:1885-1886.
704. Wan WL, Farkas GC, May WN, et al. The clinical characteristics and course of adult gonococcal conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1986;102:575-583.
705. Watanakunakorn C, Thomson R. Septicemia due to a maltose-positive, glucose-negative strain of group C *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1983;18:436-437.
706. Weiss PJ, Kennedy CA, McCann DF, et al. Fulminant endocarditis due to infection with penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1992;14:288-290.
707. Welborn PP, Uyeda CT, Ellison-Birang N. Evaluation of Gonochek II as a rapid identification system for pathogenic *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 1984;20:680-683.
708. Welch WD, Cartwright G. Fluorescent monoclonal antibody compared with carbohydrate-utilization for rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:293-296.
709. West SE, Sparling PF. Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation: alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. *Infect Immun* 1985;14:388-394.
710. Whitley DM, LeCorney GM, Mackay IM, et al. A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* by LightCycler. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:85-89.
711. Whittington WL, Knapp JS. Trends in resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial agents in the United States. *Sex Transm Dis* 1988;15:202-210.
712. Whittington WL, Rice RJ, Biddle JW, et al. Incorrect identification of *Neisseria gonorrhoeae* from infants and children. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:3-10.
713. Whitton T, Smith AG. Erythema nodosum secondary to meningococcal septicemia. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:97-98.
714. William DC, Felman YM, Corsaro MC. *Neisseria meningitidis* probable pathogen in two related cases of urethritis, epididymitis, and acute pelvic inflammatory disease. *JAMA* 1979;242:1653-1654.
715. William DC, Felman YM, Riccardi NB, et al. The utility of anoscopy in the rapid diagnosis of symptomatic anorectal gonorrhea in men. *Sex Transm Dis* 1981;8:16-17.
716. Wilson APR, Wolff J, Atia W. Acute urethritis due to *Neisseria meningitidis* group A acquired by orogenital contact: a case report. *Genitourin Med* 1989;65:122-123.
717. Wilson J, Zaman AG, Simmons AV. Gonococcal arthritis complicated by acute pericarditis and pericardial effusion. *Br Heart J* 1990;63:134-135.
718. Winstead JM, McKinsey DS, Tasker S, et al. Meningococcal pneumonia: characterization and review of cases seen over the past 25 years. *Clin Infect Dis* 2000;30:87-94.
719. Winther-Larsen HC, Hegge ET, Wolfgang M, et al. *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15276-15281.
720. Wise CM, Morris CR, Wausilaskas BL, et al. Gonococcal arthritis in an era of increasing penicillin resistance: presentations and outcomes in 41 recent cases (1985-1991). *Arch Intern Med* 1994;154:2690-2695.
721. Wong JD, Janda JM. Association of an important *Neisseria* species, *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*, with bacteremia, endocarditis, and osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1992;30:719-720.
722. Wong VK, Ross LA. *Branhamella catarrhalis* septicemia in an infant with AIDS. *Scand J Infect Dis* 1988;20:559-560.
723. Woods CR, Koeutb T, Estabrook MM, Lupsh JR. Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1996;174:760-767.
724. Woods CR, Smith AL, Wasilaskas BL, et al. Invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in North Carolina. *J Infect Dis* 1994;170:453-456.
725. Woods GL, Garza DM. Use of Gen-Probe competition assay as a supplement to probes for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:177-178.
726. Woods JP, Kersulyte D, Tolan RW, et al. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* during a university outbreak. *J Infect Dis* 1994;169:1384-1389.
727. Yeo SF, Livermore DM. Effect of inoculum size on the in-vitro susceptibility to β -lactam antibiotics of *Moraxella catarrhalis* isolates of different β -lactamase types. *J Med Microbiol* 1994;40:252-255.
728. Yeung K-H, Ng L-K, Dillon JR. Evaluation of E test for testing antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with different growth media. *J Clin Microbiol* 1993;31:3053-3055.
729. Young H, Anderson J, Moyes A, McMillan A. Non-cultural detection of rectal and pharyngeal gonorrhoea by the Gen-Probe PACE 2 assay. *Genitourin Med* 1997;73:59-62.
730. Young H, Moyes A. An evaluation of pre-poured selective media for the isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol* 1996;44:253-260.
731. Young LS, Moyes A. Comparative evaluation of AccuProbe culture identification test for *Neisseria gonorrhoeae* and other rapid methods. *J Clin Microbiol* 1993;31:1996-1999.
732. Yu RH, Bonnah RA, Ainsworth S, Schryvers AB. Analysis of the immunological responses to transferrin and lactoferrin receptor proteins from *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun* 1999;67:3793-3799.
733. Yusuf HR, Rochat RW, Baughman WS, et al. Maternal cigarette smoking and invasive meningococcal disease: a cohort study among children in metropolitan Atlanta, 1989-1996. *Am J Public Health* 1999;89:712-717.
734. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:343-348.
735. Zangwill KM, Schuchat A, Riedo FX. School-based clusters of meningococcal disease in the United States. Descriptive epidemiology and a case-control analysis. *JAMA* 1997;271:389-395.
736. Zenilman JM, Nims LJ, Menegus MA, et al. Spectinomycin-resistant gonococcal infection- in the United States. *J Infect Dis* 1987;156:1002-1004.
737. Zhanel GG, Karlowky JA, Low DE, et al. Antibiotic resistance in respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from across Canada from 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:655-662.
738. Zhang QY, Jones DM, Saez-Nieto JA, et al. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1523-1528.

Cocos grampositivos

Parte I: Estafilococos y cocos grampositivos relacionados

<http://booksmedicos.org>

Taxonomía de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

Importancia clínica de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

Staphylococcus aureus subesp. *aureus*

Estafilococos coagulasa negativos

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus saprophyticus subesp. *saprophyticus*

Otros estafilococos coagulasa negativos

Especies de *Micrococcus* y géneros relacionados

Rothia mucilaginosa

Aislamiento y diferenciación preliminar de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

Frotis directos con tinción de Gram

Aislamientos en muestras clínicas

Morfología de la colonia

La prueba de la catalasa

Métodos para la diferenciación de micrococos y estafilococos

Fermentación de la glucosa

Sensibilidad a la lisostafina

Producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina

Sensibilidad a la furazolidona

Prueba de la oxidasa modificada

Sensibilidad a la bacitracina

Identificación de *Staphylococcus aureus*

Prueba de la coagulasa en portaobjetos

Prueba de la coagulasa en tubo

Procedimientos alternativos para la prueba de la coagulasa

Aglutinación del látex

Hemaglutinación pasiva

Pruebas confirmatorias adicionales

Prueba de la desoxirribonucleasa (DNasa)

Prueba de la endonucleasa termoestable

Fermentación del manitol

Otros métodos para la identificación de *Staphylococcus aureus*

Pruebas rápidas de detección de resistencia a la meticilina

Diferenciación de estafilococos coagulasa positivos de origen veterinario

Identificación de estafilococos coagulasa negativos

Métodos de identificación convencionales

Producción de fosfatasa para la identificación de *Staphylococcus epidermidis*

Actividad pirrolidonil arilamidasa

Sensibilidad a la polimixina B

Prueba de ornitina descarboxilasa (ODC)

Producción de ureasa

Producción de acetoina

Sensibilidad a la deferroxamina

Sensibilidad a la novobiocina para la identificación de *Staphylococcus saprophyticus*

Sistemas de identificación comerciales

RapiDEC Staph®
 API Staph-IDENT®
 API Staph®
 API ID32 Staph®
 Tarjeta para la identificación parade grampositivos Vitek (GPI)®
 Panel MicroScan Rapid Pos Combo®
 Panel MicroScan Pos ID®
 Sistema BBL Cristal para la identificación de grampositivos (GP)®
 Sistema staf 18-R®

Staph-Zym®
 Microbact Staphylococcal 12S®
 Microbial Identification System®
 Sistema de identificación Biolog Microplate®

Métodos moleculares para identificación y tipificación de estafilococos

Identificación de *Micrococcus* y especies relacionadas
 Identificación de *Rothia mucilaginosa*

Enfoque para la identificación de estafilococos en el laboratorio

Con la excepción de *Enterobacteriaceae*, las bacterias grampositivas, en particular los cocos, son los microorganismos aislados con mayor frecuencia en muestras clínicas. Estas bacterias están diseminadas en la naturaleza y pueden hallarse en el medioambiente o como comensales de la piel, las mucosas y otros lugares del cuerpo en seres humanos y animales. La ubicuidad de estas bacterias grampositivas en la naturaleza hace difícil la interpretación de su aislamiento en muestras ocasionales de pacientes aun cuando que se presenten manifestaciones clínicas de un proceso infeccioso. La recuperación de estos microorganismos en muestras siempre debe correlacionarse con la condición clínica del paciente antes de que se pueda establecer su papel en un proceso infeccioso.

Aunque las bacterias grampositivas pueden causar infección por multiplicación tanto local como sistémica, algunas pueden multiplicarse en un sitio localizado y ejercer sus efectos patógenos mediante la producción de exotoxinas o enzimas que actúan a distancia. Las toxinas estafilocócicas son responsables de la intoxicación alimentaria, el síndrome de la piel escaldada y el síndrome de shock séptico. El síndrome de shock tóxico estreptocócico (cap. 13) es una entidad clínica en la cual los signos y los síntomas de infección y los rasgos patológicos de la enfermedad se deben en gran parte a los efectos de las exotoxinas. Por otro lado, las bacterias gramnegativas tienen endotoxina, que es la porción lipídica del lipopolisacárido de la membrana externa. Las infecciones sistémicas por las bacterias gramnegativas pueden conducir al shock endotóxico, caracterizado por hipotensión, colapso vascular y, a veces, muerte. Esto sucede con mayor frecuencia cuando los microorganismos gramnegativos ingresan en el torrente circulatorio.

Debido al número creciente de especies estafilocócicas reconocidas en infecciones humanas y el hallazgo de resistencia a múltiples antibióticos en aislamientos comunes y no comunes, es imperativo que los microbiólogos clínicos estén familiarizados con los métodos actuales para la caracterización de estos microorganismos. En este capítulo se presentan los procedimientos de laboratorio y la importancia clínica del aislamiento y la identificación de los estafilococos y microorganismos relacionados. En el capítulo 13, se tratarán los estreptococos y las

bacterias similares a ellos. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de estos grupos bacterianos se consignan en el capítulo 16.

Taxonomía de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

En la edición de 1986 del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, la familia *Micrococcaceae* incluía cuatro géneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Staphylococcus*.^{29,30,225,232,233} Los estudios genéticos ulteriores (p. ej., hibridación de RNA DNA-ribosómico, secuenciación de rRNA 16S) y los análisis quimiotaenómicos (p. ej., composición de la pared celular, ácidos grasos celulares) documentaron la diversidad de estos microorganismos y establecieron que estos cuatro géneros no se deben englobar en una única familia. Los planococos y los estafilococos pertenecen a la línea filética *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus*, mientras que los micrococos y los estomatococos están relacionados con una clasificación de actinomicetos amicélicos. De acuerdo con la "hoja de ruta" de la nueva edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, los estafilococos están en el filo *Firmicutes* y comprenden el género I en la familia V ("*Staphylococcaceae*"), orden I (*Bacillales*AL) en clase III "Bacilos". La familia V también incluye *Gemella* (véase cap. 13), *Macrococcus* y *Salinicoccus*.¹²⁵ Las especies de *Planococcus* son cocos marinos capaces de crecer en medios que contengan 15% de NaCl. Este género suele abarcar nueve especies: *P. citreus*, *P. kocuri*, *P. antarcticus*, *P. psychrophilus*, *P. alkanoclasticus*, *P. lilacinus*, *P. rifietensis*, *P. maritimus* y *P. maitriensis*.^{5,103,233,363,371,503} Dos de las primeras especies, *Planococcus*, *P. okeanokoites* y *P. mcmeekinii*, fueron reclasificadas recientemente en el nuevo género *Planomicrobium*.^{198,313,502} Los planococos están ahora clasificados como género I en la familia *Planococcaceae* en el orden I *Bacillales*.

El género *Micrococcus* estaba compuesto originalmente por nueve especies: *M. luteus*, *M. lylae*, *M. varians*, *M. roseus*, *M. agilis*, *M. kristinae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. sedentarius* y

M. halobius.²³² En 1995, Stackebrandt, Koch y cols. realizaron un análisis de la secuencia del DNA ribosómico 16S en estas especies reconocidas que derivó en la separación taxonómica y en la reorganización del género.^{231,423} *M. roseus*, *M. varians* y *M. kristinae* pertenecen ahora al género *Kocuria* como *K. roseus*, *K. varians* y *K. kristinae*.⁴⁰⁰ *M. halobius*, *M. nishinomiyaensis* y *M. sedentarius* ahora se ubican en tres géneros separados como *Nesterenkonia halobia*, *Kytococcus sedentarius* y *Dermacoccus nishinomiyaensis*. *M. agilis* ha sido reclasificado en el género *Arthrobacter* como *A. agilis*.²³¹ En este nuevo esquema taxonómico, *Micrococcus luteus* y *Micrococcus lylae* permanecen como especies únicas en el género *Micrococcus*.⁴⁹⁶ En 2000, se describió una tercera especie *Micrococcus*, *M. antarcticus*, una especie psicrófila aislada en la Antártida.²⁶⁹ A partir de 1995, se han aislado en fuentes medioambientales otras tres especies *Kocuria* (*K. palustris*, *K. Rhizophila* y *K. polaris*) y una especie nueva de *Nesterenkonia* (*N. lacusekhoensis*), y se aisló una segunda especie *Kytococcus* (*K. schroeteri*) en sangre humana.^{25,80,237,364} Estas ex especies *Micrococcus* ahora están en un filo y una clase separados de los estafilococos (filo Actinobacteria, clase Actinobacteria) y están en el mismo orden que los actinomicetos (orden Actinomycetales). Dentro de este orden las anteriores especies *Micrococcus* se ubican en la familia *Micrococcaceae* (*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*) y en la familia *Dermatophilaceae* (*Dermacoccus* y *Kytococcus*).¹²⁵ Los micrococos y especies relacionadas son cocos grampositivos un poco más grandes que las células estafilocócicas. Los micrococos tienen un diámetro de 1 a 1,8 µm, mientras que los estafilococos miden 0,5 a 1,5 µm. Las células se acomodan en su mayoría de a pares, en tétradas y en grupos irregulares. En el resto del capítulo, estos microorganismos se mencionan como micrococos y especies relacionadas.

El nuevo género *Macrococcus* incluye microorganismos aislados en animales que parecen cocos más grandes (1,1–2,5 µm de diámetro), de ahí el nombre “macro”-coccus.²¹⁷ El género difiere del estafilococo en que tiene menos similitudes de secuencia en el rRNA 16S, mayor contenido de G + C en el DNA, carece de ácidos teicoicos en la pared celular y tiene patrones de ribotipificación y restricción de DNA particulares. Los miembros del género *Macrococcus* son claramente distintos que los del género *Staphylococcus*, pero están muy relacionados con el “grupo *S. sciuri*”, los únicos miembros de los estafilococos oxidasa positivos.²⁴⁴ Se describieron siete especies *Macrococcus*: *M. equipercicus* y *M. carouselicus* (ambas halladas en caballos), *M. bovicus* (aisladas en el ganado vacuno), *M. caseolyticus* (ex *Staphylococcus caseolyticus*), aislados en productos lácteos, en ballenas piloto (calderón), y carnes y *M. brunensis*, *M. hajekii* y *M. lamae*, aislados en piel de llamas.^{217,280} Los miembros del género *Macrococcus* no están comprometidos en infecciones humanas.

Stomatococcus mucilaginosus, el único miembro del anterior género *Stomatococcus*, es un coco grampositivo encapsulado que es parte de la flora normal del aparato respiratorio humano.^{29,30} Sobre la base de la secuenciación de rDNA 16S y de los datos taxonómicos, los estomatococos son los más relacionados con los microorganismos del género *Rothia*. *S. mucilaginosus* ha sido transferido al género *Rothia* como *Rothia mucilaginosus* junto con *R. dentocariosa* y una especie nueva, *Rothia nasimurium*, un microorganismo encontrado en la nariz de los ratones.⁷⁹ Aunque *R. mucilaginosus* y *R. nasimurium* son cocos grampositivos, *R. dentocariosa* es un bacilo corineforme grampositivo que muestra ramificación rudimentaria. A causa de su morfología cocal, *R. mucilaginosus* se

describirá en este capítulo; *R. dentocariosa* se tratará en el capítulo 14.

Importancia clínica de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

El género *Staphylococcus* por lo general está compuesto por varias especies, muchas de las cuales se pueden encontrar en muestras clínicas humanas (recuadro 12-1). Los estafilococos son cocos grampositivos, no móviles, que no forman esporas, catalasa positivos. Estos microorganismos se acomodan como células simples, en pares, en tétradas y en cadenas cortas, pero aparecen en forma predominante en grupos como racimos. La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, excepto *S. aureus* subespecie *anaerobius* y *S. saccharolyticus*. Estas dos especies crecen de forma anaerobia y, a diferencia de las especies facultativas, a menudo son catalasa negativas. Los estafilococos se encuentran por lo general en la piel y las mucosas de seres humanos y otros animales. En algunos casos, esta asociación es muy específica. Por ejemplo, *S. capitis* subespecie *capitis* forma parte de la flora humana normal de la piel y las glándulas sebáceas del cuero cabelludo, la frente y el cuello, mientras que *S. auricularis* se encuentra en el canal auditivo externo.^{222,224} Algunas especies se encuentran sólo en animales y se reconocen como patógenos de animales. Por ejemplo, *S. hyicus* causa dermatitis infecciosa en los cerdos y *S. intermedius* ha sido aislado en varios tipos de infecciones en perros, incluidas infecciones cutáneas, mastitis, infecciones de heridas e infecciones del aparato reproductor.^{96,156,157} Las especies anteriores han sido aisladas en heridas de mordedura de perro en seres humanos.^{436,437} *S. delphini*, *S. felis*, *S. schleiferi* subespecie *coagulans* y *S. lutrae* causan procesos infecciosos en delfines, gatos domésticos, perros y nutrias de mar, respectivamente.^{111,190,191,469} Los seres humanos pueden colonizarse o infectarse por contacto cercano o frecuente con animales (p. ej., veterinarios, trabajadores de zoológicos, granjeros). Algunos de los estafilococos patógenos tanto para seres humanos como para animales producen una enzima llamada **coagulasa**, cuya detección se usa en el laboratorio para identificar a estos microorganismos (recuadro 12-2).^{156,469} Entre los estafilococos, la especie *S. aureus* coagulasa positiva y las dos especies coagulasa negativas, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, se observan con frecuencia en infecciones humanas.

Staphylococcus aureus subespecie *aureus*

S. aureus es por mucho el patógeno humano más importante entre los estafilococos. Se encuentra en el medioambiente externo y coloniza las narinas en el 20-40% de los adultos. Otros sitios son los pliegues cutáneos intertriginosos, el perineo, las axilas y la vagina. Aunque forma parte de la microflora humana normal, puede causar infecciones oportunistas importantes en condiciones apropiadas.⁴⁷⁸ Los factores que pueden predisponer a infecciones graves por *S. aureus* son:

- Defectos congénitos en la quimiotaxis de los leucocitos (p. ej., síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Down, síndrome de Job y síndrome de Chediak-Higashi) o adquiridos (p. ej., diabetes mellitus, artritis reumatoide).
- Defectos en la opsonización por anticuerpos secundarios a hipogammaglobulinemias adquiridas o congénitas o defectos o deficiencias en componentes del complemento (en especial C3 y C5).

Recuadro 12-1 Especies de *Staphylococcus* humanas, animales y medioambientales

Especie	Comentarios
ESTAFILOCOCOS ENCONTRADOS EN SERES HUMANOS Y EN PRIMATES	
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> ³⁹¹	Véase el texto Véase el texto Véase el texto <i>S. haemolyticus</i> es parte de la flora normal de la piel humana y también se encuentra en los primates. Este microorganismo ha sido informado como causa de bacteriemias primaria y hospitalaria, infecciones de tejidos blandos y heridas, infecciones urinarias e infecciones neonatales y pediátricas hospitalarias.^{93,152,240,271,340,341,432} Varios investigadores han informado cepas de <i>S. haemolyticus</i> que tienen CIM relativamente altas (2 a ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) para vancomicina en contextos clínicos de administración prolongada de vancomicina, lo que sugiere que la selección de clones resistentes se origina de poblaciones de microorganismos previamente sensibles.^{16,174,401,402,470} Al respecto, se describieron cepas resistentes a los dos glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) o sensibles a la vancomicina y resistentes a la teicoplanina.^{35,50,240} La resistencia a glucopéptidos en <i>S. haemolyticus</i> y en otros estafilococos coagulasa negativos, por lo general, está expresada de modo heterogéneo y existen dentro del mismo cultivo subpoblaciones sensibles y resistentes.^{35,36} El surgimiento de resistencia a los glucopéptidos en <i>S. haemolyticus</i> ha subrayado la importancia de la identificación correcta y de las pruebas de sensibilidad de estos aislamientos y el control de su diseminación en el ambiente hospitalario. Aunque la identificación fenotípica de <i>S. haemolyticus</i> es bastante directa, se han creado sondas de ácido nucleico para su identificación específica.³ Estudios acerca del mecanismo de resistencia a los glucopéptidos sugieren que las causas son multifactoriales y que pueden relacionarse con la estructura de la pared celular, donde las alteraciones en los entrecruzamientos dentro del peptidoglucano interfieren en la unión de los dímeros de glucopéptido y, por lo tanto, en la interacción apropiada del antibiótico con su objetivo.³⁷ Además de la resistencia a los glucopéptidos, también se han informado aislamientos de <i>S. haemolyticus</i> resistentes a meticilina y quinolona.^{340,432,501} La presencia de <i>S. haemolyticus</i> con resistencia múltiple a los antibióticos en el medio hospitalario y la transmisión de clones resistentes mediante las manos de los trabajadores sanitarios han sido documentadas por varios investigadores usando diversos métodos moleculares (p. ej., inmunoanálisis de polipéptidos estafilocócicos, análisis de plásmidos, polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del DNA cromosómico, electroforesis en gel de campo pulso del DNA total).^{93,340,432} <i>S. haemolyticus</i>, de modo similar a <i>S. epidermidis</i>, <i>S. warneri</i>, <i>S. xylosus</i> y <i>S. hyicus</i>, también produce una lipasa extracelular que puede cumplir una función en la virulencia.^{322,372}
<i>S. warneri</i> ²²²	Esta especie representa cerca del 1% de los estafilococos encontrados normalmente en la piel humana. <i>S. warneri</i> es ahora una causa bien reconocida de bacteriemia relacionada con el catéter, endocarditis de válvula nativa, osteomielitis vertebral hematógena y meningitis asociada con derivación ventriculoperitoneal.^{51,54,87,452,498} Las cepas aisladas en seres humanos ahora se llaman <i>S. warneri</i> subespecie 1, mientras que las cepas de primates se llaman <i>S. warneri</i> subespecie 2. Las cepas de <i>S. warneri</i> producen una enzima extracelular que tiene actividad de lipasa y fosfolipasa.^{372,438,467}
<i>S. hominis</i> ^{220,222}	<i>S. hominis</i> se encuentra en la piel humana; en ocasiones ha sido aislado de infecciones como un patógeno de bajo grado, que causa sepsis relacionadas con catéteres en huéspedes inmunodeprimidos.⁴⁵ <i>S. hominis</i> también ha sido informado como causa de endocarditis en un paciente como complicación de una vasectomía.²¹⁴ En 1998, la especie se dividió en dos subespecies: <i>S. hominis</i> subesp. <i>hominis</i>, y <i>S. hominis</i> subesp. <i>Novobiosepticus</i>.²²⁰ <i>S. hominis</i> subespecie <i>hominis</i> se encuentra en la piel y es un microorganismo infrecuente en procesos infecciosos, mientras que <i>S. hominis</i> subespecie <i>novobiosepticus</i> se aísla con más frecuencia en hemocultivos e infecciones confirmadas. La subespecie <i>novobiosepticus</i> es resistente a la novobiocina y no produce ácido a partir de D-trehalosa o N-acetil-D-glucosamina, mientras que la subespecie <i>hominis</i> es sensible a la novobiocina y produce ácido en forma aeróbica de D-trehalosa y de N-acetil-D-glucosamina.²²⁰ La subespecie <i>novobiosepticus</i> también tiende a ser más resistente a los antibióticos que la subespecie <i>hominis</i>.
<i>S. simulans</i> ²²²	<i>S. simulans</i> se encuentra sobre la piel y en la uretra de mujeres sanas. El microorganismo ha sido aislado como causa de septicemia, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, artritis séptica siguiente a una fractura expuesta de peroné, osteomielitis vertebral e infección de prótesis articular.^{193,278,289,361,430} <i>S. simulans</i> tiene una cápsula que inhibe la fagocitosis in vitro y contribuye a la virulencia in vivo.³²³ Junto con ciertos estafilococos coagulasa negativos (<i>S. epidermidis</i>, <i>S. haemolyticus</i> y <i>S. hominis</i>), las cepas de <i>S. simulans</i> resistentes a la meticilina tienen una proteína de unión a la penicilina adicional que muestra baja afinidad por meticilina, cefalotina y cefamandol y tiene una secuencia de aminoácidos análoga a la PBP2' encontrada en las cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina.³⁴⁶
<i>S. lugdunensis</i> ¹²¹	Esta especie, descrita por primera vez en 1988, se ha establecido rápidamente como un patógeno humano significativo. <i>S. lugdunensis</i> coloniza el área inguinal humana como se estableció por cultivo de muestras del pliegue inguinal y el predominio de cepas obtenidas en abscesos en la región de la cintura pelviana.^{27,326,465} <i>S. lugdunensis</i> se ha asociado con una amplia variedad de infecciones, como endocarditis asociada con válvula nativa y con válvula protésica y con marcapasos; meningitis; abscesos en la piel y los tejidos blandos; celulitis; peritonitis; prótesis de cadera infectadas; osteomielitis; discitis vertebral; infecciones de las vías vasculares; infecciones bucales; artritis séptica después de cirugía artroscópica; infecciones urinarias, e infecciones de la derivación ventriculoperitoneal.^{42,53,57,64,101,107,155,197,200,203,238,264,312,329,332,383,399,421,461,485,504} La presentación de un shock séptico similar al observado por bacterias gramnegativas también se asoció con bacteriemia por <i>S. lugdunensis</i>.⁶² Se han caracterizado las cepas de <i>S. lugdunensis</i> resistentes a la oxacilina que transportan el gen <i>mecA</i>.⁴⁴² El análisis de los aislamientos clínicos demostró que <i>S. lugdunensis</i> produce una variedad de factores de virulencia, incluidas α-y δ-hemolisinas, lipasas y esterasas.^{162,246}

Recuadro 12-1 Especies de *Staphylococcus* humanas, animales y medioambientales (cont.)

Especie	Comentarios
<i>S. schleiferi</i> ¹²¹	<i>S. schleiferi</i> fue descrito por primera vez en 1988 y se ha aislado de varias infecciones humanas, entre ellas empiema cerebral, infecciones de heridas, bacteriemia complicada con osteítis vertebral, infección de una prótesis de cadera, infección del catéter, infecciones urinarias hospitalarias, endocarditis de válvula protésica, osteomielitis e infecciones de marcapasos. ^{56,65,172,229,261,328} En 1990, la especie fue dividida en dos subespecies; las cepas humanas y caninos (asociadas con pioderma) se han designado <i>S. schleiferi</i> subespecie <i>schleiferi</i> y las cepas que causan otitis externa en perros se han designado <i>S. schleiferi</i> subespecie <i>coagulans</i> . ^{119,191} La especie produce una variedad de factores a los que se los vincula con la virulencia (p. ej., glucocálix, lipasas, esterasas y hemolisinas) y que pueden contribuir a la patogenicidad. ^{162,246,336} Cuando se describieron por primera vez las subespecies, se pensó que las cepas de la subespecie <i>schleiferi</i> daban factor de aglutinación positivo y pruebas de coagulasa en tubo negativas, mientras que las cepas de la subespecie <i>coagulans</i> mostraban factor de aglutinación negativo y pruebas de coagulasa en tubo positivas. ¹⁹¹ Vandenesch y cols. aislaron luego tres cepas de <i>S. schleiferi</i> subespecie <i>schleiferi</i> con factor de aglutinación y prueba de coagulasa en tubo positivos (lámina en color 12-3E y H). ⁴⁶³
<i>S. capitis</i> ²²²	<i>S. capitis</i> es parte de la flora humana normal y rodea las glándulas sebáceas en el cuero cabelludo y la frente. En 1991, esta especie fue dividida en dos subespecies, <i>S. capitis</i> subespecie <i>capitis</i> y <i>S. capitis</i> subespecie <i>ureolyticus</i> . ²¹ <i>S. capitis</i> subespecie <i>ureolyticus</i> puede diferenciarse de la subespecie <i>capitis</i> por su actividad ureasa positiva, por la capacidad para producir ácido de maltosa en condiciones anaerobias, y por los perfiles de ácidos grasos celulares. Desde 1992, esta especie ha sido informada como causa de endocarditis de válvula nativa y de válvula protésica (incluida endocarditis de válvula aórtica), endocarditis asociada con endoscopia superior e implantación de marcapasos. ^{8,202,253,382,475} Se documentó <i>S. capitis</i> como la causa de 17 casos de sepsis en recién nacidos prematuros en estado crítico, incluido un caso de meningitis. ⁴⁸³ En estos casos, todos los aislamientos fueron resistentes a oxacilina, eritromicina y clindamicina. Las cepas de <i>S. capitis</i> aisladas en unidades de cuidados intensivos neonatales también han mostrado heterorresistencia a la vancomicina. ⁴⁶⁶
<i>S. auricularis</i> ²²⁴	Esta especie se encuentra en el conducto auditivo externo humano y rara vez está implicado en infecciones.
<i>S. pasteurii</i> ⁷⁵	<i>S. pasteurii</i> es una especie recién descrita que se encuentra en muestras clínicas animales y humanas y en alimentos. Todavía no ha sido asociada con procesos infecciosos y es similar desde el punto de vista fenotípico a <i>S. warneri</i> . Se han diseñado sondas de oligonucleótidos derivadas de DNA amplificado al azar para su identificación y diferenciación. ⁴⁶⁴
<i>S. caprae</i> ^{97,210}	<i>S. caprae</i> se pensó en un principio que era una especie animal aislada en cabras y en la leche de esos animales. En 1991, fue cultivada de un exudado de un paciente con dermatitis y de la orina de un segundo paciente. ²⁰⁴ Luego, se la aisló en un paciente con endocarditis, dos pacientes con bacteriemia relacionada con el catéter, dos casos de infección urinaria y en hemocultivos de un recién nacido con enfermedad cardíaca congénita. ^{422,462} <i>S. caprae</i> ha sido informado en asociación con infecciones articulares y óseas, incluido un caso de empiema intraarticular posterior a una cirugía artroscópica de rodilla, y como causa de osteomielitis iatrogénica posterior a implantación quirúrgica de materiales ortopédicos. ^{7,102,408} En un estudio de la distribución de las especies <i>Staphylococcus</i> entre las muestras clínicas humanas, <i>S. caprae</i> comprendió el 10,7% de las 1 230 cepas analizadas. ²¹⁰ Se han identificado ribotipos similares en cepas de <i>S. caprae</i> aisladas en leche de cabra y en muestras clínicas, aun cuando las características fenotípicas pueden variar entre los diferentes aislamientos. ²⁶ <i>S. caprae</i> es el más relacionado con <i>S. epidermidis</i> y con las subespecies de <i>S. capitis</i> . ¹³² Las cepas de <i>S. caprae</i> de seres humanos contienen un operón <i>ica</i> de cinco genes que codifica los productos génicos implicados en la formación de la biopelícula. ^{6,7} Los polipéptidos derivados de las secuencias del gen <i>ica</i> muestran 67% a 88% de identidad de aminoácidos con los productos del operón del gen <i>ica</i> similar al encontrado en <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> .
<i>S. cohnii</i> ^{228,391}	<i>S. cohnii</i> fue descrito por primera vez en 1975 y en 1991 se dividió en dos subespecies designadas <i>S. cohnii</i> subesp. <i>cohnii</i> y <i>S. cohnii</i> subespecie <i>urealyticum</i> . ²²⁸ La subespecie <i>cohnii</i> sólo ha sido aislada en seres humanos, mientras que la anterior subespecie <i>urealyticum</i> ureasa positiva ha sido aislada en seres humanos y en primates. Ambas son flora normal de la piel. <i>S. cohnii</i> es un agente oportunista emergente, que ha sido informado como causa de neumonía adquirida en la comunidad, artritis séptica primaria y sepsis relacionada con el catéter en pacientes inmunodeprimidos. ^{3,10,286,287} También se han informado corioamnionitis y sepsis neonatal con meningitis debidas a <i>S. cohnii</i> . ^{211,499}
<i>S. xyloso</i> ³⁹¹	<i>S. xyloso</i> se encuentra en humanos y en primates y ha sido informado como causa de infecciones urinarias altas y bajas y de endocarditis asociada con el uso de drogas intravenosas. ^{83,454} Este microorganismo fue aislado en sangre y bilis de un paciente de 11 años sometido a un trasplante hepático y cardíaco y en un pseudoquistes pancreático en un paciente infectado por HIV. ^{284,285} También se lo aisló en queso y leche de cabra. ²⁹⁷ Las cepas de <i>S. xyloso</i> producen además una lipasa extracelular. ³⁷²
<i>S. saccharolyticus</i> ²¹⁵	Esta especie anaerobia fue en principio llamada <i>Peptococcus saccharolyticus</i> y fue transferida al género <i>Staphylococcus</i> sobre la base del análisis de oligonucleótidos del RNA 16S ribosómico. Se encuentra en las mucosas humanas. Se han informado dos casos de endocarditis (uno que comprometió una válvula cardíaca nativa y el otro, una válvula cardíaca protésica) causados por este microorganismo. ^{241,494}

Recuadro 12-1 Especies de *Staphylococcus* humanas, animales y medioambientales (cont.)

Especie	Comentarios
ESTAFILOCOCOS ENCONTRADOS EN OTROS ANIMALES	
<i>S. intermedius</i> ¹⁵⁶	Esta especie se encuentra como parte de la flora de perros, monos, caballos y gatos y puede causar infecciones cutáneas, urinarias, óseas y del sistema nervioso central en varias especies animales. <i>S. intermedius</i> es el estafilococo coagulasa positivo predominante recuperado de la piel canina normal e infectada y de infecciones caninas graves. ¹³⁶ El portador humano de <i>S. intermedius</i> es raro incluso entre individuos con exposición frecuente a los animales. ^{277,437} Ha sido aislado en personas con heridas por mordedura de perros infectadas y también en individuos con lesiones no infligidas por perros, como infecciones de úlcera de vena varicosa e incisiones de sutura. ^{435,436} Infecciones menores (p. ej., otitis externa) con este microorganismo pueden ocurrir como consecuencia del contacto estrecho no traumático con cáni-dos. ⁴⁴¹ También se ha informado el caso de sepsis por <i>S. intermedius</i> relacionada con el catéter en un paciente de 63 años con cáncer y neumonía por <i>S. intermedius</i> posterior a una cirugía de bypass de arteria coronaria. ^{134,460} <i>S. interme-dius</i> se caracteriza por las pruebas de coagulasa en tubo positivas y factor de aglutinación variable. La coagulasa de <i>S. intermedius</i> es una proteína de 64.6 kDa que induce la formación de coágulo en plasma humano y de conejo, pero no en el de rata o de cobayo. ²³⁴
<i>S. hyicus</i> ⁹⁶	<i>S. hyicus</i> se encuentra en el ganado y en la leche de vaca y se asocia con epidermitis exudativa (síndrome de "cerdo gra-siento"), una enfermedad aguda de las crías de cerdos lactantes y destetados. Las cepas de <i>S. hyicus</i> que causan esta infección de la piel producen tres tipos de toxinas exfoliativas y una enzima lipasa/fosfolipasa extracelular dependiente de calcio que contribuye a la patología de este síndrome. ^{10,372} Aunque no se considera un patógeno para los seres huma-nos, en 1997 se informó un caso de infección de herida humana causada por <i>S. hyicus</i> después de una mordedura de burro. ³²⁷
<i>S. sciuri</i> ²²⁶	<i>S. sciuri</i> está ampliamente distribuido en la naturaleza y ha sido aislado en alimentos, animales de granja, roedores, mar-supiales, mamíferos marinos y, en ocasiones, seres humanos y pequeñas mascotas. Actualmente se reconocen tres subespecies. ^{218,283} <i>S. sciuri</i> subespecie <i>sciuri</i> se encuentra en la naturaleza y como parte de la flora cutánea transitoria en varios mamíferos y especies de aves; rara vez se encuentra en seres humanos y en primates. <i>S. sciuri</i> subespecie <i>carnaticus</i> se encuentra principalmente en huéspedes bovinos y productos derivados de su carne. <i>S. sciuri</i> subespecie <i>rodentium</i> se encuentra sobre todo en los roedores. Las cepas humanas han sido aisladas en heridas, piel, e infecciones de tejidos blandos y, en 1998 se informó un caso de endocarditis debida a <i>S. sciuri</i> . ^{164,283,425} También fue causa de peri-tonitis en un paciente en diálisis. ⁴⁸⁰ Un análisis de 30 aislamientos clínicos humanos de <i>S. sciuri</i> encontró que el 70% eran subespecies <i>sciuri</i> , el 23%, subespecie <i>rodentium</i> y el 7%, subespecie <i>carnaticus</i> . Se observó que todas las subes-ppecies de <i>S. sciuri</i> albergan un homólogo del gen <i>mecA</i> de <i>S. aureus</i> de resistencia a la meticilina y el 46% de las cepas que habían sido examinadas también transportaban el gen <i>mecA</i> que se encuentra en las cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina. ^{84,500} Estos dos <i>mecA</i> homólogos tienen casi 80% de pares de bases similares. Las cepas de <i>S. sciuri</i> que llevan su homólogo <i>mecA</i> natural expresan la resistencia límite a la meticilina, mientras que las cepas que llevan el gen <i>mecA</i> MRSA expresan resistencia heterogénea. <i>S. sciuri</i> produce una variedad de factores sospechosos (p. ej., forma-ción de biopelículas, factor de aglutinación, exotoxinas, DNasa y actividades proteolíticas) pero su contribución a la patogenicidad de este organismo no se ha determinado. ⁴²⁶
<i>S. chromogenes</i> ^{96,137} <i>S. gallinarum</i> ⁹⁷	Esta especie, antes una subespecie de <i>S. hyicus</i> , causa infecciones cutáneas en ganado bovino, cerdos y cabras. ¹¹ Se la encuentra en aves de corral y no es patógena.
<i>S. lentus</i> ³⁸⁹	<i>S. lentus</i> , antes una subespecie de <i>S. sciuri</i> (<i>S. sciuri</i> subespecie <i>lentus</i>) es parte de la flora cutánea normal de ovejas y de cabras.
<i>S. equorum</i> ³⁹⁰	<i>S. equorum</i> es una especie rara de importancia patógena no determinada. Ha sido aislada en caballos, así como en queso y leche de cabra. ²⁹⁷
<i>S. delphini</i> ⁴⁶⁹	Esta especie coagulasa positiva causa lesiones cutáneas purulentas en delfines.
<i>S. felis</i> ^{189,190}	<i>S. felis</i> es la especie de <i>Staphylococcus</i> más comúnmente aislada en gatos, y causa otitis, cistitis, abscesos, heridas y otras infecciones cutáneas.
<i>S. lutrae</i> ¹¹¹	Esta especie, descrita en 1997, fue aislada durante los análisis post mórtem de tres nutrias marinas (<i>Lutra lutra</i>) de las islas Inner Hebrides al oeste del continente de Escocia. Los aislamientos se obtuvieron a partir de los tejidos hepáticos y esplénicos y en una glándula mamaria y un nódulo linfático supramamario. <i>S. lutrae</i> es coagulasa libre positiva y fac-tor de aglutinación negativa y la mayoría está muy relacionada con <i>S. delphini</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. schleiferi</i> y <i>S. muscae</i> . ¹¹¹
<i>S. vitulinus</i> ⁴⁸⁷	Esta especie, descrita en 1994, se encontró como parte de la flora de caballos, ratones silvestres y ballenas piloto (calde-rón). Ha sido aislada en productos cárnicos, entre ellos, de cordero, de pollo, de vaca y de ternera. Estudios de hibrida-ción de DNA muestran que está muy relacionada con <i>S. lentus</i> y <i>S. sciuri</i> . ⁴⁸⁷
<i>S. muscae</i> ¹⁵⁸	Esta especie recién descrita forma parte de una flora transitoria de la superficie corporal de moscas que habitan los esta-blos de vacas, pero no se encuentra en las moscas que habitan las viviendas humanas.

Recuadro 12-1 Especies de *Staphylococcus* humanas, animales y medioambientales (cont.)

Especie	Comentarios
OTROS ESTAFILOCOCOS (EN SU MAYOR PARTE MEDIOAMBIENTALES)	
<i>S. carnosus</i> ³⁸⁸	Esta especie se usa como cultivo iniciador en el procesamiento de carnes como la de salames y salchichas. En la actualidad, se reconocen dos subespecies: <i>S. carnosus</i> subespecie <i>carnosus</i> y <i>S. carnosus</i> subespecie <i>utilis</i> . ³⁵⁷
<i>S. kloosii</i> ³⁹⁰	Esta especie se encuentra en mamíferos y su importancia clínica y estado taxonómico son inciertos.
<i>S. arlettae</i> ³⁹⁰	Esta especie se encuentra en mamíferos y pájaros y su importancia clínica y estado taxonómico son indeterminados.
<i>S. piscifermentans</i> ⁴⁴⁰	Esta especie se encuentra en peces, productos de pescados fermentados y pasta de soja y está muy relacionada con <i>S. carnosus</i> y <i>S. condimenti</i> . ³³⁰
<i>S. condimenti</i> ³⁵⁷	Esta especie se encuentra en la salsa de soja (como <i>S. piscifermentans</i>) y está muy relacionada con las subespecies de <i>S. carnosus</i> .
<i>S. succinis</i> ²⁴⁷	Esta especie, descrita por primera vez en 1998, fue aislada en un fragmento de ámbar dominicano de hace 25 a 35 millones de años. Se asemeja fenotípicamente a <i>S. xylosum</i> y está muy relacionada con <i>S. xylosum</i> , <i>S. saprophyticum</i> , <i>S. equorum</i> y otros estafilococos resistentes a la novobiocina. Una subespecie de <i>S. succinis</i> , <i>S. succinis</i> subespecie <i>casei</i> , ha sido propuesta para cepas aisladas en la superficie de quesos gruyere maduros. ³⁵¹
<i>S. fleurettii</i> ⁴⁷¹	Esta especie ha sido aislada de quesos preparados de leche de cabra.

- Defectos en la muerte intracelular de bacterias seguida de fagocitosis debido a la capacidad para inactivar el sistema oxidasa unido a la membrana, lo que deriva en la ausencia de peróxidos y superóxidos de las vacuolas fagocíticas (p. ej., enfermedad granulomatosa crónica, leucemia linfoblástica y leucemia mieloide crónica y aguda).
- Lesiones cutáneas (p. ej., quemaduras, incisiones quirúrgicas, eccema).
- Presencia de cuerpos extraños (p. ej., suturas, guías intravenosas, dispositivos de prótesis).
- Infección por otros agentes, en particular virus (p. ej., influenza).
- Enfermedad crónica subyacente, como cáncer, alcoholismo y enfermedad cardíaca.
- Administración profiláctica o terapéutica de antibióticos.

En estas circunstancias, *S. aureus* puede causar diversos procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales (recuadro 12-3). Las infecciones cutáneas incluyen foliculitis simple e impétigo (véase lámina en color 12-1A), así como forúnculos y carbunclos que afectan los tejidos subcutáneos y causan síntomas sistémicos, como fiebre. *S. aureus* se aísla con frecuencia en infecciones de heridas posquirúrgicas, que pueden servir como nido para el desarrollo de infecciones sistémicas. La neumonía estafilocócica adquirida en la comunidad suele observarse en individuos ancianos y está asociada con neumonía viral como factor predisponente. La neumonía hospitalaria debida a *S. aureus* se produce en un contexto clínico de pacientes con enfermedad obstructiva crónica e individuos sometidos a intubación y aspiración de secreciones. Las enfermedades malignas subyacentes se reconocen como factores importantes de riesgo para el desarrollo de bacteriemia por *S. aureus*.⁶⁰ La bacteriemia también puede diseminarse en sitios distantes por todo el cuerpo y conducir a endocarditis, osteomielitis, piodartritis, y formación de absceso metastásico, en particular en la piel, el tejido subcutáneo, los pulmones, el hígado, los riñones y el cerebro. La meningitis por *S. aureus*

sucede en pacientes con anomalías en el sistema nervioso central relacionadas con traumatismos, cirugía, neoplasias malignas e hidrocefalia. *S. aureus* es también uno de los muchos microorganismos asociados con peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria continua.³⁴⁷ Sus toxinas son responsables de la necrólisis epidérmica tóxica (síndrome estafilocócico de la piel escaldada) y el síndrome de shock tóxico (véanse recuadros 12-2, 12-3, 12-4). Las cepas de *S. aureus* también pueden causar intoxicación alimentaria debido a la producción de exotoxinas durante su proliferación en alimentos contaminados. *S. aureus* tiene varias propiedades que se cree que contribuyen a su capacidad de enfermar (véase recuadro 12-2). A pesar de que estos factores de virulencia no se encuentran en todas las cepas, este microorganismo continúa siendo una fuente constante de sorpresas porque se descubren nuevas y diferentes propiedades patogénicas. Los factores de virulencia producidos por *S. aureus* se presentan en el recuadro 12-2 y los detalles referentes a los procesos infecciosos asociados con *S. aureus* se enumeran en el recuadro 12-3. La definición de caso de síndrome de shock tóxico se encuentra en el recuadro 12-4.

En un principio, la penicilina fue el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones graves por *S. aureus*. El surgimiento de la resistencia a la penicilina en *S. aureus* se debió a la adquisición de elementos genéticos llevados por plásmidos que codifican la producción de β -lactamasa. Las cepas de *S. aureus* producen hasta cuatro enzimas β -lactamasa diferentes, como se evidenció por los pesos moleculares y la especificidad por el sustrato. En la actualidad, más del 80% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a la penicilina a causa de la acción de esas enzimas β -lactamasas hidrolíticas o penicilinasas. Las penicilinas resistentes a la penicilinasas, semisintéticas (oxacilina y meticilina) son los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones debidas a *S. aureus* resistente a la penicilina. Durante la década de 1980, surgieron las penicilinas resistentes a la penicilinasas. Este tipo de resistencia obedece a la presencia de una proteína de unión a la penicilina alterada llamada PBP2a (o PBP2') que resulta de la adquisición de un

Recuadro 12-2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Factor de virulencia	Comentarios
Polisacáridos capsulares	Algunas cepas de <i>S. aureus</i> producen un exopolisacárido que puede impedir la ingestión del microorganismo por las células polimorfonucleares. Estos exopolisacáridos se han observado al examen con microscopio electrónico de cables de marcapaso, catéteres peritoneales y vías intravenosas infectados por <i>S. aureus</i> y han sido demostrados en forma inmunológica in vitro.¹⁷⁸ Este material puede promover la adherencia de los microorganismos a las células huésped y a los dispositivos protésicos. Las cepas clínicas de <i>S. aureus</i> han sido clasificadas en 11 tipos sobre la base de la inmunotipificación del polisacárido capsular y 70-80% de las cepas de importancia clínica pertenecen al serotipo capsular 5 u 8.^{13,178} La producción de material capsular por <i>S. aureus</i> está influida por diversos factores tanto in vivo como in vitro. En los sistemas de cultivo, la producción de cápsulas está influida por la composición del medio y las condiciones de desarrollo (p. ej., medio líquido o sólido, complejidad del medio).^{89,429} In vivo, se ha demostrado la síntesis de elevados niveles de polisacárido tipo 8 para <i>S. aureus</i> sembrados a partir de lesiones endocárdicas en un modelo murino de endocarditis.²⁵⁷ Mientras que estudios anteriores sugirieron que la cápsula no potenciaba la virulencia, estudios posteriores han indicado que las cápsulas de <i>S. aureus</i> por cierto contribuyen a la patogenicidad y la virulencia estafilocócicas. Karakawa y cols. informaron que las cápsulas elaboradas por las cepas de <i>S. aureus</i> de tipo 5 y tipo 8 eran antifagocíticas.²⁰⁵ En un modelo murino de bacteriemia, la expresión óptima del polisacárido capsular tipo 5 en <i>S. aureus</i> potenciaba la virulencia bacteriana y volvía a los microorganismos resistentes a la muerte opsonofagocítica mediada por los leucocitos.⁴⁴⁶ El tipo capsular 5 también ha mostrado ser un factor de virulencia que contribuye al desarrollo de bacteriemia estafilocócica y artritis en un modelo de ratón, y los anticuerpos adquiridos por inmunización con una "vacuna conjugada" de proteína-polisacárido del tipo 5 eran capaces de proteger contra la infección por <i>S. aureus</i> que expresa ese serotipo capsular en un modelo de endocarditis de rata.^{255,319} Estos dos tipos capsulares, en particular el tipo 8, también están asociados con otros factores de virulencia de <i>S. aureus</i>, como la producción de toxina del síndrome del shock tóxico.²⁵⁶ Además, un número importante de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a oxacilina, la penicilina antiestafilocócica más usada, expresaron el polisacárido capsular de serotipo 5.¹¹³ Los polisacáridos capsulares de los serotipos capsulares 1, 2, 5 y 8 de <i>S. aureus</i> han sido purificados y caracterizados, y los genes que codifican los polisacáridos capsulares tipos 1, 2, 5 y 8 han sido clonados y secuenciados.^{115,263,308,387}
Peptidoglucano y ácidos teicoicos	Las paredes celulares de <i>S. aureus</i> contienen peptidoglucanos (entrecruzamiento de polímeros de <i>N</i>-acetil glucosamina y ácido <i>N</i>-acetil murámico), que son similares a los encontrados en otras bacterias grampositivas, y ácidos teicoicos, que son polímeros de fosfato de ribitol (monosacárido de 5 carbonos) (véase cap. 5). Los ácidos teicoicos actúan en la adherencia específica de las bacterias grampositivas a las superficies mucosas. Además de proveer rigidez y elasticidad a la membrana celular estafilocócica, los peptidoglucanos y los ácidos teicoicos tienen varias actividades biológicas que se piensa que contribuyen a la virulencia.⁴⁷⁸ Estas propiedades incluyen la capacidad de activar el complemento, mejorar la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares, activar la producción de interleucina 1 por los monocitos humanos y estimular la producción de anticuerpos opsonizantes. Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos hacia esas moléculas han sido investigadas por su posible valor diagnóstico o pronóstico; los resultados han sido desalentadores debido al considerable solapamiento de los títulos de anticuerpos entre individuos infectados y no infectados, el amplio espectro de infección y enfermedad causadas por <i>S. aureus</i> y la variabilidad de la respuesta inmunitaria dependiente del huésped debida a la edad, a otras infecciones y a la inmunocompetencia general.⁴⁹² Otras varias proteínas, incluidas adhesinas, proteínas de unión a fibrinógeno, proteínas de unión a colágeno, y factor de aglutinación, se incorporan de modo covalente a la estructura del peptidoglucano de <i>S. aureus</i>.
Proteína A	La pared celular de <i>S. aureus</i> también contiene una proteína llamada proteína A. La proteína A purificada tiene un peso molecular de 42 kDa y se encuentra en la superficie celular y en el medio de cultivo. Esta proteína particular tiene la capacidad de unirse a la región Fc de todas las subclases de IgG humanas excepto IgG₃.¹¹⁰ La proteína A funciona como un factor de virulencia porque interfiere en la opsonización e ingestión de los microorganismos llevada a cabo por los leucocitos polimorfonucleares, activa el complemento y provoca reacciones de hipersensibilidad del tipo inmediatas y tardías.⁴⁷⁸ La proteína A es inmunogénica, y los anticuerpos contra ella se encuentran en individuos con infecciones graves por <i>S. aureus</i>. La presencia de proteína A en <i>S. aureus</i> provee la base para los procedimientos de las pruebas de coaglutinación que se usan en muchos laboratorios clínicos para la identificación de los microorganismos (p. ej., gonococos, agrupamiento estreptocócico) y para la detección de antígenos bacterianos en líquidos corporales.

Recuadro 12-2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* (cont.)

Factor de virulencia	Comentarios
Enzimas	<i>S. aureus</i> produce varias enzimas que contribuyen a su virulencia. La producción de catalasa por estos microorganismos puede funcionar para inactivar el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema de la mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas después de la ingestión de los microorganismos.²⁷⁹ El factor de aglutinación, un material unido a la célula que puede unirse al fibrinógeno, es responsable de la unión de <i>S. aureus</i> a fibrina y fibrinógeno. La coagulasa, que puede existir en forma libre en el medio o unida a la célula, se une a la protrombina y la vuelve enzimáticamente activa, con lo que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina.²⁰⁹ Esta actividad enzimática puede actuar para cubrir las células bacterianas con fibrina, haciéndolas más resistentes a la opsonización y la fagocitosis. Las fibrinolisinas rompen los coágulos de fibrina y facilitan la diseminación de la infección a tejidos contiguos. De modo similar, la hialuronidasa hidroliza la matriz intracelular de mucopolisacáridos ácidos en el tejido y, puede actuar así para diseminar los microorganismos a áreas adyacentes en los tejidos. Se ha encontrado que las cepas de <i>S. aureus</i> que causan forunculosis crónica son productoras de lipasas potentes que pueden ayudar a diseminar los microorganismos en los tejidos cutáneo y subcutáneo.³⁸⁰ Se describió una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol que está asociada con cepas recuperadas en pacientes adultos con síndrome de dificultad respiratoria y coagulación intravascular diseminada.²⁸¹ Los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más sensibles al daño y la destrucción mediante la acción de componentes del complemento bioactivos y productos generados durante la activación del complemento. <i>S. aureus</i> también produce una nucleasa o fosfodiesterasa que tiene actividad de endonucleasa y exonucleasa. Estudios inmunológicos y de especificidad de sustrato indican que <i>S. aureus</i> produce al menos tres tipos diferentes de enzimas β-lactamasa. La producción de estas enzimas puede ser inducible (se producen sólo en presencia de antibióticos β-lactámicos) o constitutiva (se producen en forma continua) y vuelve a estos microorganismos resistentes a la penicilina y a la ampicilina. Los genes que codifican estas enzimas, por lo general, residen en plásmidos (DNA extracromosómico) que también transportan genes para la resistencia a varios antibióticos, como eritromicina y tetraciclina.⁴⁷⁸ Estos genes de resistencia pueden ser transferidos a otras bacterias por transformación y transducción.
Hemolisinas	Las hemolisinas de <i>S. aureus</i> cumplen varias actividades biológicas. La α-hemolisina tiene efectos letales sobre una gran variedad de tipos celulares, incluidos los leucocitos polimorfonucleares y lisan eritrocitos de varias especies animales. Los eritrocitos de conejo son extremadamente sensibles a la lisis por α-hemolisina, y son 100 veces más sensibles que otros eritrocitos de mamíferos y más de 1 000 veces más sensibles que los eritrocitos humanos.³⁴ La toxina es una proteína con un peso molecular de 33 kDa y es segregada en el medio de cultivo durante el crecimiento logarítmico tardío.¹⁴⁶ Los monómeros individuales interactúan en la membrana de la célula diana para formar heptámeros cilíndricos con un poro central.⁴⁵⁸ Los poros abiertos por estos agregados heptaméricos de α-hemolisina permiten la salida rápida de iones de potasio y de otras moléculas pequeñas y el ingreso de iones de sodio y calcio, lo que conduce a la tumefacción osmótica y a la rotura de la célula. La α-hemolisina también es dermonecrótica en inyección subcutánea y letal para animales cuando se administra en forma intravenosa. Estas propiedades contribuyen a la creencia de que esta toxina cumple un papel importante en la patogenia de las infecciones por <i>S. aureus</i>.⁹⁸ La neurotoxicidad también es una propiedad de la α-hemolisina, que causa la desmielinización de las vainas de mielina en modelos de infección en ratones y conejos. Esta toxina es responsable de la zona de hemátis hemolizados observada alrededor de las colonias de algunas cepas de <i>S. aureus</i> que crecen en agar sangre de carnero. La β-hemolisina es una esfingomielinasa (actúa en el complejo esfingomielina lipocarbohidrato) que es activa en una variedad de células. Sin embargo, no es dermonecrótica en los cobayos y no es letal para los ratones.⁹⁸ La β-hemolisina es una exotoxina proteica con un peso molecular de 35 kDa y se segrega en el medio hacia el final de la fase de crecimiento logarítmico.³⁵⁸ La actividad hemolítica requiere iones magnesio y la especificidad de sustrato está restringida a esfingomielina y lisofosfatidilcolina. Es probable que las sensibilidades variables de los eritrocitos de diferentes especies animales a la lisis mediada por β-hemolisina se deba a diferencias en el contenido de esfingomielina de la membrana. La β-hemolisina es una hemolisina "calor-frío"; es decir, sus propiedades hemolíticas se potencian por la exposición ulterior de los hemátis a temperaturas frías. Esta propiedad puede estar causada por la rotura inicial de las fuerzas cohesivas dentro de la membrana por la toxina y la fase posterior de separación dentro de la misma membrana porque la temperatura es más baja. La β-hemolisina, junto con el factor CAMP producido por estreptococos B, es responsable de la hemólisis sinérgica observada en una prueba CAMP positiva para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo B. Las δ-hemolisina y γ-hemolisina se encuentran en algunas cepas de <i>S. aureus</i> y también causan la lisis de diversos tipos celulares. La δ-hemolisina es una proteína con un peso molecular de 3 kDa y se segrega en el medio hacia el final de la fase de crecimiento exponencial. Esta hemolisina es producida por más del 97% de las cepas de <i>S. aureus</i> y también se encuentra en el 50-70% de los estafilococos coagulasa negativos.⁹⁸ La δ-hemolisina actúa en principio como un agente tensoactivo que rompe la membrana celular, y puede interactuar con la membrana para formar canales que con el tiempo aumentan de tamaño, lo que provoca el escape del contenido celular. El término γ-hemolisina describe en la actualidad tres proteínas que, junto con las dos proteínas que componen la leucocidina de Panton-Valentine (PV-leucocidina), constituyen seis toxinas de "dos componentes".^{265,356,431} Las tres proteínas "γ-hemolisina", cada una de las cuales tiene un peso molecular en el rango de 32-35 kDa, interactúan con una de las dos proteínas PV-leucocidina (con pesos moleculares de 32 y 34 kDa) para formar seis combinaciones posibles, todas ellas con actividad biológica. Ninguna de estas cinco proteínas tiene actividad hemolítica o leucotóxica por sí misma. Mientras estas toxinas de dos componentes muestran grados variables de actividad hemolítica, las seis pueden lisar leucocitos en forma eficiente.²³⁵ La actividad leucocítica se ejerce en forma directa en las membranas de los leucocitos polimorfonucleares humanos y causa desgranulación del citoplasma, tumefacción celular y lisis. Estas toxinas actúan mediante la formación de poros, con lo que alteran la permeabilidad celular al potasio y a otros cationes.

(Continúa)

Recuadro 12-2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* (cont.)**Factor de virulencia****Comentarios****Toxinas**

Las toxinas **exfoliatinas** o **toxinas epidermolíticas** son producidas por algunas cepas estafilocócicas y se componen de dos proteínas, designadas ET-A y ET-B, cada una con un peso molecular de 24 kDa.⁴⁷⁸ Las dos moléculas son bioquímicamente e inmunológicamente distintas, pero tienen actividades biológicas similares. ET-A es una proteína termoestable cuyo gen estructural es cromosómico, mientras que ET-B es termolábil y de origen plásmido. Estas proteínas tienen actividad proteolítica y disuelven la matriz de mucopolisacáridos de la epidermis, lo que conduce a la rotura intraepitelial de conexiones celulares en el estrato granuloso.⁴³³ Las cepas que producen una o ambas toxinas son responsables del "estafilocócico de la piel escaldada" (véase lámina en color 12-1B). Se han publicado estudios de PCR para la detección de los genes de las toxinas exfoliatinas.²⁹⁴

Las **enterotoxinas A hasta E, H e I** son moléculas termoestables responsables de las características clínicas de la intoxicación alimentaria estafilocócica, probablemente la causa más común de intoxicación por alimentos en los Estados Unidos. El modo exacto de acción de estas enterotoxinas se desconoce, pero se ha demostrado un aumento del peristaltismo intestinal. La ingestión de enterotoxinas preformadas en alimentos contaminados con desarrollo estafilocócico (p. ej., artículos de panadería, flanes, ensalada de patatas, carnes procesadas, helados) provoca vómitos con diarrea o sin ella dentro de las 2 a 8 horas. Estas afecciones tóxicas se autolimitan (24-48 horas) y sólo requieren terapia de mantenimiento. Los cambios inflamatorios (hiperemia mucosa, infiltrantes por neutrófilos, exudados mucopurulentos duodenales, lesión del ribete en cepillo) se observan en todo el tubo digestivo; las lesiones más graves y extendidas se encuentran en el estómago y en los segmentos altos del intestino delgado.²⁹³ Se han creado métodos inmunológicos y sondas de ácido nucleico para la detección de las exfoliatinas y las enterotoxinas.^{181,317} Los métodos inmunológicos detectan directamente la toxina, mientras que las sondas detectan los genes estructurales dentro de la célula bacteriana que codifican las toxinas. Se describieron métodos de PCR múltiple para la detección de enterotoxinas estafilocócicas.³⁹⁶

Superantígenos

Las **enterotoxinas estafilocócicas** pertenecen a un grupo de toxinas conocidas como superantígenos de toxinas pirógenas, que también incluyen la **toxina-1 del síndrome del shock tóxico** (TSST-1, véase más adelante), las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (SPE A, B, C, F, G, H y J) y el superantígeno estreptocócico.⁴⁴ Todas estas toxinas comparten tres características biológicas: pirogenicidad, superantigenicidad y la capacidad de potenciar los efectos letales de pequeñas cantidades de la endotoxina en conejos más de 100 000 veces. La superantigenicidad se refiere a la capacidad de estas toxinas para estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta sus especificidades antigénicas. Todas estas toxinas inducen la proliferación policlonal de células T mediante la coligación entre las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad en las células presentadoras de antígeno y la porción variable de la cadena β del receptor del antígeno de la célula T.²⁸² El papel de estas enterotoxinas en otras afecciones que no sea la intoxicación alimentaria estafilocócica ha sido confirmado por la complicación documentada de las enterotoxinas A hasta D, H e I con casos de síndrome del shock tóxico (SST) no asociados con menstruación y otros dos síndromes similares al SST llamados escarlatina estafilocócica y descamación eritematosa recalcitrante, respectivamente.^{195,259,393}

Tan pronto como se describió la enfermedad, se postuló que el SST estaba causado por una toxina. En 1981, dos grupos informaron el aislamiento y la caracterización de toxinas singulares producidas por cepas de *S. aureus* de pacientes con SST.^{31,32,394} Estas dos proteínas se designaron exotoxina pirogénica tipo C y enterotoxina F estafilocócica. Estudios posteriores indicaron que ambas eran idénticas y la toxina ahora se denomina toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1). La toxina madura es una proteína pequeña con un peso molecular de 22 kDa que es resistente a la inactivación por calor y enzimas proteolíticas (p. ej., tripsina). Se describió en algunos aislamientos una forma de la toxina con una pequeña diferencia del punto isoelectrónico, pero está codificada por el mismo gen y tiene los mismos efectos biológicos.⁴⁰ Aunque esta toxina tiene un amplio espectro de actividad biológica, su papel en la patogenia del SST no está claro. Como las enterotoxinas, TSST-1 es un superantígeno que puede potenciar la respuesta letal en pequeñas cantidades de endotoxina gramnegativa en modelos animales por desvío de los pasos usuales de procesamiento del antígeno celular mononuclear y la unión directa a monocitos y linfocitos, que deriva en la liberación de linfocinas y monocinas. La liberación sistémica de estas citocinas puede explicar la rápida aparición del compromiso multisistémico observado en el SST. Otros estudios también sugirieron que algunos estafilococos coagulasa negativos pueden producir TSST-1 y se han informado casos de SST debidos a esos microorganismos.^{85,201} Se ha identificado una toxina similar a TSST-1 en cepas de *S. aureus* aisladas en ovejas, cabras y vacas.¹⁷⁷

Se describió una prueba de aglutinación del látex pasiva inversa que usa partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti-TSST-1 para la detección de la producción de toxina in vitro.¹⁸⁸ Esta prueba se realiza sobre diluciones seriadas de cultivos filtrados de aislamientos estafilocócicos. Miwa y cols. crearon un ensayo inmunoanalítico para la detección de TSST-1 en suero de pacientes con SST probado o sospechado.³⁰⁴ Aunque la concentración media de TSST-1 en suero de individuos sanos fue menor de 30 pg/mL, las cantidades medias y máximas detectadas en pacientes SST fueron 440 pg/mL y 5 450 pg/mL, respectivamente. Neill y cols. describieron la síntesis y la aplicación de una sonda oligonucleotídica radiactiva de TSST-1.³¹⁷ Esta sonda híbrida con los genes estructurales bacterianos que codifican TSST-1. Aunque los métodos para la detección de la toxina (p. ej., aglutinación del látex, técnicas de inmunoblot de colonias, inmunoanálisis) dependen de la presencia de TSST-1 en o por encima del nivel de detección del ensayo y de las condiciones apropiadas de desarrollo bacteriano para la producción de la toxina, la sonda detectó la capacidad genética de cepas individuales para producir TSST-1, más allá de la capacidad de esas cepas para producir toxina in vitro.^{188,317} También se describieron métodos basados en PCR para la detección de TSST-1.^{294,305,396}

Recuadro 12-3 Infecciones asociadas con *Staphylococcus aureus*

Infección	Comentarios
Foliculitis	La foliculitis es una infección benigna restringida a los orificios de los folículos pilosos y se caracteriza por la presencia de lesiones dolorosas, rojizas y pequeñas y la ausencia de síntomas sistémicos.
Forúnculos y ántrax	Los forúnculos son piodermas profundos que se presentan como lesiones elevadas, firmes, dolorosas, con centros necróticos que contienen material purulento. El ántrax son lesiones aún más profundas que comprometen los tejidos subcutáneos. Varias lesiones pueden estar presentes y coalescer mediante la formación de senos subcutáneos. El ántrax a menudo está asociado con signos sistémicos de fiebre intermitente.
Impétigo	El impétigo es una infección estafilocócica que se observa mayormente en los niños y por lo general se presenta en áreas expuestas, en especial la cara (lámina en color 12-1B). Las lesiones comienzan como máculas rojas que evolucionan a vesículas que contienen líquido serosanguinolento. Con el tiempo, estas lesiones se secan y forman costras, con una escara color miel sobre un borde eritematoso. <i>S. aureus</i> da cuenta del 80-90% de los casos de impétigo, con el porcentaje restante asociado con estreptococos β -hemolíticos del grupo A. El impétigo causado por estos dos microorganismos es indistinguible desde el punto de vista clínico.
Hidradenitis supurada	Esta afección se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones similares a forúnculos asociadas con las glándulas sudoríparas apocrinas infectadas y bloqueadas. Esta infección cutánea sucede en las áreas intertriginosas (axilas, ingle y áreas perineales). Aunque están presentes el dolor local, edema y eritema, por lo general están ausentes los síntomas sistémicos como fiebre.
Mastitis	La mastitis se refiere a la infección de la mama asociada con el parto y la lactancia y se caracteriza por edema, tumefacción, dureza y en ocasiones eritema de los tejidos mamarios. Los abscesos superficiales se pueden drenar por aspiración con aguja, mientras que las lesiones persistentes, más profundas, requieren incisión y drenaje, a menudo junto con terapia antibiótica.
Infecciones de herida	La mayoría de las infecciones estafilocócicas de heridas suceden en las salas posquirúrgicas y se reconocen por enrojecimiento, tumefacción, dolor y presencia de drenaje serosanguinolento turbio. La indicación para el cuidado de una herida en pacientes con infección estafilocócica depende de la profundidad de la infección, el estado del huésped, la presencia o gravedad de los signos y los síntomas clínicos, y la presencia de cuerpos extraños dentro de la herida. Estos factores determinan la extensión del desbridamiento y la necesidad de quimioterapia antibiótica parenteral.
Bacteriemia y endocarditis	La bacteriemia por <i>S. aureus</i> por lo general sucede en forma secundaria a una infección localizada en otra parte (p. ej., abscesos, úlceras, quemaduras, neumonía) o por acceso directo de los microorganismos en el torrente circulatorio a través de catéteres, otros dispositivos o jeringas usadas para inyección de drogas. ^{60,143,424} Los pacientes con bacteriemia estafilocócica por lo general presentan temblor, escalofríos y fiebre. Puede haber lesiones cutáneas hemorrágicas y evolucionar para formar úlceras necróticas más grandes. Puede estar presente la endocarditis en una forma sutil, o con múltiples signos y síntomas. ^{116,117} Con infección de las válvulas cardíacas pueden estar presentes más manifestaciones hemorrágicas (p. ej., lesiones de Janeway, manchas de Rot y hemorragias en astillas). Pueden observarse soplos cardíacos, roces de fricción pericárdica y derrames pericárdicos y, según el tipo de soplo, a menudo se puede sugerir la ubicación probable del compromiso bacteriano y de la insuficiencia valvular. La ecocardiografía transtorácica y la transesofágica ayudan a delinear la extensión del compromiso cardíaco y a determinar la necesidad y la urgencia de intervenciones quirúrgicas. ¹⁹⁶ La trombocitopenia a menudo está presente y la coagulación intravascular diseminada representa una complicación rara pero mortal que sucede en forma temprana en el curso clínico de la enfermedad. La diseminación hematógena del riñón puede causar insuficiencia renal, abscesos renales y pielonefritis.
Meningitis	La meningitis debida a <i>S. aureus</i> puede suceder como complicación de bacteriemia, debida a trauma local, cirugía o lesión, o colonización de implantes de bombas intratecales. ²⁸ Aunque los signos y los síntomas son similares a los de otras infecciones meníngeas, están presentes con más frecuencia otros cofactores (p. ej., inmunodeficiencia, enfermedad subyacente). ²⁶⁰
Pericarditis	La pericarditis (infección de las membranas que recubren el corazón) debida a <i>S. aureus</i> puede originarse por vía hematógena o en forma secundaria a una infección local de un trauma penetrante de tórax. ³⁷⁶ También puede suceder como complicación de la endocarditis estafilocócica. Los pacientes presentan dolor en el pecho, frote, insuficiencia cardíaca global o mediastinitis.
Infecciones pulmonares	Las infecciones pulmonares causadas por <i>S. aureus</i> pueden originarse por aspiración o diseminación hematógena desde otro sitio. La neumonía por aspiración adquirida en la comunidad suele observarse en ancianos como complicación de la neumonía por influenza, mientras que la intrahospitalaria por lo común es secundaria a la intubación con asistencia ventilatoria. Las radiografías de tórax de estos pacientes pueden mostrar abscesos definidos, infiltrados diseminados o nodulos, consolidación franca o cavitación. En los niños pequeños, se pueden observar neumatoceles de paredes delgadas con niveles de líquido-aire. La infección pulmonar hematógena sucede como complicación de endocarditis del lado derecho y es secundaria a la embolización de lesiones valvulares, con el resultado de infartos pulmonares. En estos pacientes, la radiografía de tórax suele mostrar infiltrados aislados junto con embolia. Las complicaciones de los dos tipos de infección pulmonar son bacteriemia, abscesos pulmonares y empiemas pleurales. ^{32,143}

Recuadro 12-3 Infecciones asociadas con *Staphylococcus aureus* (cont.)

Infección	Comentarios
Osteomielitis/artritis séptica	La osteomielitis por <i>S. aureus</i> en la mayoría de los casos sucede como complicación de una infección local por extensión directa, aunque también puede ocurrir la osteomielitis hematógena. Esta última a menudo compromete los huesos largos en los niños; sin embargo la osteomielitis de la columna vertebral da cuenta de más del 60% de dichas infecciones en adultos. ⁵⁹ Varios tipos de estudios por imágenes, como la resonancia magnética y la tomografía computarizada, son útiles para delinear la extensión del compromiso vertebral y la presencia de abscesos paravertebrales. Los abscesos y las lesiones óseas líticas deben aspirarse y cultivarse para proveer de un diagnóstico definitivo. La osteomielitis asociada con infección contigua suele ser evidente porque la infección ósea es adyacente a una herida traumática o quirúrgica y es más grave cuando se infectan las prótesis de la cadera o de la rodilla. ³⁹⁵ Con los últimos tipos de infección, los materiales implantados a menudo tienen que ser extraídos y reemplazados con la extirpación posterior de los tejidos circundantes infectados o comprometidos. La artritis séptica debida a <i>S. aureus</i> sucede en principio en niños prepúberes y como complicación de bacteriemia en adultos. Por lo general los pacientes presentan una articulación caliente y tumefacta (las más comunes son la rodilla, la cadera, el codo, el hombro y las articulaciones interfalángicas) dolorosa al movimiento. Se requiere la aspiración de la articulación, y la coloración de Gram y el cultivo del exudado purulento para el manejo de la infección.
Piomiositis	La piomiositis es una infección de los músculos esqueléticos que por lo general sucede en forma secundaria a un trauma, a menudo en la vecindad de un foco de infección existente (p. ej., un forúnculo). ³³³ Los pacientes presentan fiebre y dolor muscular; las muestras obtenidas por aspiración y los cultivos detectan <i>S. aureus</i> . La incisión y el drenaje bajo la cobertura de un antibiótico apropiado son determinantes para lograr la curación.
Intoxicación alimenticia estafilocócica	La intoxicación estafilocócica por alimentos es el resultado de la ingestión de alimentos contaminados con cepas de <i>S. aureus</i> que producen enterotoxinas termoestables. Los productos implicados por lo general se contaminan a través de un operario que los procesa, con el subsiguiente desarrollo del microorganismo y la producción de la toxina. Los alimentos implicados incluyen ensalada de patatas, helados, natillas, productos de panadería, alimentos enlatados y carnes procesadas. Los síntomas, como náuseas, vómitos, espasmos abdominales y diarrea, suelen comenzar a las 2 a 6 horas de la ingestión y disminuyen después de 8 a 10 horas. Es característica la falta de fiebre y de signos neurológicos. El tratamiento incluye la reposición del líquido perdido debido a los vómitos y la diarrea y la recuperación es completa.
Síndrome de la piel escaldada estafilocócico	En el síndrome estafilocócico de la piel escaldada se forman lesiones ampollares en áreas extensas del cuerpo con descamación ulterior de las capas superficiales de piel (lámina en color 12-1C). Esto deriva en amplias áreas de piel desprotegida y desnuda. Esta enfermedad a menudo se observa en recién nacidos y lactantes. Las toxinas responsables son antigénicas y los anticuerpos contra ellas son protectores (recuadro 12-2).
Síndrome del shock tóxico estafilocócico	El síndrome del shock tóxico (SST), describe por primera vez por Todd y cols. en 1978, es una enfermedad multisistémica caracterizada por un síndrome clínico que incluye fiebre, hipotensión, vértigo ortostático, eritrodermia (erupción blanquecina) y grados variables de vómitos, diarrea, falla renal, cefaleas, escalofríos, úlceras faríngeas y conjuntivitis.^{160,449,478} Al principio, la enfermedad se notó con más frecuencia en las mujeres, con el inicio durante la menstruación. Los investigadores de los primeros casos notaron una asociación entre el comienzo de la enfermedad y el uso de tampones hiperabsorbibles. Más tarde se informaron casos de SST no asociados con la menstruación tanto en varones como en mujeres, y como complicación de abscesos estafilocócicos, osteomielitis, infecciones de heridas posquirúrgicas y neumonía posinfluenza.³² El papel de TSST-1 y otros superantígenos en la enfermedad también está avalado por la aparición aguda de los síntomas, con congestión vascular que se desarrolla en un período de 1 a 2 días. Con el incremento de las fugas a través de los capilares y la disminución generalizada de la resistencia vascular, hay una pérdida de líquidos intravasculares en los espacios intersticiales. La pérdida de líquidos también se exagera por la presencia de diarrea en algunos pacientes. La pérdida de volumen intravascular conduce a hipotensión e hipoxia tisular. El síndrome de dificultad respiratoria aguda y la coagulación intravascular diseminada son complicaciones comunes de TSS potencialmente mortales.²⁵¹ La TSST-1 parece tener algunos efectos tóxicos directos en los tejidos del miocardio, el músculo esquelético, el hígado y el riñón.⁴⁷⁸ Las afecciones que pueden estar incluidas en el diagnóstico diferencial son otras infecciones mediadas por toxinas (p. ej., síndrome de la piel escaldada, gastroenteritis, escarlatina), infecciones locales con shock y/o dolor abdominal agudo (p. ej., gastroenteritis, salpingitis, aborto séptico e infecciones urinarias agudas), y enfermedades multisistémicas de infecciones (p. ej., shock séptico asociado con neumococos, meningococos o <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b; rubéola, fiebre manchada de las Montañas Rocosas, tífus por garrapatas, leptospirosis, infección por <i>Legionella</i>; toxoplasmosis; y síndromes adenovirales y enterovirales), y etiologías no infecciosas (p. ej., enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso sistémico, fiebre reumática aguda, artritis reumatoide, reacciones a fármacos). El diagnóstico se basa en los signos y los síntomas clínicos de acuerdo con la definición del caso (recuadro 12-4).

Recuadro 12-4 Definición de caso de síndrome de shock séptico estafilocócico³³¹

Manifestación	Comentarios
Fiebre	Temperatura $\geq 38.9^{\circ}\text{C}$
Erupción	Eritrodermia macular difusa
Descamación	1-2 semanas (por lo general 10-14 días) después de la aparición de la enfermedad; en particular en las palmas de las manos, las plantas de los pies, los dedos de manos y pies
Hipotensión	Presión sistólica ≤ 90 mm Hg para adultos o menos del percentilo 5 correspondiente a la edad en menores de 16 años. Caída ortostática de la presión diastólica ≥ 15 mm Hg de cuando un individuo acostado se sienta; síncope ortostático o vértigo ortostático
Compromiso de tres o más sistemas de órganos	
Gastrointestinal	Vómitos o diarreas al inicio de la enfermedad
Muscular	Mialgia grave o creatinincinasa mayor del doble del límite superior normal
Mucosas	Vaginal, orofaríngea o hiperemia conjuntival
Renal	Nitrógeno ureico en sangre (BUN) o creatinina sérica mayores de dos veces el límite superior normal para el laboratorio o sedimento urinario con piuria (≥ 5 leucocitos por campo de gran aumento) en ausencia de infección urinaria
Hepático	Niveles de bilirrubina total, alanina aminotransferasa o aspartato aminotransferasa al menos el doble del límite superior normal para el laboratorio
Hematológico	Recuento de plaquetas ($< 100\,000/\text{mm}^3$)
SNC	Desorientación o alteraciones en la conciencia sin signos neurológicos focales cuando no hay fiebre e hipotensión
Criterios de laboratorio	
Resultados negativos en las siguientes pruebas	
Cultivos de sangre, faringe y líquido cefalorraquídeo (los hemocultivos pueden ser positivos para <i>S. aureus</i>)	
Pruebas serológicas para fiebre manchada de las Montañas Rocosas, leptospirosis y sarampión	
CLASIFICACIÓN DEL CASO	
Confirmado	Caso en el que los seis hallazgos clínicos mencionados antes se encuentran presentes
Probable	Caso en que hay cinco de los seis hallazgos clínicos mencionados antes
Hallazgos adicionales de laboratorio patognomónicos para SST, pero no incluidos en la definición del caso	
Aislamiento de <i>S. aureus</i> en una mucosa o un sitio del cuerpo normalmente estéril	
Producción de TSST-1 por un aislamiento estafilocócico incriminado o en una toxina alternativa conocida que cause SST	
Sensibilidad serológica a la toxina pertinente en el momento de la enfermedad aguda	
Desarrollo de anticuerpos para la toxina pertinente durante la convalecencia	

gen cromosómico llamado *mecA*. PBP2a tiene baja afinidad por todos los antibióticos β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas. Una vez que las PBP presentes normalmente han sido inactivadas por un antibiótico β -lactámico, la PBP2a continúa actuando y permite la síntesis de una estructura peptidoglucano estable, lo que le posibilita proliferar y dividirse. Las cepas de *S. aureus* que expresan el determinante *mecA* se llaman SARM (*S. aureus* resistente a la meticilina). El gen *mecA* puede expresarse por algunas o por todas las células en una población dada, de modo que la resistencia mediada por las PBP alteradas se denomina **heterorresistencia**. El determinante *mecA* de *S. aureus* heterorresistente también se encuentra en los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina y contiene varios elementos genéticos involucrados en la expresión y la regulación de la resistencia a los β -lactámicos y a otras clases de antibióticos. Por esta causa, los estafilococos resistentes a la oxacilina también tienden a serlo a otros antibióticos, como clindamicina y eritromicina. La resistencia a la oxacilina y a otras penicilinas resistentes a la penicilinas también se puede observar en cepas de *S. aureus* que carecen del determinante *mecA*. En esos casos, la resistencia se debe a "hiperproducción" de enzimas β -lactamasa, cuyo resultado es

una hidrólisis lenta de las penicilinas semisintéticas y resistencia meticilina/oxacilina en el límite.

Los SARM representa un desafío para todas las instituciones sanitarias y se han elaborado pautas con respecto a cómo manejar y controlar su diseminación dentro de ellas.^{46,490-491} Algunos hospitales han instituido cultivos nasales sistemáticos para el personal a fin de detectar y tratar a los portadores de SARM con el objeto de reducir el número de pacientes expuestos y, como consecuencia, las infecciones institucionales. Aunque SARM fue en sus orígenes un patógeno hospitalario, ahora queda claro que los individuos dentro de la comunidad y fuera de los establecimientos sanitarios también están en riesgo de adquirirlo. Los informes iniciales de infecciones por SARM adquiridas en la comunidad reflejaron ciertas circunstancias y conductas de riesgo responsables, como el consumo de drogas intravenosas, los tratamientos antibióticos en pacientes ambulatorios, las hospitalizaciones previas y las enfermedades subyacentes graves.³⁸⁵ Sin embargo, ahora se están observando infecciones por SARM en comunidades y poblaciones que no reflejan esas conductas o factores de riesgo. En un estudio llevado a cabo en la Yale University School of Medicine, el 41% de 87 pacientes con SARM habían adquirido la infección en la

comunidad.²⁵⁴ La adquisición del microorganismo se asoció con los factores de riesgo mencionados con anterioridad; la residencia en un sanatorio fue un factor de riesgo adicional; ocho pacientes (22%) no tuvieron factores de riesgo identificables para las infecciones.

Con el surgimiento de la resistencia a las penicilinas resistentes a la penicilinas, el glucopéptido vancomicina se volvió el tratamiento de elección para las infecciones debidas al SARM. Sin embargo, en mayo de 1996 se informó desde Japón la primera infección causada por una cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina.^{66,175} Más tarde, se aislaron cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina en pacientes vistos en Michigan, estado de Nueva York, Nueva Jersey e Illinois.^{67,68,374,417} A estas cepas se les asignó la mnemotecnia "GISA" (*glycopeptide-intermediate S. aureus*) porque tienen sensibilidad disminuida a los antibióticos glucopéptidos, vancomicina y teicoplanina; en los Estados Unidos, el nombre más usado para estas cepas es "VISA" (*vancomycin-intermediate S. aureus*).⁴⁴⁴ Estas cepas tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para vancomicina de 8 µg/mL. El Clinical Laboratories Standards Institutes, CLSI (Instituto de estándares para los laboratorios clínicos, antes llamado NCCLS) define "sensibles" a los estafilococos que requieren concentraciones de vancomicina ≤ 4 µg/mL para la inhibición del desarrollo; intermedios, a los que requieren de 8 a 16 µg/mL y resistentes, a los que requieren ≥ 32 µg/mL.³¹⁶ En 2002, se informaron dos cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (CIM, ≥ 32 µg/mL) desde Michigan y Pensilvania, y, en 2004, se informó el tercer aislamiento clínico documentado desde Nueva York.⁶⁹⁻⁷¹ La sensibilidad reducida a la vancomicina encontrada en estas cepas no se detecta de modo confiable por métodos de sensibilidad rápidos, automatizados o de difusión en disco (paneles rápidos Microscan®, Vitek®).⁴⁴⁵ El método de prueba de sensibilidad más exacto para la detección de estas cepas es un método CIM no automatizado, como la microdilución en caldo o la dilución en agar con 24 horas completas de incubación. La recomendación actual para los laboratorios que usan métodos de sensibilidad automatizados es inocular el microorganismo en una placa de cribado para sensibilidad de vancomicina, que contenga agar infusión de cerebro y corazón (BHI) y 6 µg/mL de vancomicina, e inspeccionar la placa para observar el crecimiento después de 24 horas completas de incubación. Todas las cepas con CIM para vancomicina de 8 µg/mL crecerán en esas placas de cribado. Los que crecen en las placas deben probarse luego mediante un procedimiento de microdilución en caldo. Sobre la base de un estudio comparativo, un Etest® (AB Biodisk, Piscataway, NJ) realizado en agar de Mueller-Hinton con un inóculo preparado a partir de una suspensión equivalente a la número 2 de McFarland e incubada por un período de 24 horas completas también es un método específico y sensible para la detección de esas cepas; con Etest, las cepas VISA tienen una CIM para vancomicina ≥ de 6 µg/mL.⁴⁸¹ De acuerdo con los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), se deben reunir tres criterios para verificar que una cepa dada es una VISA: CIM de 8 a 16 µg/mL para vancomicina en microdilución en caldo; de 6 µg/mL para vancomicina con Etest y desarrollo dentro de las 24 horas en una placa de agar BHI que contiene 6 µg/mL de vancomicina.^{444,445} La detección exacta y apropiada y la confirmación de estas cepas es necesaria y crítica para el tratamiento óptimo de los pacientes individuales y para evitar la transmisión de estas cepas a otros enfermos.⁴⁹⁰

El aislamiento de *S. aureus* con sensibilidad reducida confirmada o resistencia franca a la vancomicina se debe informar al

personal del control de infecciones dentro de la institución, a los departamentos de salud locales y del estado, y a los CDC. La determinación de enfoques terapéuticos óptimos para pacientes individuales puede requerir otras pruebas de laboratorio (p. ej., estudios de sinergismo, estudios con placas de microdilución, curvas de muerte-tiempo, etc.) porque existe evidencia de que las cepas *S. epidermidis* resistentes a la metilicina, VISA, SARM y *S. haemolyticus* resistente a la vancomicina pueden responder de modo sinérgico a las combinaciones de vancomicina con otros β-lactámicos.⁷⁸ En el capítulo 16 se presenta más información respecto de otros mecanismos de resistencia (p. ej., resistencia a eritromicina y clindamicina) y pruebas de sensibilidad de los estafilococos a los antibióticos.

S. aureus subespecie *anaerobius* provoca la formación de abscesos en ovejas y no ha sido aislado en infecciones humanas o de muestras clínicas.⁹⁴

Estafilococos coagulasa negativos

En el pasado, los estafilococos coagulasa negativos eran considerados por lo general contaminantes con escasa importancia clínica. Sin embargo, durante las últimas cuatro décadas se los reconoció como agentes importantes de enfermedades humanas. Aunque se describieron varias especies diferentes de estafilococos coagulasa negativos (véase recuadro 12-1), muy pocas de ellas causan infecciones en los seres humanos. No obstante, como muchos laboratorios intentan identificar los estafilococos coagulasa negativos, las infecciones causadas por otras especies se están reconociendo cada vez con mayor frecuencia. Los tipos de infecciones asociadas con los estafilococos coagulasa negativos se enumeran y se describen en el recuadro 12-5.

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

Cuando los hallazgos clínicos se correlacionan con el hallazgo de estafilococos coagulasa negativos, *S. epidermidis* es por mucho el microorganismo aislado con más frecuencia y da cuenta del 50% hasta más del 80% de los aislamientos.¹⁴ Casi todas las infecciones causadas por *S. epidermidis* son adquiridas en hospitales, excepto la endocarditis de válvula nativa y las infecciones de dispositivos de acceso venoso semipermanentes. Además de la endocarditis de válvula nativa y de prótesis valvular, *S. epidermidis* ha sido aislado y documentado como patógeno en infecciones urinarias, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones de varios dispositivos de prótesis, infecciones de derivación de líquido cefalorraquídeo (LCR), infecciones relacionadas con diálisis peritoneal e infecciones oftálmicas (véase recuadro 12-5). Durante los últimos años, se han progresado en la identificación de varios factores de virulencia en *S. epidermidis*. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido y los análisis inmunológicos de cepas de *S. epidermidis* de infecciones de dispositivos médicos colonizados han mostrado que esas bacterias producen macromoléculas de superficie y extracelulares que inician y luego mejoran la adhesión bacteriana a las superficies plásticas de cuerpos extraños para formar una biopelícula. En un principio, la adherencia específica de la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* a superficies plásticas parece ser mediada en gran parte por un polisacárido-adhesina llamado **PS/A**.^{310,450} PS/A es una molécula de poliglucosamina con enlaces β-1,6, N-succinilada de forma variada, de elevado peso molecular, codificada por el locus *ica* del genoma de *S. epidermidis*.²⁹¹ PS/A purificada puede bloquear la adherencia de *S. epidermidis* productor

Recuadro 12-5 Infecciones asociadas con *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos

Infección	Comentarios
Infecciones urinarias	Entre los estafilococos coagulasa negativos, <i>S. saprophyticus</i> es un patógeno real de las vías urinarias, que causa infecciones urinarias altas y bajas, principalmente en mujeres jóvenes. Varios estudios han encontrado que es la segunda causa más común de infecciones urinarias después de <i>Escherichia coli</i> y representan el 11-32% de esas infecciones en mujeres de consulta externa. ^{182,252,378} Otros estafilococos coagulasa negativos son causas raras de infecciones urinarias, y casi el 80-90% de esas infecciones son causadas por <i>S. epidermidis</i> . ²⁶² Las infecciones urinarias debidas a <i>S. epidermidis</i> y a otros estafilococos coagulasa negativos están por lo general asociadas con catéteres y se producen en pacientes ancianos, con anterior instrumentación del tracto urinario, o cirugías, trasplante renal, urolitiasis u otras anormalidades urológicas. ²⁶² La piuria y las afecciones urinarias altas significativas se observan por lo general en sólo el 10% del último grupo de pacientes. Las cepas coagulasa negativas de estos pacientes a menudo son adquiridos en el hospital y son multirresistentes.
Osteomielitis	La osteomielitis debida a estafilococos coagulasa negativos puede ocurrir como una complicación de la cirugía cardiotorácica y por la implantación de materiales protésicos, como prótesis de rodilla y de cadera. La cirugía cardiotorácica puede conducir a una herida esternal y a infecciones óseas que pueden requerir desbridamiento quirúrgico. ^{148,208} Las infecciones asociadas con prótesis se diagnostican por examen directo y cultivo de aspirados con agujas del sitio afectado, por biopsia ósea o por retiro y cultivo del material implantado. La osteomielitis hematógena puede resultar de bacteriemia con estafilococos coagulasa negativos que se originan en infecciones de derivaciones de otros dispositivos protésicos.
Endocarditis de válvula nativa	Los estafilococos coagulasa negativos rara vez son la causa de endocarditis relacionadas con marcapasos o con válvula nativa y dar cuenta del 5% de todos los casos. ⁵⁸ La patogenia compromete la colonización de las válvulas cardíacas dañadas con anterioridad o del endocardio durante la bacteriemia transitoria. Más de la mitad de los pacientes con esta infección tienen complicaciones, como insuficiencia cardíaca congestiva o fenómeno embólico. Casi la mitad de estas infecciones involucran a estafilococos coagulasa negativos además de <i>S. epidermidis</i> . Otras especies, como <i>S. lugdunensis</i> , han sido informadas como causa poco común de endocarditis grave, con destrucción valvular masiva. ⁴⁶¹
Endocarditis de válvula protésica	La diferencia de lo que sucede en las endocarditis de válvula nativa, los estafilococos coagulasa negativos son los agentes etiológicos más comunes de la endocarditis de válvula protésica, y <i>S. epidermidis</i> es la especie aislada con mayor frecuencia, casi con exclusión de todas las otras. ^{14,206} En esta infección, los microorganismos infectan el anillo de las suturas que sostienen la válvula en su lugar, causando la formación de microabscesos que están relativamente protegidos de los antibióticos. ⁵⁵ El paciente por lo general presenta fiebre y evidencia de disfunción valvular. Las complicaciones son dehiscencia de la válvula, obstrucción de la válvula debida a la formación de vegetaciones protuberantes y, en ocasiones, disritmia cardíaca. Como la mayoría de estas infecciones se deben a la inoculación de un pequeño número de microorganismos en el sitio y en el momento de la colocación de la válvula, los síntomas de endocarditis aparecen lentamente después de varios meses. ^{55,206} Además de las válvulas protésicas, los estafilococos también pueden infectar hilos de marcapasos e injertos vasculares. ¹⁷
Infecciones de catéteres intravenosos	<i>S. epidermidis</i> es el aislamiento más común que infecta catéteres intravenosos. ³⁶² Los tipos de catéteres implicados incluyen las vías intravenosas periféricas y centrales, catéteres de hiperalimentación central, catéteres de hemodiálisis subclavia, vías centrales de Hickman y Broviac, y catéteres de Swan-Ganz. ^{266,355} Los catéteres infectados pueden ser el origen de las bacteriemias, que pueden colonizar sitios distantes para crear otras complicaciones infecciosas. ⁷⁷ Los catéteres infectados y los sitios de inserción del catéter a menudo no parecen infectados (p. ej., puede no haber eritema o purulencia) y la bacteriemia relacionada con catéteres puede ser muy poco sintomática. Aunque los cuidados asiduos de los catéteres pueden disminuir la incidencia de estos episodios bacteriémicos, otras innovaciones, como los catéteres impregnados en antibióticos (rifampicina o minociclina) parecen disminuir de manera significativa la incidencia de estas infecciones. ⁸⁸ El tratamiento incluye la extracción del catéter, si es posible, junto con terapia antibiótica sistémica. Los estudios de las infecciones relacionadas con catéter y las bacteriemias incluyen hemocultivos de sangre periférica, sangre extraída del catéter y, a menudo, cultivo del catéter. ^{81,266}
Infecciones de derivación de LCR	<i>S. epidermidis</i> es la causa más común de infección asociada con derivación de LCR, catéteres de LCR, bombas intratecales y sitios de ventriculostomía. ^{288,478} Estas infecciones por lo general suceden a pocas semanas de la colocación de la derivación, pero también pueden ocurrir durante otras manipulaciones. ²⁴⁹ Los pacientes con infecciones de la derivación de LCR pueden estar asintomáticos, aunque algunos pueden presentar síntomas de meningitis. El análisis del LCR aspirado puede mostrar pleiocitosis moderada y los niveles de glucosa pueden ser normales o estar un poco disminuidos. A menudo es necesaria la extracción de la derivación para el efecto curativo, aunque algunas infecciones estafilocócicas han sido tratadas con eficacia con antibióticos solos. ^{118,482} Los antibióticos usados son vancomicina, rifampicina y una aminoglucósido administrado intraventricularmente, debido a que estas infecciones adquiridas en los hospitales son causadas por estafilococos resistentes a las penicilinas semisintéticas (p. ej., oxacilina, meticilina). ¹⁴²

(Continúa)

Recuadro 12-5 Infecciones asociadas con *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos (cont.)

Infección	Comentarios
Infecciones asociadas con catéteres de diálisis peritoneal	<i>S. epidermidis</i> es el microorganismo aislado con mayor frecuencia de pacientes con peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC). ^{18,409,493} La peritonitis se caracteriza por dolor abdominal, náuseas, vómitos, fiebre y un efuyente turbio después de la diálisis, aunque muchos pacientes pueden tener síntomas escasos o moderados. El líquido peritoneal puede aparecer turbio y contener > 100 leucocitos por mililitro. Las tinciones de Gram del líquido no concentrado pueden ser negativas y se requiere centrifugación o filtración para recuperar el escaso número de microorganismos. ⁹² La terapia con antibióticos de las peritonitis estafilocócicas asociadas con DPAC puede administrarse de forma parenteral, oral o intraperitoneal y por lo general incluye oxacilina o metilicina, cefalosporinas, aminoglucósidos, vancomicina o trimetoprim-sulfametoxazol. ²⁴²
Infecciones de injerto vascular	Las infecciones de injertos vasculares muy a menudo son causadas por <i>S. epidermidis</i> . Muchos de estos injertos se colonizan con un pequeño número de microorganismos en el momento de la colocación del injerto y las infecciones pueden no aparecer clínicamente hasta meses o incluso años más tarde. ^{321,499} Las cepas estafilocócicas aisladas en estas infecciones son multiresistentes, lo que sugiere que las infecciones se deben a la presencia de microorganismos contaminantes en los propios injertos.
Bacteriemia	En la actualidad en la mayoría de los centros médicos <i>S. epidermidis</i> es el agente causal más común de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos. ^{77,109,353} Estos microorganismos alcanzan el torrente circulatorio mediante los dispositivos de acceso vasculares infectados. ³⁶² Los pacientes en los que desarrolla bacteriemia estafilocócica relacionada con catéteres suelen tener dispositivos de acceso múltiples ubicados para el tratamiento de cáncer o para la administración de agentes quimioterapéuticos para el trasplante de médula ósea. ⁴⁷⁷ Otras especies de estafilococos coagulasa negativos también han sido asociadas con bacteriemia en huéspedes inmunodeprimidos.
Infecciones pediátricas	La mayoría de las infecciones pediátricas son bacteriemias estafilocócicas hospitalarias que suceden en las unidades de cuidados intensivos neonatales. ⁹ Estas infecciones están asociadas con prematuridad, presencia de vías centrales o periféricas colonizadas, asistencia ventilatoria y administración de nutrición parenteral total. ¹²⁰ Aunque la mayoría de los microorganismos estafilocócicos en tales infecciones son <i>S. epidermidis</i> , también han estado involucradas otras especies (p. ej., <i>S. haemolyticus</i>). ²⁷¹
Infecciones oculares	<i>S. epidermidis</i> es el patógeno implicado con más frecuencia que causa endoftalmitis posquirúrgica. Los procedimientos quirúrgicos asociados con estas infecciones incluyen el implante de cristalino y las cirugías de cataratas. ⁴⁸⁶ El diagnóstico se hace por aspiración y cultivo del humor vítreo. El tratamiento de la endoftalmitis por <i>S. epidermidis</i> requiere la administración parenteral e intraorbital de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, rifampicina o vancomicina). Se han informado otras infecciones oculares de importancia clínica, como blefaritis, conjuntivitis purulenta y queratitis supurada que involucran a <i>S. epidermidis</i> y a otras especies coagulasa negativas (<i>S. warneri</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. lugdunensis</i> y <i>S. xylophilus</i>). ³⁴⁸
Infecciones cutáneas	Los estafilococos coagulasa negativos pueden ser aislados en diversas lesiones cutáneas (quistes, carbunclos, forúnculos), ya sea solos o junto con otras bacterias piógenas, incluidos <i>S. aureus</i> y estreptococos β-hemolíticos. Las especies más comúnmente implicadas son <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. lugdunensis</i> y <i>S. hominis</i> . ⁴ Entre las infecciones cutáneas inusuales que involucran a <i>S. epidermidis</i> se incluye la otitis externa maligna. ⁴¹⁸

de PS/A a los catéteres plásticos in vitro y los anticuerpos dirigidos contra PS/A parecen bloquear, además, la adherencia a los biomateriales. También protege a los microorganismos de la muerte fagocítica mediada por complemento.^{310,406,407} Se describieron otros polisacáridos de la superficie celular que pueden contribuir con este proceso.²¹ Además, ciertas proteínas pueden actuar para promover la adherencia a los plásticos en algunas cepas de *S. epidermidis*.^{168,184,448} Por ejemplo, Heilmann y cols. identificaron una adhesina-autolisina codificada por un gen llamado *atlE* que funciona en conjunto con PS/A en la adherencia inicial de *S. epidermidis* a los biomateriales.¹⁶⁸

Después de la adhesión inicial a los biomateriales, la patogenia de la infección por *S. epidermidis* parece involucrar la adhesión entre células fijadas a la superficie plástica y forman la base de la matriz de la biopelícula de polisacárido/célula bacteriana.¹⁵ La adhesión intercelular está mediada por un polisacárido llamado **PIA** (adhesina intracelular polisacárido) jun-

to con algunas otras proteínas asociadas con la célula.²⁷⁴ PIA es un polisacárido lineal compuesto por residuos de β-1,6 2-desoxi-2-amino-D-glucopiranosilo, de los cuales 80-85% están N-acetilados y cargados positivamente o modificados con residuos fosfato o succinato y cargados negativamente.²⁷³ Como los de PS/A, los genes estructurales de PIA también residen dentro del operón cromosómico para cuatro genes llamado *ica*; los cuatro genes son *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*.^{133,169,291} PIA también parece funcionar como una hemoaglutinina, ya que los anticuerpos anti PIA y PIA purificada pueden inhibir la hemoaglutinación. Por lo tanto, los mutantes deteriorados en la síntesis de PIA por manipulaciones genéticas también pierden la capacidad para aglutinar hematíes de varias especies.^{108,275} El papel de PS/A, PIA y otros posibles factores de virulencia de *S. epidermidis* en la iniciación y síntesis de biopelículas en biomateriales está sustentado en estudios con modelos animales con cepas mutantes que carecen de la capacidad de sintetizar

esas moléculas y por inhibición de esas interacciones por anticuerpos específicos.^{275,379,506} Usando un modelo de cuerpo extraño murino y un modelo de infección asociada con un catéter venoso central de rata, Rupp y cols. mostraron que la cepa de *S. epidermidis* tipo silvestre era mucho más capaz de causar formación de abscesos, más difícil de ser erradicada por las defensas del huésped y más adherente a los plásticos implantados que una cepa mutante PIA negativa isogénica.^{379,380} Estudios genéticos también avalan la indicación de que el locus *ica* de *S. epidermidis* codifica proteínas que pueden sintetizar PS/A, que está relacionada desde el punto de vista químico con PIA, pero que se distingue de ésta por el tamaño molecular, las propiedades biofísicas y la presencia de grupos succinato en la mayoría de los grupos amino de los residuos glucosilina que constituyen el polímero. Sin embargo, es improbable que PS/A y PIA sean los únicos factores que participan en la colonización y la formación de biopelículas en biomateriales como los catéteres plásticos. En efecto, se ha identificado una proteína extracelular de 140 kDa que cumple un papel en la acumulación de la biopelícula, aunque este papel todavía no se ha definido.¹⁸⁴

Otro mecanismo de adhesión utilizado por *S. epidermidis* involucra interacciones específicas con varios componentes del plasma, suero y tejidos del huésped, entre ellas las proteínas del tejido conectivo, como colágeno y laminina, y las proteínas derivadas del suero, como fibronectina y vitronectina.^{173,307,335,505} Tales interacciones pueden constituir los pasos iniciales de la colonización del tejido y del establecimiento de las infecciones en ausencia de cuerpos extraños, como catéteres o derivaciones. También se ha detectado una proteína de unión al fibrinógeno, llamada fbe, en la superficie de las cepas de *S. epidermidis*.³²⁰ La proteína de unión al fibrinógeno purificada inhibió por completo la adherencia de *S. epidermidis* al fibrinógeno inmovilizado, también se encontró que los anticuerpos contra la proteína bloquean en forma eficiente la adherencia.³³⁸ El gen que codifica esta proteína (el gen *fbe*) ha sido clonado y secuenciado; esta proteína muestra homología parcial con dos de los tres tipos de factores de aglutinación producidos por *S. aureus*.^{43,100,338}

Se han identificado otros posibles factores de virulencia para otras capacidades patogénicas atribuidas a *S. epidermidis*. Algunas cepas producen una enzima modificadora del ácido graso que inactiva los ácidos grasos bactericidas esterificándolos con colesterol, inactivan los ácidos grasos y permiten a *S. epidermidis* vivir en la piel durante períodos prolongados.^{72,73} Algunas cepas de *S. epidermidis* también producen lipasas, que pueden cumplir un papel en la colonización de la piel, la formación de biopelículas y la iniciación de infecciones cutáneas.⁴¹¹

Aunque por lo general no se considera un factor que contribuya a la virulencia, el reconocimiento de la creciente resistencia a los antibióticos de las cepas de *S. epidermidis* es una característica emergente preocupante.^{360,416} Durante los últimos años ha surgido la resistencia de los estafilococos coagulasa negativos a muchas clases de antibióticos, incluida la resistencia a las penicilinas resistentes a la penicilinas (oxacilina, meticilina). El uso cada vez mayor de vancomicina ha llevado al surgimiento de estafilococos coagulasa negativos con sensibilidad disminuida a la vancomicina.⁴¹⁰ Esto se observó primero en *S. haemolyticus*, pero también ocurrió en menor medida en cepas clínicas de *S. epidermidis*.⁴⁰⁹ Aunque los informes de cepas de *S. epidermidis* resistentes a la vancomicina aparecen entre mediados y fines de la década de 1980, no se proveyó la información clínica de esas cepas.⁴⁰² Sin embargo, en 1991, se aisló en Inglaterra una cepa de *S. epidermidis* resistente a la

vancomicina en un paciente con peritonitis.³⁸⁴ Cinco años después, se informó *S. epidermidis* resistente a la vancomicina en varios pacientes de la República Soviética.²³⁹ En 1999, se informó el primer caso de bacteriemia debida a *S. epidermidis* con sensibilidad disminuida a la vancomicina en los Estados Unidos.¹²⁴ La paciente era una mujer de 49 años con carcinoma de vesícula biliar que había recibido vancomicina y varios otros antibióticos a causa del curso clínico complicado de la enfermedad. Se aislaron dos cepas de *S. epidermidis* algo diferentes en sangre periférica y en sangre extraída del catéter venoso central. Una fue sensible a la vancomicina (CIM, 4 µg/mL), mientras que la otra tuvo sensibilidad intermedia (CIM, 8 µg/mL). Aunque ambos aislamientos resultaron sensibles en las pruebas de difusión en disco (tamaño de las zonas, 16-17 mm), las pruebas para CIM con el panel MicroScan Pos Combo®, E test® y dilución en caldo confirmaron la CIM elevada para la segunda cepa. El escaso rendimiento del método de difusión en disco llevó a estos investigadores a recomendar las determinaciones de CIM cuando se pruebe la sensibilidad de los estafilococos a la vancomicina, en particular cuando la bacteria se haya aislado en muestras corporales como sangre y otros líquidos corporales normalmente estériles.¹²⁴

STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS* SUBESPECIE *SAPROPHYTICUS

La especie de *S. saprophyticus* coagulasa negativa merece una mención especial, porque se ha comprobado que este patógeno causa infecciones urinarias en mujeres jóvenes sanas sexualmente activas.^{182,252,398} En 1996, se caracterizó una subespecie nueva entre cepas resistentes a la novobiocina, coagulasa negativas recuperadas del 7% en cultivos nasales de vacas sanas.¹⁵⁹ Las características fenotípicas, los análisis de ácidos grasos y de la pared celular, y los estudios de parentesco genético mostraron que esas cepas eran similares pero distintas de las de *S. saprophyticus* aisladas en seres humanos. Estas cepas bovinas fueron llamadas *S. saprophyticus* subespecie *bovis*, mientras que las cepas humanas ahora se llaman *S. saprophyticus* subespecie *saprophyticus* (de aquí en adelante mencionado como *S. saprophyticus*).

En las mujeres jóvenes y en las adolescentes, *S. saprophyticus* es la segunda causa más común de cistitis no complicada después de *Escherichia coli*.^{153,293,398} En muestras de orina de esas pacientes, el microorganismo suele estar presente en cantidades menores de 100 000 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, pero en muestras seriadas de pacientes infectadas de microorganismo se confirma. Las pacientes a menudo presentan disuria, piuria y hematuria. Las infecciones urinarias altas (pielonefritis) pueden observarse en el 41-86% de los pacientes y, a veces, puede haber bacteriemia por *S. saprophyticus* como complicación urinaria alta.^{137,258} Este microorganismo ha sido implicado como causa de infecciones urinarias y de uretritis en hombres y mujeres (síndrome uretral agudo), infecciones urinarias asociadas con catéteres vesicales, prostatitis en varones mayores y rara vez bacteriemia, sepsis y endocarditis.^{33,137,207,315,412} Se demostró que *S. saprophyticus* causa infecciones urinarias sintomáticas agudas en niños, niñas y adolescentes en ausencia de anomalías estructurales del aparato urinario.^{2,451} En 1999, Hell y cols. informaron el aislamiento de *S. saprophyticus* como causa de neumonía de origen hospitalario.¹⁷⁰

También se ha investigado la fuente de *S. saprophyticus* en la patogenia de las infecciones urinarias. Rupp y cols. estudiaron la prevalencia de la colonización urogenital en 276 mujeres y encontraron que el recto fue el sitio de colonización por *S.*

saprophyticus más frecuente (40%), seguido de la uretra (30%), la orina (20%) y el cuello uterino (10%).³⁷⁸ En este estudio, el seguimiento durante casi 7 meses de las mujeres colonizadas no reveló ninguna progresión a infección urinaria sintomática por *S. saprophyticus*. En otro estudio de 14 mujeres con infección urinaria por *S. saprophyticus*, se encontró el mismo aislamiento en las heces de 6 mujeres, lo que sugiere que el conducto rectal puede ser un reservorio importante para este microorganismo.¹⁶⁷ *S. saprophyticus* también fue aislado en otros animales (p. ej., cerdos), en la pastura y el forraje; hay evidencia que indica que el alimento puede ser la fuente primaria del microorganismo.^{165,166} Hedman y cols. encontraron *S. saprophyticus* en 16,4% de 1 331 muestras de alimentos, con una prevalencia del 34% en carne de vaca y de cerdo.¹⁶⁵ Estos investigadores concluyeron que el microorganismo proviene de las reses del matadero, contamina la materia prima del alimento y luego coloniza el aparato digestivo humano.

En los últimos años se han estudiado varios posibles factores de virulencia de *S. saprophyticus*. Estudios in vitro sobre la adherencia de esta especie a varios tipos de células mostraron que *S. saprophyticus* se adhiere a las células periuretrales, uretrales y uroepiteliales más que otros estafilococos y no se adhiere a otros tipos de células, como las de la mucosa bucal y las de la piel.²⁹³ Este tropismo por el tejido uroepitelial puede explicar en forma parcial la elevada frecuencia de infecciones urinarias causadas por este microorganismo. La ureasa, un reconocido factor de virulencia para otros patógenos urogenitales (p. ej., especies de *Proteus*, *Corynebacterium ureolyticum*), también se produce por *S. saprophyticus* y contribuye a la invasión del tejido vesical en modelos animales de infección urinaria.¹⁷⁶ La producción de moco no ha sido un atributo constante de cepas de *S. saprophyticus*.³⁶⁹ Hjelm y Lundell-Etherden encontraron que, aunque sólo 9 de 30 cepas de *S. saprophyticus* producían moco en caldo tripticasa soja, las 30 lo producían en la orina.¹⁷⁶ Estos investigadores propusieron que tanto la presencia de orina como la de ureasa eran esenciales para la producción de moco por este microorganismo. Se ha identificado una proteína fibrilar de 95 kDa asociada con la superficie de las cepas de *S. saprophyticus* como posible factor de virulencia.¹²⁶ Esta proteína, designada *Ssp* (por proteína de *S. saprophyticus* asociada con la superficie) puede participar en las interacciones iniciales y la adherencia a las células uroepiteliales. También se demostró una hemaglutinina de 160 kDa sobre la superficie de las células de *S. saprophyticus*.¹²⁸ Esta hemaglutinina se une a una proteína de membrana o proteínas presentes en la superficie de eritrocitos de certero; se demostró que es la principal adhesina para la unión de microorganismos a las células epiteliales^{299,300} y que también es capaz de unirse a la fibronectina.¹²⁷ Además de *Ssp* y la hemaglutinina, se ha identificado recientemente sobre la superficie de las células de *S. saprophyticus* otra proteína de superficie celular que se une a la fibronectina y a los eritrocitos.¹⁷¹ Esta proteína tiene tanto propiedades adhesivas como autolíticas y el gen para esta proteína (llamado gen *aas*) ha sido clonado y secuenciado. Las secuencias de aminoácidos para los dominios funcionales de la autolisina codifican las enzimas *N*-acetil-muramyl-L-alanina amidasa y endo- β -*N*-acetil-D-glucosaminidasa y son similares a las de las autolisinas identificadas tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*. Las secuencias restantes funcionan como la adhesina y representan una clase nueva de factores de virulencia estafilocócicos.¹⁷¹ Por último, Schneider y Riley informaron que el 79% de 100 aislamientos urinarios de *S. saprophyticus* mostraban una superficie celular intensamente hidrófoba en un ensayo de dos fases, acuosa e hidrocarbonada.³⁹⁷ Luego se

demostró que la hidrofobicidad es independiente de *Ssp* y de la hemoaglutinina.²⁹⁸ Como las interacciones hidrófobas de la superficie celular entre las bacterias y las células mamíferas promueven la adherencia, las estructuras hidrófobas de superficie de *S. saprophyticus* podrían funcionar en la interacción inicial de estos microorganismos con las células uroepiteliales.

OTROS ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS

Otras especies estafilocócicas se encuentran en seres humanos y en animales como parte de la flora normal y son causa de varios tipos de infecciones (véase recuadro 12-1). Algunas especies habitan en el medioambiente y se usan en varias industrias, incluido el procesamiento de alimentos. Aunque especies coagulasa negativas de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* se encuentran con frecuencia como contaminantes en muestras clínicas, el progreso médico les asignó un papel importante en enfermedades e infecciones humanas a otros numerosos estafilococos coagulasa negativos. Muchas especies ahora han sido informadas como causa de infecciones, principalmente de heridas, infecciones urinarias, bacteriemia, osteomielitis, sepsis relacionada con el catéter, infecciones de la derivación ventriculoperitoneal y endocarditis de prótesis valvular o de válvula nativa (recuadros 12-1 y 12-5). Estos agentes están siendo reconocidos como patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, incluidos recién nacidos prematuros, pacientes neutropénicos por cáncer, personas ancianas con enfermedades subyacentes graves y enfermos hospitalizados por procedimientos invasivos y portadores de dispositivos plásticos. Las infecciones con muchas de estas otras especies se adquieren en las salas del hospital. Las especies implicadas con mayor asiduidad son *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans* y *S. saccharolyticus*. Algunos de estos agentes, como *S. schleiferi* y *S. warneri*, producen diversos productos extracelulares (glucocáliz, DNasa, lipasa, estearasa, proteasa y α - y β -hemolisinas) que contribuyen a la virulencia.¹⁶² *S. haemolyticus* ha concitado un interés creciente a causa del surgimiento de su resistencia a los glucopéptidos.^{271,401-403,470} Los nichos ecológicos y la importancia clínica de los estafilococos además de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* se describen en el recuadro 12-1, mientras que los procesos infecciosos asociados con *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos se detallan en el recuadro 12-5.

Especies de *Micrococcus* y géneros relacionados

Los miembros del anterior género *Micrococcus* están mucho más relacionados con el género *Arthrobacter* corineforme grampositivo que con los estafilococos. Estos microorganismos se encuentran en el medioambiente y como flora transitoria en la piel humana y de otros mamíferos. Algunas especies producen pigmentos carotenoides, lo que da lugar al desarrollo de colonias amarillas o rosadas en agar. Las especies de *Micrococcus* tienen usos industriales como microorganismos en bioensayos para la detección de antibióticos en los alimentos para animales, cosméticos y líquidos corporales. Sólo en ocasiones se aíslan en muestras clínicas humanas, en las que por lo común representan contaminantes de la piel, de las superficies mucosas o del medioambiente. Estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y se han informado como causa de neumonía, meningitis, artritis séptica, bacteriemia, sepsis relacionada con cateterismo y peritonitis vinculada con diálisis

peritoneal ambulatoria continua.^{61,276,337,381,474,495} *Kytococcus sedentarius* (antes *Micrococcus sedentarius*) produce dos enzimas capaces de hidrolizar la queratina y es responsable de la erosión de la epidermis humana en la afección dermatológica llamada queratólisis punteada.²⁷⁰

Rothia mucilaginosa

La primera infección humana por *R. mucilaginosa* fue informada en 1978 en un paciente que había desarrollado endocarditis luego de la cateterización cardíaca.³⁷⁷ Desde entonces, han aparecido en la bibliografía varios casos de endocarditis de válvula protésica y de válvula nativa causadas por *R. mucilaginosa*. En algunos de esos casos, la infección cardíaca estuvo asociada con el uso de drogas intravenosas.^{82,349,365} La sepsis por *R. mucilaginosa* ha sido informada en asociación con trauma de cuello y cabeza, dispositivos de acceso periféricos y centrales, quimioterapia contra cáncer, cateterización cardíaca seguida de infarto de miocardio, diálisis peritoneal ambulatoria continua y prematuridad extrema.^{303,352,377} *R. mucilaginosa* también ha surgido como un patógeno importante tanto en adultos como en niños con procesos malignos (p. ej., leucemia, linfoma, cáncer de mama, enfermedad de Hodgkin, carcinoma epinocelular, osteosarcoma, rabdomiosarcoma y SIDA) y en receptores de trasplantes de médula ósea.^{1,12,86,140,149,334,453,488} Entre las infecciones están incluidas bacteriemias sostenidas o transitorias, sepsis asociadas con una vía central o periférica, neumonía, meningitis, osteomielitis vertebral y colangitis.^{1,12,86,140,161,318} La recuperación de *R. mucilaginosa* de esos pacientes se asoció con neutropenia acentuada como resultado de una enfermedad subyacente, inmunosupresión o quimioterapia citotóxica. Los dispositivos de acceso colonizados (p. ej., guías intraarteriales o intravenosas, catéteres de Brouviac y de Hickman) fueron la procedencia del microorganismo en algunos pacientes, mientras que las ulceraciones esofágicas o mucosas secundarias a quimioterapia quimiotóxica, enfermedad periodontal o infecciones odontológicas o procedimientos se creyeron el origen en otros. Se ha informado endoftalmítis grave seguida a la implantación de lentes intraoculares que requirió la evisceración del ojo.⁴³⁹

Aislamiento y diferenciación preliminar de los estafilococos y de los cocos grampositivos relacionados

Frotis directos con tinción de Gram

En frotis directos teñidos con Gram a partir de muestras clínicas, los estafilococos aparecen como cocos grampositivos o gramvariables con diámetros que van desde 0,5 hasta casi 1,5 µm. Las células más grandes se observan entre los miembros del género *Micrococcus*, pero estas especies no causan infecciones humanas.²¹⁷ Los microorganismos pueden aparecer solos, en pares, en cadenas cortas o en grupos, tanto dentro como fuera de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (lámina en color 12-1D y F). Las variaciones en el tamaño celular y en la tinción de Gram se deben probablemente a la acción de las células inflamatorias y a sus enzimas hidrolíticas en las células bacterianas. En los frotis directos, los pares o cadenas cortas de microorganismos no pueden diferenciarse de estreptococos, micrococos o peptoestreptococos, aunque los estreptococos suelen aparecer como cadenas o diplococos más que como cadenas de células individuales aisladas. Los informes de los extendidos directos deben incluir la cuantificación de tipos de células y microorganismos (p. ej., “muchos PMN, modera-

dos cocos grampositivos”) Si la apariencia de la coloración de Gram es más típica, se puede informar “cocos grampositivos semejantes a estafilococos”, con confirmación con cultivos posteriores. No se puede usar la morfología de la tinción de Gram para diferenciar estafilococos de micrococos y géneros relacionados o de planococos.

Aislamientos en muestras clínicas

Para la recuperación de estafilococos y microorganismos relacionados, las muestras clínicas se deben inocular en agar sangre de carnero (SBA) y otros medios bacteriológicos. Para el aislamiento de microorganismos de muestras densamente contaminadas, las muestras deben ser inoculadas en agar Columbia adicionado con colistín y ácido nalidíxico (CNA) o en agar alcohol feniletílico (PEA), que inhiben el desarrollo de bacterias gramnegativas y permiten el desarrollo de microorganismos grampositivos. El agar manitol sal es un medio selectivo bueno para determinar la presencia de *S. aureus* en muestras como los cultivos nasales. En SBA, la mayoría de los estafilococos crecen bien dentro de las 24 horas, aunque los micrococos pueden requerir 48 horas para formar colonias de tamaño adecuado. Algunas especies de estafilococos pueden requerir más de 24 a 48 horas de incubación para poder discernir si una muestra contiene un cultivo puro o mixto. Una incubación más prolongada —mayor de 72 horas— puede ser necesaria para asegurar que la identificación y las pruebas de sensibilidad se están realizando sobre un cultivo puro, en especial si se han tomado colonias múltiples para obtener un inóculo representativo.

Morfología de la colonia

Las especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus* forman colonias distintas en SBA. Las colonias de la mayoría de las especies estafilocócicas crecen más rápido que los micrococos y tienen un diámetro de 1 a 3 mm después de 24 horas de incubación, aunque algunas (*S. warneri*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. vitulinus*, *S. lentus*) pueden formar colonias más pequeñas durante ese lapso. Las cepas de algunas especies estafilocócicas mostrarán una variación considerable en el tamaño de las colonias en la misma placa de cultivo y dar la apariencia de un cultivo mixto. Las colonias estafilocócicas suelen ser lisas, cremosas y tienen un perfil convexo poco sobrelevado y bordes netos. Las colonias de algunas cepas de *S. aureus* son por lo general grandes (4-6 mm de diámetro), lisas, enteras y de consistencia cremosa, aunque ciertas cepas pueden ser de apariencia húmeda o “viscosas”. Algunas cepas pueden estar pigmentadas de amarillo o de amarillo naranja (de ahí el nombre “aureus” que significa “color oro”), mientras que otras pueden producir colonias blanquecinas o grises. Las últimas cepas se pueden asemejar a los estreptococos del grupo D y a los enterococos (catalasa negativos). La producción de pigmento en *S. aureus* y entre los estafilococos coagulasa negativos por lo general se vuelve más pronunciada después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 a 3 días. Algunas de las especies de *S. aureus* y de las especies coagulasa negativas pueden tener una zona difusa de β-hemólisis alrededor de las colonias; esta propiedad hemolítica puede evidenciarse sólo después de una incubación prolongada (lámina en color 12-1E).

Las cepas de *S. aureus* aisladas en pacientes que han sido tratados con antibióticos durante períodos prolongados o en aquellos con afecciones permanentes, como la fibrosis quística, pueden crecer como colonias atípicas conocidas como **varian-**

tes de colonias pequeñas. Estas colonias suelen ser muy pequeñas, no pigmentadas y crecen mejor en presencia de CO_2 . Estos aislamientos también pueden ser dificultosos para probar sensibilidad a los antibióticos debido a su escaso desarrollo. El caldo usado en las pruebas de sensibilidad por microdilución de estos aislamientos puede necesitar suplementación, y la dilución en agar, la difusión en disco y los métodos de sensibilidad Etest deben realizarse en agar de Mueller-Hinton que contenga 5% de sangre carnero.

Los micrococos y las especies relacionadas crecen casi siempre más lentamente; a menudo requieren 48 horas de incubación antes de que se pueda distinguir la morfología típica de la colonia. Después de ese tiempo las colonias de los micrococos miden 1 a 2 mm de diámetro, son opacas o mate, con perfil convexo bien sobrelevado y bordes netos. La especie recientemente descrita *M. antarctica* produce colonias mucosas, pigmentadas amarillas en agar.²⁶⁹ Las colonias de especies de *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Dermaococcus* y *Kocuria*, y *A. agilis* pueden ser lisas o mate. Algunas especies son no pigmentadas (*M. lylae*, *N. halobia*) o pueden producir colonias amarillas (*M. luteus*, *K. sedentarius*, *K. varians*, *K. palustris*, *K. rhizophila*), naranjas (*D. nishinomiyaensis*, *K. kristinae*) o rosadas a rojas (*K. rosea*, *A. agilis*) en agar lámina en color 12-1H). La pigmentación a veces se vuelve más clara o intensa si las placas se incuban a temperatura ambiente durante varios días. Las colonias de *R. mucilaginosa* son de grises a blancas y pueden tener aspecto mucoso. Tienden a adherirse al agar y cuando se las extrae del medio, son difíciles de emulsionar.

Se cuenta con medios de cultivo que contienen sustratos cromogénicos para el aislamiento y la identificación presuntiva de *S. aureus*. Las formulaciones disponibles son CHROMagar Staph aureus® (CHROMagar Microbiology, París, Francia) y *S. aureus* ID agar® (bioMérieux, La Balme Les Grottes, Francia).^{123,343} En CHROMagar Staph aureus, las colonias de *S. aureus* son de color malva, mientras que en *S. aureus* ID agar son verdes. Las colonias coloreadas crecen en esos medios a causa de la producción de α -glucosidasa por los microorganismos durante el desarrollo. Los estafilococos coagulasa negativos producen colonias azules, blancas o beige en esos medios. En una evaluación comparativa de CHROMagar Staph aureus y *S. aureus* ID agar, el 96,8% de las cepas de *S. aureus* producían colonias verdes en el *S. aureus* ID agar después de 18-20 horas de incubación, mientras que el 91,1% de las cepas formaban colonias de color malva en CHROMagar Staph aureus dentro del mismo lapso.³⁴³ Se recuperaron un total de 94,3% de las cepas dentro de las 18-20 horas en agar sangre convencional. Los rendimientos del desarrollo en todos los medios aumentaron después de una incubación adicional de 20-24 horas. Cuando fueron confirmadas las identidades de las colonias coloreadas, el 94,7% de las colonias verdes en *S. aureus* ID agar y el 94,4% de las colonias malva en CHROMagar Staph aureus eran *S. aureus*. Se observó que CHROMagar Staph aureus es más sensible que los medios agar sangre de rutina para detectar *S. aureus* cuando se lo usó como parte del protocolo primario de la muestra.¹²³ Los medios de agar cromogénico se han utilizado como métodos rápidos para la identificación simultánea de *S. aureus* y la determinación de resistencia a la meticilina por incorporación de oxacilina o meticilina en el medio.^{230,296}

La prueba de la catalasa

Los estafilococos y los micrococos se diferencian de los estreptococos, los enterococos y las bacterias “tipo-estreptoco-

cos” por la prueba de la catalasa. Esta prueba detecta la presencia de enzimas citocromo oxidasa (protocolo 12-1). La prueba de la catalasa se realiza con 3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre un portaobjetos de vidrio. Un burbujeo vigoroso e inmediato indica la conversión del H_2O_2 en agua y oxígeno gaseoso (lámina en color 12-1G). En forma ideal, la prueba de la catalasa debe realizarse a partir de un medio que no contenga sangre, porque los hematíes por sí mismos pueden causar una reacción de catalasa positiva débil. Sin embargo, como la mayoría de los laboratorios clínicos recuperan estafilococos de medios no selectivos o de medios selectivos que contienen sangre (p. ej., SBA y agar CNA, respectivamente) se debe tener el cuidado de tomar la muestra sólo de la parte superior de las colonias para la prueba de la catalasa a fin de evitar el traslado de sangre y las posibles reacciones falsas positivas. Esto se puede hacer de modo más expeditivo con un palillo aplicador de madera. Las cepas raras de estafilococos pueden ser catalasa negativas y algunos enterococos producen una “seudocatalasa” y son débilmente reactivos con H_2O_2 .⁴⁵⁵ *R. mucilaginosa* es por lo general catalasa negativa o positiva débil.

Métodos para la diferenciación de micrococos y estafilococos

Se dispone de varios métodos para la diferenciación entre las especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus*, los dos géneros catalasa positivos observados con mayor frecuencia en el laboratorio clínico, y otros cocos grampositivos, catalasa positivos. Algunos requieren medios especiales e incubación prolongada, mientras que otros se encuentran en el comercio y proporcionan resultados dentro de las 18-24 horas o menos. En el cuadro 12-1 se enumeran los métodos de prueba y los resultados para las especies *Micrococcus*, *Macrococcus* y *Staphylococcus*. Aunque las especies de *Macrococcus* son en principio cepas equinas, sus reacciones se incluyen para el reconocimiento primario de aislamientos de macrococos recuperados en laboratorios que proveen servicios a prácticas veterinarias.

FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA

Esta prueba se realiza de modo similar a las pruebas de oxidación-fermentación (OF) para bacilos gramnegativos. El medio OF para estafilococos contiene nutrientes adicionales, como extracto de levadura para colmar los requerimientos necesarios para el desarrollo de estafilococos. Este método, considerado el procedimiento de referencia para la diferenciación de *Micrococcaceae*, requiere una incubación prolongada y no es fácilmente adaptable para el uso en el laboratorio de rutina.²²³

SENSIBILIDAD A LA LISOSTAFINA

La lisostafina es una endopeptidasa que escinde los puentes de entrecruzamiento del pentapéptido rico en glicina en el peptidoglucano de la pared celular estafilocócica.¹²⁹ Esta actividad vuelve las células sensibles a la lisis osmótica. Ciertas especies estafilocócicas (*S. aureus*, *S. simulans*, *S. cohnii* y *S. xylosum*) son más sensibles a la lisostafina que otras (p. ej., *S. hominis*, *S. saprophyticus* y *S. haemolyticus*); de allí que la estandarización e interpretación de esta prueba es a veces dificultosa. Se comercializa una prueba en tubo para sensibilidad a la lisostafina de Remel® (Lenexa, KA). Se prepara una suspensión cargada del microorganismo en 0,2 mL de solución salina estéril, después de lo cual se agregan 0,2 mL de solución de lisostafina

Cuadro 12-1 Características fenotípicas para la diferenciación de *Micrococcus*, *macrococcus* y *Staphylococcus*

CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN/REACCIÓN PARA:		
	<i>Micrococcus</i> y especies relacionadas ^a	<i>Macrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
Tamaño de la colonia	1-1,8 µm	1,3-2,5 µm	0,6-1,5 µm
Forma de la colonia	Convexa	Poco convexa, abovedada	Elevada, poco convexa
Velocidad de crecimiento	Muy lento	Lento	Lento a rápido
Producción de ácido a partir de glucosa en condiciones anaerobias	—	—	+
Lisostafina	R	S	S
Producción de ácido a partir de glicerol en aerobiosis en presencia de 0,4 µg/mL de eritromicina	—	ND	+
Sensibilidad a la furazolidona (disco de 100 µg/mL de furazolidona)	R	S	S
Sensibilidad a la bacitracina (disco Taxo A de 0,04 unidades)	S	R	R
Prueba de oxidasa modificada	+	+	— ^b

^a Incluye los géneros *Micrococcus*, *Kytococcus*, *Dermacoccus*, *Nesterenkonia* y *Kocuria*.
^b Todas las especies de *Staphylococcus* son oxidasa modificada negativas excepto las cepas de *S. sciuri*, *S. lentus* y *S. vitulinus*.
 +: reacción positiva; —: reacción negativa; S: sensible; R: resistente; ND: datos no disponibles.

Remel. La suspensión se incuba a 35 °C durante 2 horas. El aclaramiento de la suspensión indica sensibilidad a la lisostafina. Esta sensibilidad también puede determinarse usando un método de difusión en papel de filtro.³⁵⁴ Se inocula una placa de agar de Mueller-Hinton con el microorganismo por probar (0,5 de la escala de turbidez estándar de McFarland) y se coloca en la placa un disco impregnado con 10 µg de lisostafina (solución esterilizada con filtro, 287 unidades/mL). La placa se incuba durante 24 horas a 35 °C. Las especies de *Staphylococcus* por lo general mostrarán zonas de inhibición de 10-16 mm de diámetro. *Micrococcus* y las especies relacionadas no mostrarán esas zonas.

Para obtener resultados óptimos con la prueba de sensibilidad a la lisostafina, el microorganismo debe desarrollarse en un medio con base de peptona de carne más que en un medio con base de peptona de caseína. El factor crucial es el contenido en glicina del medio, porque la glicina es una parte importante de la pared celular estafilocócica y es esencial para la acción de la lisostafina.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE GLICEROL EN PRESENCIA DE ERITROMICINA

En esta prueba, se prepara un medio que contenga glicerol (1%) y eritromicina (0,4 µg/mL) con un agar base enriquecido que contiene púrpura de bromocresol como indicador y se coloca en placas de Petri.³⁹² Se siembran varias colonias del aislamiento como una única línea en el medio y la placa se incuba durante más de 3 días a 35 °C. Los estafilococos producirán ácido en ese medio, mientras que los micrococcos, no.

SENSIBILIDAD A LA FURAZOLIDONA^{19,306,476}

Esta prueba se realiza como un procedimiento de sensibilidad en disco que puede compararse en el comercio (discos FX[®], 100 µg; BD Biosciences[®], Sparks, MD[®]). El procedimiento para esta prueba se describe en detalle en el protocolo

12-1 y en la lámina en color 12-1A y B. Los estafilococos se inhiben por la acción de la furazolidona y muestran zonas de inhibición de 15 mm o más, mientras que los micrococcos y las especies relacionadas son resistentes y muestran zonas de 6 mm (sin zona) a 9 mm.¹⁹ Sin embargo, en ocasiones pueden observarse estafilococos coagulasa negativos resistentes a la furazolidona.

PRUEBA DE LA OXIDASA MODIFICADA^{19,105}

Esta prueba de Remel (Microdase Test Disks) también está disponible en el mercado. Se usan discos de papel de filtro impregnados con dihidrocloro tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo oxidasa) en dimetil sulfoxido (DMSO). Este último vuelve a las células permeables a los reactivos. Se extrae una colonia del medio de desarrollo con un palillo aplicador y se frota en el disco. La aparición de color violeta azulado dentro de los 30 segundos es una prueba positiva (lámina en color 12-2C). La prueba es negativa cuando no hay color en ese lapso. Las especies de *Micrococcus*, *N. halobia*, *D. nishinomiyaensis*, *A. agilis*, *K. kristinae* y las especies de *Macrococcus* son oxidasa positivas, mientras que las cepas de *K. sedentarius*, *K. rosea*, *K. varians*, *K. palustris* y *K. rhizophila* son oxidasa negativas.^{217,231,423} Todas las especies de *Staphylococcus* son oxidasa negativas excepto las cepas de *S. sciuri*, *S. lentus* y *S. vitulinus*.²¹⁸

SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA^{19,104}

Para este procedimiento se emplean los mismos discos de bacitracina usados para la identificación presuntiva de los estreptococos β-hemolíticos del grupo A. Se prepara una superficie de cultivo en una placa de agar de Mueller-Hinton o de agar sangre como se describió para la prueba en disco FX[®] y se coloca un disco diferencial de bacitracina (Taxo A, 0,04 unidades de bacitracina; BD Biosciences[®]) en el inóculo. Después de una incubación de toda la noche, se miden los tamaños de las

zonas de inhibición. Los estafilococos son resistentes y crecen en el borde del disco, mientras que los micrococos y las especies relacionadas son sensibles y producen zonas de inhibición de 10 mm o mayores.¹⁹

El método de elección usado en un laboratorio dado depende del tipo de trabajo realizado (p. ej., laboratorio de referencia, microbiología medioambiental, laboratorio clínico). En la mayoría de los laboratorios microbiológicos clínicos, la prueba de oxidasa modificada, la prueba en disco de furazolidona y la prueba en disco de bacitracina Taxo A son las opciones más lógicas porque son rápidas, confiables, de bajo costo y se encuentran en el comercio.

Identificación de *Staphylococcus aureus*

La única característica más confiable para la identificación de *S. aureus* es la prueba de la coagulasa. La prueba de la coagulasa convencional se puede realizar mediante los siguientes procedimientos en portaobjetos o en tubo.

Prueba de la coagulasa en portaobjetos

La mayoría de las cepas de *S. aureus* tienen un término coagulasa o "factor de aglutinación" en la superficie de la pared celular. Este factor reacciona en forma directa con fibrinógeno en plasma y causa una aglutinación celular rápida (lámina en color 12-2D). El rendimiento de esta prueba se describe en detalle en el protocolo 1-3. La prueba se puede realizar con un cultivo en agar sangre, agar CNA u otro medio nutritivo no selectivo, pero no debe efectuarse en medios con alto contenido salino (p. ej., agar manitol sal) porque éste provoca la autoaglutinación de algunas cepas de *S. aureus*. Las cepas que son negativas en la prueba de la coagulasa en portaobjetos deben confirmarse con una prueba de la coagulasa en tubo, porque las cepas deficientes en factor de aglutinación por lo general producirán coagulasa libre. Algunas cepas de las especies de *S. lugdunensis* y *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* también producen factor de aglutinación y pueden ser positivas con la prueba en portaobjetos.^{121,162,463}

Prueba de la coagulasa en tubo

La coagulasa detectada por este método se segrega de forma extracelular y reacciona con una sustancia en el plasma llamada factor de la reacción coagulasa (CRF) para formar un complejo que, a su vez, reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (formación del coágulo) (véanse protocolo 1-3 y lámina en color 12-2E). Las pruebas que son negativas después de 4 horas de incubación a 35 °C deben mantenerse a temperatura ambiente y leerse nuevamente después de 18 a 24 horas porque algunas cepas producirán fibrinolisis en la incubación prolongada a 35 °C, causando la disolución del coágulo durante el período de incubación.²⁴⁸ Ciertas cepas poco frecuentes de *S. aureus* pueden ser coagulasa negativas, y algunos aislamientos animales (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* y *S. schleiferi* subespecie *coagulans*) pueden ser coagulasa positivos para la prueba en tubo.^{96,156,157,463,469}

Recientemente se han recuperado cepas de *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* coagulasa positivas tanto en tubo como para el factor de aglutinación de infecciones humanas.⁴⁶³ Estos aislamientos también producen una DNasa termoestable (véase más adelante) y, por lo tanto, podrían ser mal identifi-

cados como *S. aureus*. Estas cepas pueden diferenciarse de *S. aureus* por la falta de producción de ácido de maltosa, lactosa, manitol, sacarosa y turanosa. Además, *S. schleiferi* subespecie *coagulans*, un microorganismo que causa otitis externa canina, se ha encontrado en infecciones humanas y también puede ser mal identificado como cepas de *S. aureus* con factor de aglutinación negativo. Estas subespecies pueden diferenciarse de *S. aureus* por las pruebas de utilización de hidratos de carbono.⁴⁶³

Como ya se mencionó, el medio recomendado para las pruebas de coagulasa tanto en portaobjetos como en tubo es el plasma de conejo con EDTA. El plasma citratado no se debe usar porque los microorganismos que pueden usar citrato (p. ej., especies de *Enterococcus*) producirán resultados positivos si se los confunde de modo inadvertido con estafilococos. Este error puede evitarse haciendo siempre primero una prueba de catalasa. El plasma humano (p. ej., material vencido de bancos de sangre) contiene cantidades variables de CRF y anticuerpos antiestafilocócicos y no debe usarse para realizar pruebas de coagulasa.

La prueba de la coagulasa en tubo todavía es el procedimiento de referencia para la identificación de *S. aureus*. Aunque suele realizarse con aislamientos tomados de medios de agar, también puede ser inoculada con caldos de hemocultivos positivos o centrifugado de microorganismos a partir de caldos de hemocultivos. McDonald y Chapin revaluaron un procedimiento de coagulasa en tubo de 2 horas para la identificación de *S. aureus* en hemocultivos positivos.²⁹⁰ La inoculación de la prueba de coagulasa en forma directa con los medios de cultivos positivos fue comparada con un inóculo obtenido por centrifugación y resuspensión de los microorganismos del medio del hemocultivo. Además, tanto el caldo de cultivo como el pellet bacteriano fueron probados con dos pruebas de aglutinación del látex comercial (véase más adelante). Usando 180 hemocultivos sembrados y clínicos, la prueba de la coagulasa en tubo de 2 horas mostró sensibilidad del 86,2% y el 84,4%, y del 100% de especificidad cuando se inoculaba directamente con caldo de hemocultivos positivos y con centrifugados bacterianos, respectivamente. Las pruebas de aglutinación del látex fueron 6,8-8,6% sensibles y sólo 95,9% específicas cuando se inocularon con caldo de hemocultivos positivos o centrifugados bacterianos, respectivamente.²⁹⁰

Procedimientos alternativos para la prueba de la coagulasa AGLUTINACIÓN DEL LÁTEX

Este procedimiento usa partículas de látex recubiertas con plasma. El fibrinógeno adherido al látex detecta el factor de aglutinación. Además, las moléculas de inmunoglobulinas también presentes en las partículas detectan la proteína A, proteína de la pared celular estafilocócica que puede unirse a las moléculas de inmunoglobulina G por la región Fc. Mezclar los reactivos de la prueba con material de las colonias de una placa de agar da por resultado una aglutinación rápida de la suspensión microorganismo-látex (lámina en color 12-2F). Se comercializan varios productos que usan esta aproximación: StaphAurex® (Murex, Norcross, CA), Slidex Staph® (bioMérieux, Hazelwood, MO), Staphylatex® (Dade/MicroScan, West Sacramento, CA), Fastaph® (Carr-Scarborough, Stone Mountain GA), Staph Rapid® (Roche, Nutley, NJ), Staphylase® (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), Staphytest® (Oxoid Unipath, Dardillo, Francia) y Veri-Staph® (Zeus Technologies, Raritan, NJ). Además, algunas cepas de *S. lugdunensis* y *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* producen factor de aglutinación y pueden ser positivas con estos procedimientos rápidos.

HEMAGLUTINACIÓN PASIVA

Estos procedimientos de prueba usan hematíes de oveja sensibilizados con fibrinógeno para detectar el factor de aglutinación en la superficie de las células de *S. aureus* (lámina en color 12-2E). Se venden tres equipos comerciales: Staphyloslide® (BD Biosciences), Hemastaph® (Remel Laboratories) y Staphyslide® (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). Algunos operadores prefieren estas pruebas a las de aglutinación del látex porque se incluye una suspensión de hematíes no sensibilizados como control negativo para cada prueba. Algunas cepas de *S. saprophyticus* también pueden producir resultados falsos positivos con pruebas de coagulasa de látex rápidas o de hemaglutinación.¹⁴⁷ Esto puede explicarse por la presencia de una hemaglutinina que se encuentra en la superficie de las cepas de *S. saprophyticus*.¹²⁸

Se han publicado varias evaluaciones que comparan los equipos de látex y de hemaglutinación pasiva con las pruebas de coagulasa en tubo de 4 horas y de 24 horas. Estos equipos tienen sensibilidades y especificidades del 94-100% y del 93-100%, respectivamente.^{20,199,339,373} Se han observado sensibilidades que van desde valores tan bajos como el 6% hasta el 62% cuando se las usó directamente en hemocultivos que mostraban cocos grampositivos en grupos en el frotis teñido con Gram.^{290,414} Varios investigadores informaron que se pueden encontrar resultados falsos negativos de aglutinación del látex y hemaglutinación pasiva cuando se prueban cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina/oxacilina. Por ejemplo, Piper y cols. hallaron que, cuando se realizaron dos pruebas de aglutinación y un procedimiento de hemaglutinación, sólo 82-86% de estas cepas fueron identificadas.³⁵⁰ En otro estudio que comparó la reactividad con pruebas rápidas de coagulasa para serotipo capsular y sensibilidad a la oxacilina, todas las cepas que dieron pruebas de aglutinación negativas fueron del serotipo capsular 5 y todas, excepto una cepa, fueron resistentes a la oxacilina.¹¹³ Se postuló que la falta de reacción de las cepas de *S. aureus* con los procedimientos rápidos de coagulasa está relacionada con la presencia del serotipo capsular 5 en la superficie de la célula. De modo sorprendente, el serotipo capsular 5 es predominante entre las cepas resistentes a la meticilina.¹¹³ La presencia de esta cápsula puede interferir en la accesibilidad de los reactivos de la prueba al factor de aglutinación y a la proteína A presentes en la pared celular bacteriana.

En 1993, Fournier y sus cols. informaron sobre una nueva prueba de aglutinación del látex denominada "Pastorex Staph-Plus®" (Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Francia).¹¹⁴ Este reactivo consiste en una mezcla 2:1 de partículas de látex recubiertas con fibrinógeno para la detección del factor de aglutinación y con IgG para la detección de proteína A y partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polisacáridos capsulares de los serotipos 5 y 8. Los últimos componentes de este reactivo identificarían las cepas no identificadas por los reactivos de aglutinación del látex comunes. En el estudio de Fournier y cols., este reactivo nuevo se comparó con el Staphyslide® (un reactivo de hemaglutinación francés), el StaphAurex® (Murex) y el Pastorex-Staph® (un equivalente francés del StaphAurex®).¹¹⁴ De las 220 cepas de *S. aureus* (61 de las cuales eran resistentes a la oxacilina) y 128 estafilococos coagulasa negativos probados, Pastorex Staph-Plus identificó el 98,6% de las cepas de *S. aureus*, en comparación con 91,8%, 91,4% y 84,5% para las pruebas Pastorex-Staph, Staphyslide y StaphAurex. Ninguno de los estafilococos coagulasa negativos reaccionó con los reactivos nuevos. Cuando las 61 cepas oxacilina resistentes se analizaron por separado, Pastorex Staph-Plus identificó

95,1%, en comparación con 73,8%, 72,1% y 49,2% obtenidos con Pastorex-Staph, Staphyslide y StaphAurex. Como se sabe que los tipos capsulares 5 y 8 predominan entre los aislamientos clínicos, que las cepas capsulares tipo 5 predominan entre las cepas resistentes a la oxacilina y que estas últimas no se identifican bien mediante las pruebas del látex y hemaglutinación pasiva, la incorporación de anticuerpos monoclonales contra estos tipos capsulares en una preparación de látex ofrece una ventaja real y teórica en la identificación de *S. aureus* resistente a la meticilina. Además de Pastorex Staph-Plus, se fabrican el Slidex Staph-Kit® (bioMerieux) y el StaphAurex-Plus® (Murex Biotech, Chatillon, Francia) para incluir anticuerpos específicos para los polisacáridos capsulares tipos 5 y 8. El Slidex Staph-Kit es un producto combinado de látex y hemaglutinación, mientras que el StaphAurex-Plus es una prueba de aglutinación del látex.^{272,497} El Dryspot Staphylotec Plus® (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) usa látex azul sensibilizado con fibrinógeno porcino, IgG de conejo y anticuerpos anticapsulares policlonales. El reactivo desecado se rehidrata con solución salina, se mezcla con el material extraído de las colonias y se lee dentro de los 20 segundos para la aglutinación. En un estudio de 202 aislamientos, Sariya y cols. encontraron que la prueba Dryspot tenía una sensibilidad del 99,1% y una especificidad del 93,1% para la identificación de *S. aureus*.³⁸⁶ Otra prueba de látex, Monostaph-Plus® (Bionor, Skin, Noruega) usa partículas de látex recubiertas de fibrinógeno, inmunoglobulina G y anticuerpos policlonales contra el polisacárido capsular tipo 5 solamente.⁴⁵⁶ En un estudio que compara el látex Monostaph con el reactivo de látex Monostaph-Plus® Tveten encontró que Monostaph identificaba sólo el 79,5% de los 78 *S. aureus* resistentes a la oxacilina, mientras que Monostaph-Plus identificaba el 98,7%; ambos reactivos identificaron de modo correcto 50 cepas de *S. aureus* sensibles a la oxacilina.⁴⁵⁶

Otros estudios han sugerido que las cepas de *S. aureus* que no se aglutinan con los reactivos de látex son "deficientes" desde el punto de vista genético con respecto al factor de aglutinación y a la proteína A. En Alemania, Schwarzkopf y cols. analizaron 50 cepas con factor de aglutinación y proteína A negativas y resistentes a la oxacilina, y encontraron que todas tenían antibiogramas similares, eran no tipificables con un grupo internacional de bacteriófagos y tenían un plásmido de 30 kb que fue similar para todas las cepas en un análisis de enzima de restricción.⁴⁰⁴ Estos datos sugirieron que esas cepas de *S. aureus* deficientes pertenecían a un único clon. Los análisis con enzimas de restricción y amplificación de los genes coagulasa de esas cepas revelaron un solo producto de 650 pb en las cepas deficientes, mientras que análisis similares de cepas resistentes a la oxacilina, coagulasa positivas mostraron diferentes patrones de restricción, lo que muestra diferencias sustanciales en los loci del gen coagulasa.⁴⁰⁴ La amplificación por PCR de los genes de la proteína A indicó que las cepas proteína A negativas tenían genes que codificaban cuatro dominios de unión a IgG, mientras que las cepas de tipo silvestre tenían genes que codificaban cinco dominios, lo que sugiere que es necesaria la falta de la secuencia del gen de la proteína A para la reactividad de la aglutinación del látex.⁴⁰⁴

En el sistema de identificación RapiDEC Staph® (bioMerieux) está incluida una prueba de coagulasa fluorogénica como prueba para *S. aureus* (véase más adelante). Esta prueba, que se realiza por inoculación de una pequeña cúpula que contiene el sustrato, detecta lo que los fabricantes llaman "aureasa" (coagulasa). La aureasa es una enzima proteolítica de coagulación que reacciona con protrombina para formar un complejo lla-

mado estafilotrombina. Luego la estafilotrombina escinde en forma enzimática un péptido fluorogénico presente en la cúpula de la prueba, con lo que libera un péptido y un radical que es fluorescente bajo la luz ultravioleta. Una fluorescencia en la cúpula de la prueba mayor que la de la cúpula control sin el sustrato proporciona la identificación de *S. aureus*. La prueba de la "aureasa" en el RapiDEC Staph® resultó altamente sensible y específica.^{131,192,302} Mitchell y cols. evaluaron la prueba aureasa RapiDEC para la identificación de *S. aureus* directamente en hemocultivos; 27 de 28 *S. aureus* fueron identificados en forma correcta dentro de las 2 horas que requiere esta prueba; ninguno de los estafilococos coagulasa negativos producía resultados falsos positivos cuando la prueba de aureasa se inoculaba con suspensiones bacterianas de hemocultivos positivos.³⁰²

Pruebas confirmatorias adicionales

PRUEBA DE LA DESOXIRRIBONUCLEASA (DNasa)

Algunas cepas de *S. aureus* pueden producir reacciones de coagulasa en tubo equívocas o débiles y los aislamientos raros pueden ser en efecto coagulasa negativos. En esos casos, puede ser útil realizar otras pruebas que se correlacionen bastante con la producción de coagulasa. *S. aureus* produce DNasa y una nucleasa termoestable que tienen actividades endonucleolíticas y exonucleolíticas.^{151,250} Ambas enzimas hidrolizan ácido nucleico (ácido desoxirribonucleico, DNA). La DNasa puede ser detectada por la inoculación en motas grandes de varias colonias del microorganismo en un medio de prueba DNasa que contenga el colorante metacromático azul de toluidina O (disponible en el comercio). Después de 24 horas de incubación a 35 °C, el medio debajo y alrededor del inóculo se vuelve de azul claro a rosado, lo que indica hidrólisis de DNA (lámina en color 12-2G). El contenido de azul de toluidina O en el medio no debe exceder el 0,005% porque el color azul impartido en el medio por altas concentraciones puede enmascarar la detección de la actividad DNasa.⁴⁷⁹ La inoculación en motas es necesaria porque algunas cepas de *S. aureus* no crecen bien en el medio y no se requiere el desarrollo para la detección de la actividad DNasa. Aunque esta prueba es útil como una prueba adjunta para la identificación de *S. aureus*, otros estafilococos también pueden producir reacciones de DNasa positivas.

PRUEBA DE LA ENDONUCLEASA TERMOESTABLE

Para esta prueba, se usa el mismo medio de la prueba DNasa, sólo que se cortan orificios de 3 mm en el agar con un sacabocados estéril y los pozos se llenan con un caldo de cultivo de 24 horas del microorganismo de prueba que se ha hervido en un baño de agua durante 15 minutos. La placa se incuba toda la noche a 35 °C. Las cepas de *S. aureus* mostrarán una zona rosada alrededor del pocillo que contiene la suspensión hervida. Ciertos aislamientos animales (p. ej., *S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* y *S. hyicus*) también producen una termonucleasa termoestable y algunos estafilococos coagulasa negativos (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis* y *S. carnosus*) pueden producir reacciones positivas débiles. La especificidad de este ensayo para endonucleasa termoestable de *S. aureus* puede confirmarse por seroinhibición de la reacción por anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la enzima de *S. aureus* o mediante amplificación de PCR y secuenciación del gen *nuc* que codifica la endonucleasa termoestable de *S. aureus* (véase más adelante).⁴⁸

FERMENTACIÓN DEL MANITOL

Además de las pruebas anteriores, *S. aureus*, a diferencia de *S. epidermidis* y otras especies coagulasa negativas, puede fermentar el manitol. Esta propiedad se utiliza en estudios epidemiológicos para detectar *S. aureus* en el suelo y las heces y en la selección de portadores nasales del microorganismo. El medio usado es **agar manitol sal**. Este medio contiene manitol (1%), NaCl 7,5%, rojo de fenol y peptonas. La elevada concentración salina inhibe el desarrollo de otros microorganismos (excepto el de enterococos) y permite el crecimiento selectivo de los estafilococos. *S. aureus* puede ser detectado por la presencia de una zona amarilla alrededor de las colonias, lo que indica la producción de ácido a partir del manitol. Sin embargo, otras especies estafilocócicas aisladas con poca frecuencia también pueden producir ácido del manitol, de modo que los microorganismos manitol positivos que crecen en este medio se deben subcultivar en agar sangre y controlar para la producción de coagulasa.

Otros métodos para la identificación de *Staphylococcus aureus*

La detección de la presencia de enzimas particulares de *S. aureus* se utilizó como una forma de identificar a este microorganismo. Guzman y cols. crearon un enzimoimmunoanálisis para la identificación de *S. aureus* que usa la detección simultánea de la proteína A y la endo β -N-acetilglucosaminidasa de *S. aureus* (SaG), una enzima producida por todas las cepas de esta especie.¹⁵⁴ Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra SaG, este enzimoimmunoanálisis podría identificar cepas de *S. aureus* por detección simultánea de SaG (mediante unión de la enzima bacteriana a los sitio Fab del anticuerpo) y de la proteína A (mediante la unión a la región Fc). Este ensayo se desempeñó mejor que la aglutinación del látex y la hemaglutinación pasiva cuando se lo comparó con esos productos comerciales.¹⁵⁰ La prueba mostró 100% de sensibilidad y de especificidad y fue muy útil para identificar cepas que carecían del factor de aglutinación o de proteína A detectables. Las técnicas de biología molecular, como los métodos de sondas de DNA y la PCR, también se utilizaron para la identificación de *S. aureus*. Davis y Fuller encontraron que el Accu-Probe® para la confirmación del cultivo de *S. aureus* (Gen-Probe, San Diego, CA) se desempeñó bien para la identificación directa de *S. aureus* en hemocultivos que mostraron cocos grampositivos agrupados en la tinción de Gram.⁹¹ En un estudio similar, Skulnick informó una sensibilidad del 95% y una especificidad del 98,5% cuando la prueba AccuProbe de *S. aureus* se realizaba directamente en caldos de hemocultivos.⁴¹⁴ También se sintetizaron cebadores y sondas de amplificación y detección del gen *nuc* de *S. aureus* y se analizó para su utilidad en la confirmación y en la detección directa de cultivos.⁴⁷ El gen *nuc* codifica la endonucleasa termoestable de *S. aureus*. Para la identificación, el límite más bajo de sensibilidad del ensayo PCR fue 5-20 UFC del microorganismo. Usando muestras clínicas sin estafilococos que se sembraron con diluciones seriadas de *S. aureus*, el límite inferior para la detección directa de *S. aureus* por el ensayo de PCR iba de 10-20 UFC hasta más de 1 000 UFC, según el tipo de muestra clínica. El ensayo basado en PCR fue 100% específico para *S. aureus*.⁴⁷

Pruebas rápidas de detección de resistencia a la meticilina

Si bien no es un método de identificación, la detección rápida de resistencia a la meticilina en *S. aureus* es en verdad tan crítica como la identificación de la especie. El gen *mecA* es el gen estructural para una proteína de unión a la penicilina de

baja afinidad (PBP 2' o PBP 2a) que se encuentra en las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina/oxacilina (SARM).^{405,457} Los métodos de detección comerciales que usan la técnica de amplificación de la sonda cíclica (ensayo de identificación SARM Velogene Rapid®, Alexon-Trend, Minneapolis), la técnica de fluorescencia (Crystal SARM ID System®, BD Biosciences) y la aglutinación del látex (SARM-Screen®, Denka Seiken, Niigata, Japón; prueba de aglutinación del látex Oxoid Penicillin Binding Protein®, Oxoid) para la detección de PBP 2a (PBP 2') de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina ahora están disponibles para su uso en los laboratorios microbiológicos clínicos.^{63,186,314,359} Estas pruebas son exactas y sus resultados se obtienen más rápidamente que los de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos automatizadas o convencionales. Las pruebas de látex involucran la extracción/lisis, centrifugación aglutinante de los desechos celulares y la mezcla del sobrenadante con los reactivos de la prueba y del control del látex. En una evaluación del SARM-Screen, Van Leeuwen y cols. encontraron que la prueba detectó el 97% de 90 *S. aureus* resistentes a la meticilina y no detectó ninguna de las 106 cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina.⁴⁶⁸ Estas pruebas no son sustitutos de las pruebas de identificación específicas para *S. aureus* porque las cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina serán negativas para la prueba SARM-Screen y los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina también llevan el gen *mecA* y serán positivos.^{311,468} En el capítulo 15 se amplía la información sobre la resistencia a la meticilina de los estafilococos y los métodos para su detección.

Diferenciación de estafilococos coagulasa positivos de origen veterinario

En medicina veterinaria, tres cocos coagulasa positivos –*S. aureus* (ambas subespecies *aureus* y *anaerobius*), algunas cepas de *S. hyicus* y *S. intermedius*– han sido la causa de mastitis bovina. Estos microorganismos producen coagulasa libre, como lo indican las pruebas en tubo positivas después de 4 a 24 horas de incubación. Roberson y cols. analizaron 80 cepas de cada una de esas especies para investigar pruebas simples que puedan diferenciarlas.³⁷⁰ Las cepas de *S. aureus* crecieron en agar P y en agar P con acriflavina (7 µg/mL), fueron VP positivas y producían ácido de manitol en condiciones anaerobias. *S. hyicus* y *S. intermedius* no crecían en agar P o en agar P con acriflavina y no producían acetoina ni fermentaban manitol. Las cepas de *S. intermedius* eran β-galactosidasa positivas, mientras que las cepas *S. hyicus* eran β-galactosidasa negativas.

S. schleiferi subespecie *coagulans* causa infecciones tanto en seres humanos como en perros; estas cepas por lo general son coagulasa positivas en tubo y factor de aglutinación negativas (las reacciones opuestas para estas dos pruebas se observan en las cepas de las subespecies *schleiferi*). *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* y subespecie *coagulans* pueden diferenciarse de *S. aureus* por la falta de producción de ácido de maltosa y trehalosa (véase cuadro 12-3). *S. delphini* y *S. lutrae* también son coagulasa positivos, pero estas especies están asociadas sólo con medioambientes marinos e infecciones cutáneas en delfines y nutrias marinas, respectivamente.^{111,469} Otras especies recuperadas de animales son coagulasa negativas.

Identificación de estafilococos coagulasa negativos

Como ya se describió, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son los estafilococos coagulasa negativos aislados con más fre-

cuencia y de mayor importancia clínica en los laboratorios clínicos que trabajan con muestras de origen humano. Debido a la significación clínica reconocida de *S. saprophyticus* en las infecciones urinarias y a la importancia de *S. epidermidis* como agente causal de infecciones, es ventajoso para los laboratorios el uso de métodos para la identificación confirmatoria de ambas especies. Además, los equipos comerciales le permiten al laboratorio identificar no sólo *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, sino también varios de los otros estafilococos humanos, animales y medioambientales. Aunque se describieron varias especies estafilocócicas coagulasa negativas y muchas de ellas han sido recuperadas de muestras clínicas, se observan relativamente pocas con alguna regularidad en la práctica real. En 1993, Kleeman y cols. publicaron los resultados de la identificación de especie en 500 aislamientos coagulasa negativos recuperados de muestras remitidas al laboratorio de microbiología de un hospital de la comunidad de 400 camas en Raleigh, NC.²¹⁶ *S. epidermidis* dio cuenta del 64,5% de los aislamientos, seguido en frecuencia decreciente por *S. haemolyticus* (13,4%), *S. hominis* (7,4%), *S. warneri* (4%), *S. lugdunensis* (2,8%), *S. simulans* (2,4%), *S. capitis* subespecie *capitis* (2%) y *S. capitis* subespecie *ureolyticus* (1,6%). *S. saprophyticus*, *S. cohnii* (subespecie *ureolyticum* y subespecie *cohnii*) y *S. auricularis* cada uno dio cuenta por menos del 1% de los aislamientos que crecieron en el laboratorio (lámina en color 12-3A). En 1996, un análisis de 415 estafilococos coagulasa negativos significativamente aislados en hemocultivos en Dinamarca encontró que el 68,7% eran *S. epidermidis*, seguidos en frecuencia de *S. hominis* (14,7%), *S. haemolyticus* (10,4%), *S. warneri* (2,9%) y *S. cohnii* (1,7%), con *S. saprophyticus*, *S. capitis* y *S. lugdunensis* cada uno dando cuenta del 1% o menos del total.¹⁹⁴ La distribución de las especies importantes informadas en estos estudios por lo general refleja lo que la literatura especializada ha acumulado con respecto a la significación clínica de las especies individuales.

Métodos de identificación convencionales

En 1975, Kloos y Schleifer publicaron un esquema para la identificación bioquímica de los estafilococos coagulasa negativos.²²³ Este esquema usó la prueba de la coagulasa para identificar *S. aureus* y usó una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas para diferenciar las especies coagulasa negativas. Este esquema fue actualizado y difundido por Kloos y Lambe en 1991, pero desde entonces se describieron varias especies nuevas.²²¹ En 1999, Freney y los miembros del subcomité de taxonomía de estafilococos y estreptococos del International Committee on Systematic Bacteriology (Comité Internacional de Bacteriología Sistemática) publicó un documento que establece los estándares mínimos para el género *Staphylococcus* y para la descripción de nuevas especies de estafilococos.¹²² En este documento, los estándares mínimos recomendados para las designaciones de especies nuevas se basan en los resultados de estudios fenotípicos y genotípicos en al menos cinco cepas aisladas en forma independiente. Los criterios fenotípicos y genotípicos para la identificación en las categorías de género y especie se enumeran en el recuadro 12-6.¹²² Los procedimientos convencionales para la identificación de estafilococos requieren numerosas pruebas bioquímicas laboriosas, que demandan tiempo y que no son fáciles de implementar como procedimiento habitual en un laboratorio clínico. Por fortuna, sólo se recuperan un escaso número de especies estafilocócicas de infecciones humanas importantes, y la mayoría de los equipos comerciales descritos más adelante servirán para este propósi-

Recuadro 12-6 Pruebas fenotípicas y genotípicas recomendadas para la identificación de estafilococos en las categorías de género y especie	
Categoría de género	Categoría de especie
Criterios fenotípicos: Reacción de Gram y morfología general Catalasa Oxidasa Movilidad Metabolismo aerobio/fermentativo Estructura de la pared celular Tipo de peptidoglucano Presencia de ácidos teicoicos Pruebas adicionales: Acidificación de glicerol Sensibilidad a la lisostafina Sensibilidad a la lisozima Sensibilidad a furazolidona y bacitracina Patrón de menaquinona Ácidos grasos celulares Fructosa-1,6-bisfosfato Clase idólase Criterios genotípicos: Contenido G+C Secuenciación de oligonucleótidos de rRNA	Criterios fenotípicos: Características y requerimientos de desarrollo Morfología de las colonias Pigmentación Sensibilidad a la novobiocina Actividad oxidativa/fermentativa sobre hidratos de carbono Actividades enzimáticas (nitrato reductasa, ADH, ODC, ureasa) Factor de aglutinación Coagulasa Pruebas adicionales: Hidratos de carbono adicionales Perfil del producto final de fermentación Producción de acetoina Sensibilidad a la fosfomicina Actividades enzimáticas (p. ej., β-GAL, β-GUR, lecitinasa, etc.) Sensibilidad a otros antibióticos, antisépticos, etc. Hemolisinas Actividades estafilolíticas Análisis de membrana (ácidos teicoicos, ácidos grasos, citocromos, etc.) Análisis de proteína A Criterios genotípicos: Hibridación de DNA-DNA Temperaturas de fusión/templado de DNA

to en gran parte de los laboratorios.^{194,216} Los laboratorios que deseen usar estos procedimientos pueden consultar las referencias al final del capítulo sobre formulaciones de medios y procedimientos de inoculación. En el cuadro 12-2 se presentan las características fenotípicas para la identificación de los estafilococos que se aíslan más a menudo en muestras clínicas humanas y la figura 12-1 es un algoritmo dicotómico que facilita la identificación de la mayoría de los aislamientos clínicos por métodos convencionales, aunque a veces pueden ser necesarias otras pruebas. En el cuadro 12-3 se incluyen los criterios fenotípicos para la identificación de especies humanas, animales y medioambientales del género *Staphylococcus*.

En el método de identificación convencional, se realizan ciertas pruebas bioquímicas usando medios entericos, como caldo nitrato, cultivos inclinados (“pico de flauta”) con agar urea y medios de caldo ornitina descarboxilasa y arginina dihidrolasa de Moeller. Las pruebas de utilización de hidratos de carbono se realizan en agar caldo violeta que contiene 1% de hidratos de carbono estériles, con incubación en aire ambiental a 35-37 °C. La suplementación con extracto de levadura (1-2%) puede ser necesaria para el desarrollo de cepas con requerimientos nutricionales especiales. Además de las pruebas bioquímicas y de la producción de ácido a partir de hidratos de carbono, Hebert y cols. mostraron que la sensibilidad a la poli-

mixina B (disco de 300 unidades) y la prueba de la pirrolidonil arilamidasa (PYR) (para la identificación de enterococos, cap. 13), también son útiles para la identificación de estafilococos coagulasa negativos.¹⁶³

Rhoden y cols. formularon en los CDC una aproximación convencional modificada para la identificación de los cocos grampositivos, catalasa positivos usando hidratos de carbono y pruebas bioquímicas junto con pruebas cromogénicas de enzima sustrato del sistema API Staph-Ident® (véase más adelante).³⁶⁷ Esta aproximación difirió de los métodos de identificación de referencia previos en que se asignó un sistema de código numérico para la serie de pruebas convencionales a fin de generar una base de datos similar a la de los sistemas comerciales, en vez de usar un análisis del “mejor acceso” basado en las reacciones incluidas en los cuadros de identificación. Se usaron las pruebas de selección para identificar morfología (tinción de Gram), designación de familia (prueba de la catalasa), agrupación de género (fermentación de la glucosa) y presencia de coagulasa libre y unida (prueba de aglutinación del látex StaphAurex® en tubo y en portaobjetos). Luego, se inoculó una serie de 18 pruebas primarias convencionales para la identificación. Se usó una serie de 11 pruebas adicionales confirmatorias para resolver la identidad de cepas problemáticas y biotipos raros o inusuales que se generaron a partir de la serie de pruebas iniciales. Usando 147 cepas de referencia, 388 cepas control bien caracterizadas y 289 aislamientos clínicos, este método identificó más del 95% de las especies *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Stomatococcus* probadas.³⁶⁷ Otros investigadores informaron esquemas de identificación convencional modificados para estafilococos que cuentan con combinaciones de números limitados de pruebas discriminatorias para la identificación de las especies estafilocócicas aisladas más comúnmente.^{187,306}

PRODUCCIÓN DE FOSFATASA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

En los esquemas tradicionales para la identificación de estafilococos coagulasa negativos, se informó que la actividad fosfatasa es positiva para las cepas de *S. epidermidis* y *S. xylosus* y negativa para otros estafilococos coagulasa negativos.^{250,420} Sin embargo, estudios posteriores demostraron que otras especies de estafilococos también puede producir enzimas fosfatasa. Usando cuatro métodos diferentes, Langlois y cols. encontraron actividad fosfatasa en todas las cepas de *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus* coagulasa positivas y en la mayoría de las cepas de *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* coagulasa negativas, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosus* y *S. warneri/hominis* después de 24 y 48 horas de incubación.²⁵⁰ La producción de actividad fosfatasa fue afectada por el pH y por la presencia de fosfato inorgánico (Pi) en el medio de cultivo. Sorro y cols. hallaron que todas las cepas de las distintas especies estafilocócicas fueron fosfatasa positivas cuando la prueba se realizó con un pH de 8 y cuando los microorganismos crecían en ausencia de Pi.⁴²⁰ Cuando crecieron en un medio suplementado con 0,3% de Pi, sólo las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. xylosus* eran fosfatasa positivas. Estos investigadores concluyeron que la actividad de fosfatasa era una propiedad más común entre las cepas humanas de lo que se pensaba antes y que esta actividad puede ser constitutiva en algunas especies y reprimida por fosfatos en otras.⁴²⁰

En la actualidad, no existen pruebas comerciales únicas para la detección de actividad fosfatasa en estafilococos, aunque varios sistemas de equipos comerciales (p. ej., API Staph-

Cuadro 12-2 Características fenotípicas para la diferenciación de especies de *Staphylococcus* comúnmente aisladas

PRUEBA	<i>S. AUREUS</i>	<i>S. EPIDERMIDIS</i>	<i>S. HAEMOLYTICUS</i>	<i>S. HOMINIS</i> SUBESP. <i>HOMINIS</i>	<i>S. HOMINIS</i> SUBESP. <i>NOVOBIOSEPTICUS</i>	<i>S. WARNERI</i>	<i>S. LUGDUNENSIS</i>	<i>S. SCHLEIFERI</i> SUBESP. <i>SCHLEIFERI</i>	<i>S. SAPROPHY-</i> <i>TICUS</i> SUBESP. <i>SAPROPHYTICUS</i>
Coagulasa	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Factor de aglutinación	+	—	—	—	—	—	+ ^l	+	—
Nucleasa termoestable	+	—	—	—	—	—	—	+	—
ODC	—	V—	—	—	—	—	+	—	—
PYR	—	—	+	—	—	—	+	+	—
Ureasa	V	+	—	+	+	+	V	—	+
Acetofina	+	+	+	V	V	+	+	+	+
Beta-galactosidasa	—	—	—	—	—	—	—	+ ^l	+
Fosfatasa alcalina	+	+	—	—	—	—	—	+	—
Polimixina B	R	R	S	S	ND	S	S/R	S	S
Novobiocina	S	S	S	S	R	S	S	S	R
Ácido producido en aerobiosis de:									
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+ ^l	+	—	+
Sacarosa	+	+	+	+ ^l	+ ^l	+	+	—	+
Manitol	+	—	V	—	—	V	—	—	V
Manosa	+	+ ^l	—	—	—	—	+	+	—
Trehalosa	+	—	+	V	—	+	+	V	+

ODC: ornitina descarboxilasa; PAL: fosfatasa alcalina; +: reacción positiva; —: reacción negativa; +^l: reacción positiva lenta; V: reacción variable; V—: reacción variable, la mayoría de las cepas negativas; S: sensible; R: resistente; ND: datos no disponibles.

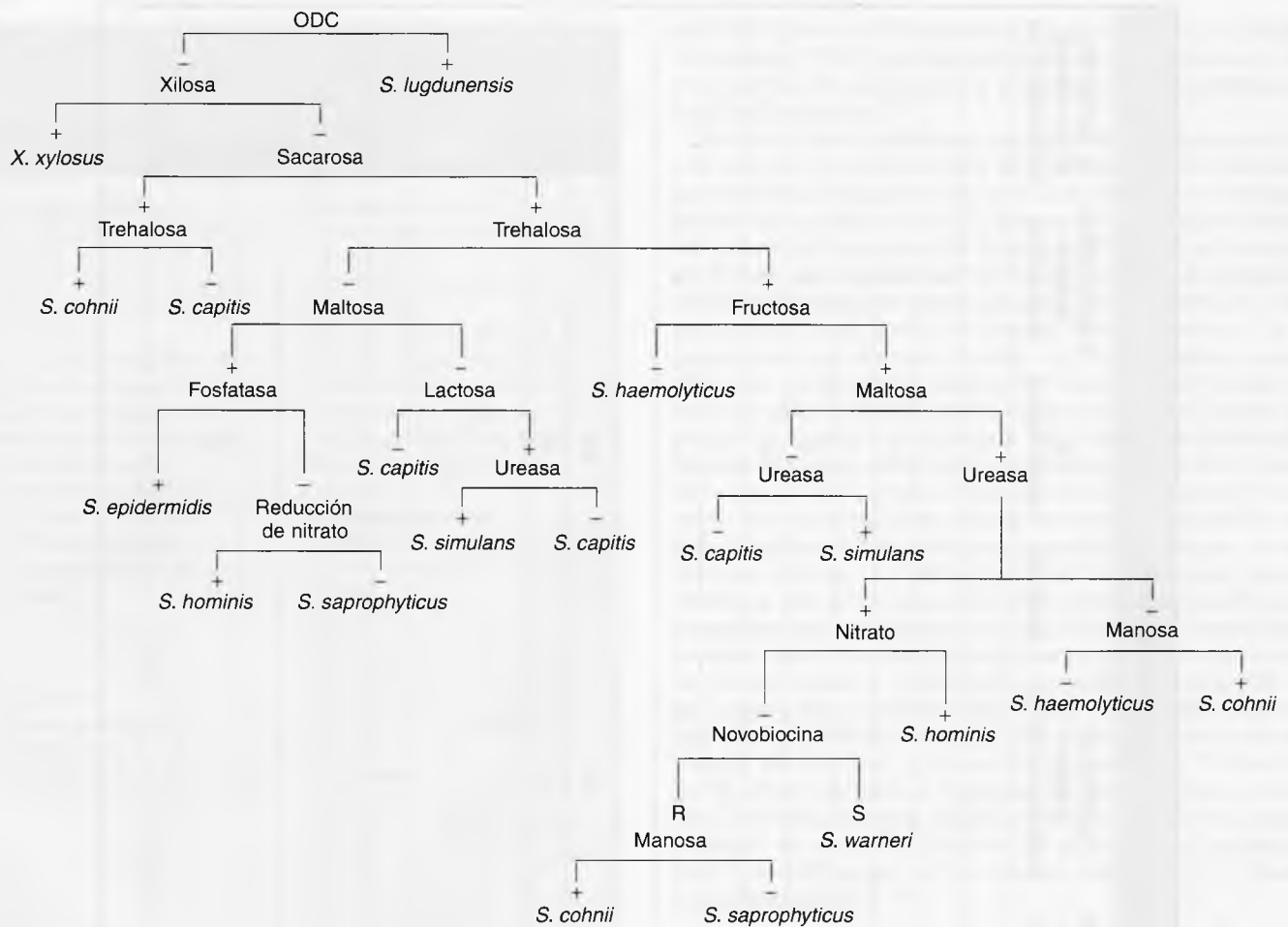


Figura 12-1 Claves dicotómicas para la identificación de los estafilococos coagulasa negativos humanos más comunes. ODC: ornitina descarboxilasa.

IDENT, API Staph, ID32Staph y RapiDEC Staph) incluyen una prueba de fosfatasa en la serie de pruebas bioquímicas. En estos sistemas, *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. hyicus* y la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* son fosfatasa positivas. Geary y Stevens informaron un método simple en agar (agar PNP) que usaba agar de Mueller-Hinton bufferado a pH 5,6-5,8 y que contenía *p*-nitrofenil-fosfato (0,495 mg/mL).¹³⁰ El medio con el microorganismo se inoculara en motas y se lee después de 18-24 horas de incubación. La presencia de color amarillo brillante debajo y alrededor del inóculo es un resultado positivo de la prueba. Geary y Stevens identificaron 305 cepas coagulasa negativas para especie y las probaron con agar PNP.¹³⁰ Encontraron que 83% de las 170 cepas de *S. epidermidis*, 17% de las siete cepas de *S. cohnii* y 75% de las cuatro cepas de *S. xylosus* eran PNP positivas, mientras que 124 aislamientos que representan otras seis especies (que incluyen 38 cepas de *S. saprophyticus*) eran PNP negativas.

ACTIVIDAD PIRROLIDONIL ARILAMIDASA

La prueba PYR también es útil como prueba fenotípica para la identificación de estafilococos coagulasa negativos. Como sucede con los enterococos, L-pirrolidoni- β -naftilamida se escinde por acción de la arilamidasa en L-pirrolidona y β -naftilamida libre, que se combina con el reactivo de PYR (*p*-dimetilaminocinamaldehído) para producir un color rojo. La prueba

se realiza con caldo PYR inoculado hasta aproximarse a la turbidez estándar n° 2 de McFarland. Después de 2 horas de incubación a 35 °C se agrega el reactivo PYR. La aparición de color rojo dentro de los 2 minutos constituye una prueba positiva, y es negativa si aparece amarillo, naranja o rosa. De modo alternativo, se puede usar cualquiera de los discos de prueba rápida PYR comerciales. La hidrólisis de PYR también se encuentra en algunos de los sistemas de equipos comerciales para la identificación de estafilococos. *S. aureus* y *S. epidermidis* son PYR negativos, mientras que *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis* y *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* son PYR positivos.

SENSIBILIDAD A LA POLIMIXINA B

La prueba de difusión en disco para sensibilidad a la polimixina B también es útil para identificar estafilococos coagulasa negativos. Puede realizarse en SBA junto con la de sensibilidad a la novobiocina (véase más adelante). Se prepara una suspensión del microorganismo en solución salina hasta alcanzar el equivalente a 0,5 del estándar de turbidez de la escala de McFarland y se siembra con hisopo en una placa para pruebas de difusión en disco de Bauer-Kirby. Se aplica un disco de polimixina B (300 unidades; BD Biosciences®) al inóculo y la placa se incuba toda la noche. La resistencia se indica por la presencia de una zona de menos de 10 mm. Las cepas sensibles

Cuadro 12-3 Características fenotípicas para la identificación de especies *Staphylococcus*

ESPECIE	COAGULASA	FACTOR DE AGLUTINACIÓN	DESARROLLO ANAEROBIO EN THIO	ENDONUCLEASA TERMOESTABLE	PAL	ADH	ODC	PYR	ACETOÍNA	REDUCCIÓN DE NO ₃	UREASA	B-GLU	B-GAL	B-GUR	OXIDASA MODIFICADA
<i>S. aureus</i> subesp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> subesp. <i>anaerobius</i>	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-	V ⁺	V	V	-	+	+	+	V	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>saprophyticus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	V	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>bovis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	V	+	+	V	V	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	V	-	V	-
<i>S. warneri</i>	-	-	+	-	-	V	-	-	+	V	+	+	-	V	-
<i>S. hominis</i> subesp. <i>hominis</i>	-	-	-	-	-	V	-	-	V	V	+	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> subesp. <i>novobiosepticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	+	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	-	-	+	-	V ⁺	+	-	+	V	+	+	-	+	V	-
<i>S. lugdunensis</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>schleiferi</i>	V-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>coagulans</i>	+	-	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	-
<i>S. capitis</i> subesp. <i>capitis</i>	-	-	+	-	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i> subesp. <i>urealyticus</i>	-	-	+	-	-	+	-	V	V	+	+	-	-	-	-
<i>S. auricularis</i>	-	-	V ⁺	-	-	V	-	V	-	V ⁺	-	-	Vd	-	-
<i>S. pasteurii</i>	-	-	+	-	-	V	-	-	V	V	+	+	-	+	-
<i>S. caprae</i>	-	-	+	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subesp. <i>cohnii</i>	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subesp. <i>urealyticus</i>	-	-	+	-	+	-	-	V	V	-	+	-	+	+	-
<i>S. xylosum</i>	-	-	V	-	V	-	-	V	V	V	+	+	+	+	-
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	+	-	V	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	-
<i>S. intermedius</i>	+	V	+	+	+	V	-	+	-	+	+	V	+	-	-
<i>S. hyicus</i>	V	-	+	+	+	+	-	-	-	+	V	V	-	+	-
<i>S. sciuri</i> subesp. <i>sciuri</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. sciuri</i> subesp. <i>carnaticus</i>	-	V	V ⁺	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. sciuri</i> subesp. <i>rodentium</i>	-	+	V ⁺	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. chromogenes</i>	-	-	+	-	+	+	-	V	-	+	+	V	-	-	-
<i>S. gallinarum</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	V	V	-
<i>S. lentus</i>	-	-	V ⁺	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. equorum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	ND	V	+	-
<i>S. delphini</i>	+	-	+	-	+	+	ND	ND	-	+	+	ND	ND	ND	-
<i>S. felis</i>	-	-	+	-	+	+	ND	ND	-	+	+	-	+	-	-
<i>S. lutrae</i>	+	-	+	V	+	-	ND	ND	-	+	+	ND	+	ND	-
<i>S. vitulinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	V	-	-	+
<i>S. muscae</i>	-	-	+	-	+	-	-	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	-
<i>S. kloosii</i>	-	-	-	-	V	-	-	V	V	-	V	V	V	V	-
<i>S. arlettae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	ND	V	+	-
<i>S. piscifermentans</i>	-	-	+	-	+	+	ND	ND	-	+	+	+	-	-	-
<i>S. condimenti</i>	-	-	+	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+	ND	+	-	ND
<i>S. succinus</i>	-	-	-	ND	+	-	ND	-	-	-	+	ND	ND	ND	-
<i>S. fleuretti</i>	-	-	+	-	V	-	-	-	-	+	-	ND	-	-	+
<i>S. carnosus</i> subesp. <i>carnosus</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>S. carnosus</i> subesp. <i>utilis</i>	-	-	+	ND	-	+	ND	ND	ND	V	-	ND	-	-	ND

(Continúa)

Cuadro 12-3 Características fenotípicas para la identificación de especies *Staphylococcus* (cont.)

ESPECIE	POLIMIXINA													N-ACETIL- GLUCOSAMINA
	B	NOVOBIOCINA	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	LACTOSA	MANITOL	MANOSA	ARABINOSA	TREHALOSA	XILOSA	RAFINOSA	CELOBIOSA	
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	R	S	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ND	S	+	+	+	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	R	S	+	+	+	V	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	S	R	+	+	+	V	V	-	-	+	-	-	-	V
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	ND	R	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>S. haemolyticus</i>	S	S	+	+	+	V	V	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	S	S	+	+	+	V	V	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	S	S	+	+	+	V	-	-	-	V	-	-	-	V
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	ND	R	+	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	S	S	+	+	+	+	+	V	-	V	-	-	-	+
<i>S. lugdunensis</i>	S/R	S	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	S	S	+	-	-	-	-	+	-	V	-	-	-	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	ND	S	+	-	V	V	V	+	-	-	-	-	-	ND
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	S	S	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	ND	S	+	+	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. auricularis</i>	S	S	+	+	V	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. pasteurii</i>	ND	S	+	V	+	V	V	-	-	+	-	-	-	ND
<i>S. caprae</i>	S	S	+	V	-	+	V	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	S	R	+	V	-	-	V	V	-	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	S	R	+	V	-	+	+	+	-	+	-	-	-	V
<i>S. xylosus</i>	S	R	+	+	+	V	+	+	V	+	+	-	-	+
<i>S. saccharolyticus</i>	ND	S	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND
<i>S. intermedius</i>	S	S	+	V	+	V	V	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	R	S	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	S	R	+	V	+	V	+	V	V	+	V	-	+	-
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>caraticus</i>	S	R	+	V	+	V	+	V	V	+	+	-	V	-
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	S	R	+	V	+	-	+	V	V	+	V	-	V	-
<i>S. chromogenes</i>	R	S	+	V	+	+	V	+	-	+	-	-	-	V
<i>S. gallinarum</i>	S	R	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. lentus</i>	S	R	+	V	+	V	+	+	V	+	V	+	+	V
<i>S. equorum</i>	ND	R	+	V	+	V	+	+	+	+	+	-	V	V
<i>S. delphini</i>	ND	S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND
<i>S. felis</i>	ND	S	+	-	V	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. lutrae</i>	ND	S	+	+	ND	+	V	+	ND	+	+	ND	ND	ND
<i>S. vitulinus</i>	ND	R	+	-	+	-	+	-	-	V	V	-	V	-
<i>S. muscae</i>	ND	S	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	ND
<i>S. klosteri</i>	S	R	+	V	V	V	+	-	V	+	V	-	-	-
<i>S. arlettae</i>	ND	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. piscifermentans</i>	ND	S	+	V	V	V	V	-	-	+	-	-	-	ND
<i>S. condimenti</i>	ND	ND	+	-	V	+	+	+	-	+	ND	-	-	ND
<i>S. succinus</i>	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	ND	V	ND	ND
<i>S. fleuretti</i>	ND	R	+	+	+	-	ND	+	V	+	V	-	-	ND
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	S	S	+	-	-	V	+	+	-	V	-	-	-	ND
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	V	ND	-	-	ND

+: reacción positiva; -: reacción negativa; V: reacción variable; +: reacción positiva lenta; V-: reacción variable, la mayoría de las cepas son negativas; V+: reacción variable pero con reacciones positivas lentas; ND: datos no disponibles; THIO: caldo tioglicolato; PAL: fosfatasa alcalina; ADH: arginina dihidrolasa; ODC: ornitina descarboxilasa; β -GLU: beta-glucosidasa; β -GAL: beta-galactosidasa; β -GUR: beta-glucuronidasa; S: sensible; R: resistente.

tienen zonas ≥ 10 mm. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* y algunas cepas de *S. lugdunensis* son resistentes a la polimixina.

PRUEBA DE ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC)

La prueba de ODC es la más útil para confirmar la identidad de *S. lugdunensis*, porque esta especie es la única ornitina descarboxilasa positiva. En un tubo con base de descarboxilasa y uno con base y agregado de ornitina (Remel®) se introducen inóculos abundantes y se cubren con aceite mineral estéril. En la incubación a 35 °C ambos tubos se tornarán de gris pálido a amarillo a medida que se fermenta la glucosa, tras lo cual la ornitina en el tubo de prueba se descarboxila; como resultado, el caldo ornitina se vuelve violeta. El tubo con base sola permanecerá amarillo y el tubo con ornitina permanecerá amarillo si no se produce ODC. Aunque las pruebas más positivas se pueden detectar dentro de las 6 a 8 horas, la prueba se lee después de las 24 horas de incubación. Esta prueba no está incluida en la mayoría de los equipos comerciales para la identificación de estafilococos y debe considerarse una prueba adicional.

PRODUCCIÓN DE UREASA

Algunos estafilococos son ureasa positivos, incluidos *S. epidermidis*, *S. intermedius* y la mayoría de las cepas de *S. saprophyticus*. Para esta prueba se puede usar el caldo ureasa común o el cultivo inclinado de agar urea. Cualquiera de ellos se inocula y se incuba a 35 °C durante 18-24 horas. Un cambio en el indicador rojo de fenol de amarillo a rosa/rojo es una prueba positiva.

PRODUCCIÓN DE ACETOÍNA

La producción de acetoina (la prueba de Voges-Proskauer) es útil para distinguir especies de *S. aureus*, que son acetoina positivas, de otras especies coagulasa positivas (*S. intermedius* y *S. hyicus*), que son acetoina negativas. La prueba de producción de acetoina entérica convencional (caldo MR-VP) o el método rápido en disco pueden usarse con iguales resultados.⁹⁰

SENSIBILIDAD A LA DEFEROXAMINA

En 1991 y 1993, Lindsay y cols. informaron una prueba nueva para la identificación específica de *S. epidermidis* y *S. hominis*.^{267,268} La prueba determina la sensibilidad a la deferoxamina, que es un sideróforo producido por *Streptomyces pilosus* y se usa para el tratamiento clínico de la sobrecarga de hierro crónica y aguda. Se realiza como una prueba de difusión en disco de modo similar a las pruebas de sensibilidad a furazolidona y bacitracina. Después de preparar una suspensión del microorganismo correspondiente a 0,5 de la escala de turbidez estándar de McFarland, se inocula una placa de agar BHI con la suspensión y se coloca un disco de 1 mg de deferoxamina (Desferal®; Ciba-Geigy, Suiza) en el inóculo. Después de toda la noche de incubación a 35 °C, se inspecciona la placa para observar una zona de inhibición del desarrollo alrededor del disco. En su estudio original, Lindsay y Riley encontraron que, entre 95 estafilococos coagulasa negativos, 57 cepas de *S. epidermidis* y 4 de *S. hominis* fueron sensibles a la deferoxamina, mientras que otras 34 fueron resistentes.²⁶⁸ En un estudio posterior de 161 estafilococos coagulasa negativos, todas las cepas de *S. epidermidis* y *S. hominis* fueron sensibles a la deferoxamina mientras que todos los estafilococos restantes fueron resistentes.²⁶⁷ Mulder probó 670 *S. epidermidis*, 37 *S. hominis*

y otros 151 estafilococos coagulasa negativos para la sensibilidad a la deferoxamina usando una prueba de disco (50 µL por disco de una solución de deferoxamina al 2%) y encontró que todas las cepas de *S. epidermidis* y *S. hominis* eran sensibles a la deferoxamina, mientras que sólo 5 (3,3%) de los 151 aislamientos identificados como otras especies estafilocócicas lo eran.³⁰⁹ Monsen y cols. también evaluaron esta prueba y encontraron que las 139 cepas de *S. epidermidis* y las 18 de *S. hominis* eran sensibles a la deferoxamina, y mostraron zonas de inhibición de 28-31 mm y 15-41 mm, respectivamente.³⁰⁶ Todos los otros estafilococos coagulasa negativos probados en este estudio eran altamente resistentes a la deferoxamina. Mientras la deferoxamina puede comprarse en el comercio, hasta el momento los discos de prueba de sensibilidad estandarizados deben prepararse en el laboratorio.

Sensibilidad a la novobiocina para la identificación de *Staphylococcus saprophyticus*

Cuatro especies estafilocócicas humanas (*S. saprophyticus*, subespecies de *S. cohnii*, *S. hominis* subespecie *novobiosepticus*, y *S. xylosus*), siete especies animales (*S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. arlettae* y *S. vitulinus*) y una especie medioambiental (*S. succinus*) son resistentes a la novobiocina, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) $\geq 1,6$ µg/mL.^{220,226,228,247,389-391,487} Como las especies resistentes a la novobiocina que no sean *S. saprophyticus* no se encuentran con frecuencia en muestras clínicas humanas, la prueba de sensibilidad a la novobiocina provee un método útil para la identificación de *S. saprophyticus*. La prueba de la novobiocina se realiza como una prueba de sensibilidad en disco usando un disco de novobiocina (5 µg) y se describe en detalle en el protocolo 12-2 (lámina en color 12-3B, C y D). Las cepas resistentes a la novobiocina mostrarán zonas de inhibición que miden de 6 mm (no zona) a 12 mm; las cepas sensibles mostrarán zonas de 16 mm a 27 mm. Esta prueba se describió en principio usando un medio llamado agar P, que no se comercializa. Sin embargo, estudios con medios de rutina antes mencionados han mostrado que se obtienen resultados comparables.¹⁴¹

En un intento por determinar la confiabilidad y la exactitud de la prueba de sensibilidad a la novobiocina, McTaggart y Elliott analizaron 36 cepas que presuntivamente eran *S. saprophyticus* (microorganismos resistentes a la novobiocina en muestras de orina de pacientes con infecciones urinarias) con un sistema de identificación comercial (API Staph-Ident®, véase más adelante) y con series ampliadas de sustratos adicionales, que incluyen pruebas de utilización de hidratos de carbono, derivados de 7-amino-4-metilumbeliferona de ésteres y glucósidos orgánicos e inorgánicos, y derivados de 7-amino-4-metilcumarina de aminoácidos.²⁹² De las 36 cepas, 21 (58%) fueron identificadas como *S. saprophyticus*, 3 cepas no pudieron ser identificadas, 9 cepas tenían características atribuibles a más de una especie resistente a la novobiocina y 3 cepas fueron identificadas como *S. epidermidis*, *S. hominis* y *S. simulans*, respectivamente. Incluso cepas que fueron identificadas como *S. saprophyticus* por el Staph-Ident producían un espectro de reactividades con los otros sustratos cromogénicos, lo que ilustra la heterogeneidad de los microorganismos llamados "*S. saprophyticus*" y sugiere que en realidad pueden representar un grupo heterogéneo de cepas resistentes a la novobiocina relacionadas desde el punto de vista genotípico y fenotípico. Estos investigadores concluyeron que se necesitan más pruebas para la identificación presuntiva confiable de *S. saprophyticus* además de la prueba de sensibilidad a la novobiocina. Cepas

humanas ocasionales que no son *S. saprophyticus*, subespecies de *S. cohnii*, *S. hominis* subespecie *novobiosepticus*, o *S. xylosus* también pueden ser resistentes a la novobiocina. En una evaluación del RapiDEC-Staph, Janda y cols. encontraron que, mientras todos los aislamientos de *S. saprophyticus* eran resistentes a la novobiocina, 5 (7%) de las 74 cepas de *S. epidermidis* también lo eran.¹⁹²

Sistemas de Identificación comerciales

En la actualidad se comercializan varios equipos para la identificación de estafilococos coagulasa negativos. Todos ellos usan pruebas de fermentación de hidratos de carbono modificadas, adaptaciones de las pruebas estándares de identificación bacteriológica (p. ej., reducción de nitrato, ureasa, Voges-Proskauer) y las pruebas cromogénicas de enzima sustrato para la identificación de microorganismos. Estos sistemas se adaptan al formato particular usado por el fabricante (p. ej., tiras con pequeñas cúpulas, bandejas microtituladoras, tarjetas plásticas).

RAPIDEC STAPH®

RapiDEC Staph® (bioMérieux) es un equipo comercial que identifica *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* dentro de las 2 horas. El aislamiento para ser identificado se emulsiona en agua y la suspensión se distribuye en cuatro cúpulas. La primera cúpula es un control, mientras las otras contienen un sustrato coagulasa fluorescente (véase la prueba "Aureasa" ya mencionada), un sustrato fosfatasa alcalina (PAL) y un sustrato β -galactosidasa (β GAL), respectivamente. Después de 2 horas de incubación, las cúpulas se observan bajo luz ultravioleta (longitud de onda 365 nm). Si la fluorescencia es mayor en la segunda cúpula que en la primera cúpula control, el aislamiento se identifica como *S. aureus*. Si la prueba es negativa, las otras dos cúpulas se leen ya sea en forma directa (cúpula 3) o después del agregado de un reactivo de detección (cúpula 4). Una reacción positiva en la cúpula 3 o 4 identifica la cepa como *S. epidermidis* (fosfatasa alcalina positiva) o *S. saprophyticus* (β -galactosidasa positiva), respectivamente. Los resultados positivos en las pruebas PAL y β GAL proveen una identificación presuntiva de *S. xylosus*/*S. intermedius*. En una evaluación, RapiDEC Staph identificó de modo correcto el 100% de las 130 cepas de *S. aureus*, mientras que lo hizo sólo en el 70% de las 74 cepas de *S. epidermidis* y en el 81% de las 32 cepas de *S. saprophyticus*.¹⁹² Entre otros 62 aislamientos coagulasa negativos probados, 4 cepas de *S. sciuri* fueron mal identificadas como *S. epidermidis* y 8 aislamientos (uno *S. hominis*, tres *S. cohnii* subespecie *urealyticum*, tres *S. simulans* y uno *S. kloosii*) fueron mal identificados como *S. saprophyticus*. Mientras la prueba PAL en el RapiDEC Staph parece ser relativamente específica para la detección de la fosfatasa de *S. epidermidis*, cepas de esta especie fosfatasa negativas o que producen bajos niveles de la enzima no serán identificadas como *S. epidermidis* por este equipo. Como consecuencia, la sensibilidad y el desempeño de RapiDEC Staph para identificar *S. epidermidis* depende de la prevalencia relativa de cepas PAL negativas y positivas en la población.¹⁹²

API STAPH-IDENT®

El producto API Staph-Ident® (bioMérieux) usa una serie de 10 pruebas bioquímicas en miniatura que se inoculan con una suspensión densa del microorganismo por identificar. La iden-

tificación de especie se determina por la generación de un código octal de cuatro dígitos derivado de las pruebas positivas de tira y de la base de datos. Se pueden requerir otras pruebas (p. ej., ácido de xilosa, sensibilidad a la novobiocina) para identificar algunas cepas. La base de datos de este sistema incluye varias especies o subespecies de estafilococos, micrococos y *R. mucilaginosa*. Los microorganismos que se denominan *R. mucilaginosa* en Staph-Ident requieren confirmación; las recomendaciones incluyen sensibilidad a la lisostafina para separar el microorganismo de los estafilococos, y catalasa y desarrollo en caldo salado para separar el microorganismo de *K. kristinae*. Staph-Ident ha sido evaluado en forma extensa, y el acuerdo con los procedimientos convencionales se extiende del 43% al 95%, según la especie probada.^{99,135,145,185,227} Rhoden y Miller publicaron un estudio prospectivo de 4 años que comparó el API Staph-Ident con los métodos de referencia en 1 106 aislamientos y encontraron un acuerdo total del 81,1%.³⁶⁸ El acuerdo para los cinco aislamientos más comunes fue 97,1% para *S. epidermidis*; 82,5% para *S. hominis*; 77,2% para *S. aureus*; 75,8% para *S. haemolyticus* y 64,1% para *S. warneri*. Estos investigadores concluyeron que la base de datos del sistema Staph-Ident actual es inadecuada para la identificación de las especies estafilocócicas comunes y poco comunes.³⁶⁸

API STAPH®

API Staph® (antes API Staph-Trac; bioMérieux) es un sistema de identificación de 18 a 24 horas para micrococos y estafilococos. Contiene 19 pruebas distribuidas en un formato de tira y se inocula con una suspensión de microorganismos preparada en un medio de caldo con extracto de levadura y peptona provisto con el equipo. Después de leer las reacciones bioquímicas, se genera un código octal de siete dígitos y se obtiene la identificación del microorganismo con la ayuda de la base de datos del ordenador (lámina en color 12-3B y H). La base de datos consiste en 25 taxones e incluye estafilococos de origen humano y veterinario, especies de *Micrococcus*, y *R. mucilaginosa*. Aunque la base de datos de este sistema es grande, no ha sido evaluada extensamente.¹³⁵ Un estudio de Perl y cols. encontró que el sistema API Staph identificó de modo correcto el 73% de 277 estafilococos coagulasa negativos.³⁴² Mientras el 94% de 94 cepas de *S. epidermidis* fueron identificadas en forma correcta, el sistema tuvo un mal desempeño en el caso de cepas menos comunes, como *S. haemolyticus* (correcto, 85%), *S. hominis* (correcto, 75%), *S. simulans* (correcto, 67%) y *S. warneri* (correcto, 22%).

API ID32 STAPH®

ID32 Staph® (bioMérieux) es un sistema de tira que requiere 24 horas para la identificación de estafilococos y especies relacionadas. El panel contiene 32 cúpulas y en la actualidad tiene 26 pruebas bioquímicas. El sistema puede ser leído en forma manual para generar un número de perfil que se interpreta con una base de datos asistida por ordenador (lámina en color 12-2H), o bien, la tira puede usarse con el sistema ATB bioMérieux automatizado, que incluye un densitómetro, un inoculador, un lector, un microordenador y una impresora. El ID32 Staph tiene la base de datos más extensa de todos los sistemas, con todas las especies estafilocócicas humanas (excepto *S. saccharolyticus*) e incluye varias especies animales y medioambientales. También identifica seis especies de micrococos y *R. mucilaginosa*. Una evaluación internacional con 792 cepas llevada a cabo en ocho laboratorios encontró que ID32 Staph identificó de modo correcto 95,5% de los aislamientos proba-

dos: 83,5% fueron identificados sin pruebas posteriores, mientras que para un 12% de cepas adicionales, la identificación correcta fue entre las elecciones propuestas.⁴⁹ Sólo el 1,2% de las cepas fueron mal identificadas, y el 3,3% no fueron identificadas por ID32 Staph. En otro estudio de 440 aislamientos estafilocócicos coagulasa negativos consecutivos, Ieven y cols. informaron que el panel ID32 Staph identificó el 95,2%.¹⁸⁷ *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* y *S. capitis* fueron identificados con una exactitud del 98-100%.¹⁸⁷ Renneberg y cols. encontraron que el panel ID32 Staph® identificó el 79,5% de 200 aislamientos estafilocócicos clínicos y de referencia.³⁶⁶ Otros investigadores europeos pusieron a prueba el sistema con una recolección de 42 cepas que no podían ser clasificadas mediante otros procedimientos fenotípicos disponibles y hallaron que sólo 22 (52%) fueron identificadas por el ID32 Staph.⁷⁴

TARJETA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GRAMPOSITIVOS VITEK (GPI)®

Vitek GPI® (bioMérieux) es una tarjeta para la identificación de microorganismos grampositivos diseñada para usar con el sistema de prueba identificación/sensibilidad bacteriana Vitek automatizado. Las tarjetas contienen 30 pocillos (28 de prueba y 2 controles) que contienen sustratos para la identificación de especies de *Staphylococcus* (11 especies humanas y 4 veterinarias), especies de *Streptococcus* y varias especies bacilares grampositivas (p. ej., especies *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Listeria monocytogenes*). Se prepara una suspensión del microorganismo en solución salina, se fija la tarjeta a la suspensión bacteriana mediante un tubo transportador y se coloca en el módulo de llenado del instrumento. La tarjeta se inocula por un método de vacío/descarga. Luego se coloca en el módulo incubador/lector del instrumento Vitek, se rastrea por un mecanismo óptico y se lee en forma periódica. La identificación de estafilococos coagulasa negativos por lo general requiere 10 a 13 horas. Bannerman y cols. evaluaron la base de datos GPI actualizada con 500 cepas clínicas.²² La concordancia total entre la tarjeta GPI y los métodos convencionales fue del 89%. La tarjeta identificó el 92% de las cepas de *S. epidermidis*, el 95% de las de *S. haemolyticus*, el 88% de las de *S. capitis* subespecie *capitis* y el 100% de las cepas de *S. saprophyticus* probadas. Los microorganismos que no están en la base de datos, como *S. lugdunensis*, eran mal identificados o no identificados por la tarjeta GPI. En la evaluación realizada por Perl y cols. en 1994, la tarjeta identificó correctamente sólo el 67% de 185 aislamientos.³⁴² Estos investigadores señalaron que el escaso desempeño de la tarjeta GPI en su estudio pudo haberse debido a la preponderancia de estafilococos "no *epidermidis*" entre los 277 aislamientos probados. En 1996, Kellog y cols. pusieron a prueba la tarjeta GPI con 616 cepas clínicas de estafilococos coagulasa negativos.²¹² La tarjeta identificó el 100% de 12 cepas de *S. capitis* y de 79 cepas de *S. saprophyticus*, el 98,4% de 250 cepas de *S. epidermidis* y el 96% de 126 cepas de *S. haemolyticus*. Sólo el 64,5% de los 107 aislamientos restantes fue identificado correctamente.²¹² Todos estos estudios han concluido que la tarjeta GPI no es confiable para identificar las especies estafilocócicas menos comunes y la base de datos para este producto necesita mejoras. La tarjeta GPI para el instrumento Vitek 2 aguarda una evaluación clínica.

PANEL MICROSCAN RAPID POS COMBO®

El panel MicroScan Rapid Pos Combo® (Dade/MicroScan) es un sistema en formato de placa de microtitulación que usa

sustratos fluorogénicos y un indicador de pH fluorescente para detectar varias actividades enzimáticas bacterianas.²¹⁹ Contiene 42 pruebas para la identificación de estafilococos, estreptococos y listerias. Las pruebas están basadas en la hidrólisis de los sustratos fluorogénicos, cambios de pH seguidos a la utilización de sustratos y la producción de productos metabólicos específicos. El sistema se inocula con una suspensión del microorganismo y se incuba y lee en el instrumento MicroScan Walk/Away. Las identificaciones están disponibles 2 horas después de la incubación del panel. En una evaluación canadiense de este sistema, el panel MicroScan Rapid Pos Combo identificó correctamente el 91,6% de 239 aislamientos estafilocócicos.⁴²⁸ Para un 3,8% adicional de los aislamientos, la identificación correcta se hallaba en la lista de elección de especies provista por la base de datos. Otra evaluación de Portland, Oregon, encontró que el panel identificó sólo el 50,5% de 233 aislamientos, con un 24,9% adicional que tienen la identificación correcta entre las posibilidades generadas por la base de datos.¹⁴⁴ Weinstein y cols. encontraron que, mientras el sistema identificaba de modo exacto *S. epidermidis* y varios otros estafilococos coagulasa negativos, más de la mitad de las cepas de *S. haemolyticus* y *S. hominis* fueron mal identificadas.⁴⁸⁹

PANEL MICROSCAN POS ID®

El sistema del panel MicroScan Pos ID® (Dade/MicroScan) ofrece la combinación de las capacidades de identificación y pruebas de sensibilidad para microorganismos grampositivos, incluidos micrococcos, estafilococos, estreptococos, enterococos y listerias. El panel contiene 27 pruebas bioquímicas de identificación convencionales en miniatura, 18 de las cuales se usan para la identificación de estafilococos y especies relacionadas. Los paneles liofilizados se reconstituyen, inoculan e incuban durante 24 a 48 horas y se leen en forma manual o con el sistema MicroScan Walk/Away automatizado. Los resultados de las pruebas se computan en un código de seis dígitos y la base de datos del sistema provee una identificación. En una evaluación, el panel proporciona la identificación exacta de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, pero sólo después de 48 horas de incubación.¹⁸⁵ Se identificaron otras especies de *Staphylococcus* con menos confiabilidad dentro del mismo período. Skulnick y cols. analizaron 163 aislamientos estafilocócicos y encontraron que el panel MicroScan identificó el 96% de ellos; los microorganismos que estaban mal identificados fueron dos cepas de *S. haemolyticus* y una sola cepa de *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y *S. sciuri*.⁴¹³ Kloos y George también encontraron que este sistema identificaba correctamente la mayoría de los aislamientos estafilocócicos humanos con una exactitud mayor del 80%.²¹⁹ Una evaluación más reciente informó que el sistema identificaba sólo el 53,6% de 233 aislamientos estafilocócicos, con un 24,9% adicional de aislamientos cuya identificación correcta se hallaba en la lista de elecciones posibles de la base de datos del ordenador.¹⁴⁴

SISTEMA BBL CRISTAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GRAMPOSITIVOS (GP)®

El sistema BBL Cristal GP® (BD Biosciences) es un panel de identificación en miniatura que consiste en 29 pruebas convencionales fluorogénicas, cromogénicas y modificadas para la identificación de cepas grampositivas que pertenecen a varios géneros, como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Lactococcus*. El sistema se inocula con una suspensión de microorganismos

(0,5 del estándar de turbidez de McFarland), se incubó durante 18-24 horas a 35-37 °C en atmósfera ambiental y se lee con visor especial del panel del sistema Cristal. Von Baum y cols. evaluaron el sistema usando 77 cepas de especies de *Staphylococcus*, 5 de especies de *Micrococcus* y una única cepa de *R. mucilaginosa*.⁴⁷³ El BBL Cristal identificó correctamente el 100% de 22 cepas de *S. aureus* y 24 de *S. epidermidis*. Entre 31 cepas que representan otras 10 especies coagulasa negativas, 29 fueron bien identificadas. Todos los aislamientos de micrococos y el aislamiento de *R. mucilaginosa* se identificaron en forma correcta. Mientras el sistema Cristal parece ser útil para la identificación de estafilococos importantes desde el punto de vista clínico, se necesitan otros estudios debido al escaso número de cepas analizadas en la evaluación anterior y la omisión de incluir otras especies importantes, como *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* y *S. caprae*.

SISTEMA STAF 18-R®

El sistema Staf 18-R® (Liofilchem s.r.l. Roseto degli Abruzzi, Teramo, Italia) consiste en una cubeta plástica que contiene 18 sustratos convencionales modificados. Los pocillos se inoculan con una suspensión del microorganismo que usa una pipeta multicanal y el panel se incubó y se lee después de 18 a 24 horas. Piccolomini y cols. evaluaron este sistema con 523 cepas pertenecientes a 18 especies humanas de *Staphylococcus* y encontraron que 491 cepas (93,9%) fueron identificadas correctamente, y otras 28 cepas (5,4%) requirieron pruebas suplementarias para la identificación completa.³⁴⁴ Como en el caso de muchos de estos equipos, los autores señalaron la necesidad de ajustar la base de datos y de seleccionar pruebas más discriminatorias para identificar en forma correcta cepas importantes, como *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*.

STAPH-ZYM®

El Staph-Zym® (ROSCO, Taastrup, Dinamarca) es un sistema escandinavo nuevo de identificación compuesto por una tira plástica de 10 minitubos que contiene sustratos convencionales modificados y cromogénicos deshidratados. Los microtubos individuales se inoculan con una alícuota de una suspensión bacteriana preparada en solución salina y los resultados se leen después de la incubación de toda la noche. Renneberg y cols. lo probaron con 111 cepas estafilocócicas de referencia y 89 aislamientos clínicos y encontraron que identificaba de modo correcto el 90-100% de las cepas de referencia y el 82,1% de los aislamientos clínicos, con una exactitud del 91,5% en comparación con los métodos de identificación convencionales.³⁶⁶ En otra evaluación, el Staph-Zym identificó correctamente el 97,5% de 440 aislamientos cuando se los comparó con las identificaciones de referencia.¹⁸⁷ El Staph-Zym parece ser un sistema exacto para la identificación estafilocócica.

MICROBACT STAPHYLOCOCCAL 12S®

El Microbact Staphylococcal 12S® (Oxoid) es un sistema de 12 pruebas basado en la acidificación de hidratos de carbono y en la detección de enzimas usando sustratos cromogénicos. Los pocillos de la tira se inoculan con una suspensión del microorganismo y la tira se incubó toda la noche a 35 °C. Después del agregado de los reactivos que desarrollan color para las pruebas enzimáticas, las pruebas se leen e interpretan de acuerdo con la base de datos incluida en el inserto del envase. No están disponibles evaluaciones de este nuevo sistema.

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

El Microbial Identification System (Sistema de identificación microbiana, MIS® o MIDI®; Microbial ID, Newark, DE) utiliza la cromatografía gas líquido (GLC) de alta resolución de derivados de ácidos grasos celulares para la identificación de bacterias.³⁹ La base de datos del sistema está compuesta de colecciones de perfiles de ácidos grasos celulares de varias bacterias y compara la composición de los aislamientos individuales con la de las cepas de la base de datos mediante un programa de reconocimiento del patrón/matriz de covariancia. Se usa un índice similar para expresar el parentesco de un perfil de un microorganismo desconocido con los perfiles representativos de microorganismos conocidos. En una evaluación comparativa con los procedimientos convencionales para identificar estafilococos, el sistema MIS mostró concordancia completa con estos métodos para el 87,8% de 470 aislamientos probados.⁴²⁷ El sistema identificó todas las cepas de *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. sciuri* y *S. xylosus*. Las cepas de *S. hominis* y *S. saprophyticus* dan cuenta de más de la mitad de las identificaciones erróneas obtenidas con el sistema. La propuesta GLC usada en MIS se muestra promisorio como método alternativo para la identificación de especies de estafilococos.

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN BIOLOG MICROPLATE®

El sistema de identificación Biolog MicroPlate® (Biolog, Hayward, CA) identifica microorganismos sobre la base de la oxidación de diversos sustratos. El sistema usa una bandeja de microtitulación de 96 pocillos con 95 sustratos más un pocillo control sin sustrato. La placa se inocula con una suspensión del microorganismo y se incubó durante 4 o 24 horas. Si el microorganismo oxida un sustrato en un pozo individual, la respiración del microorganismo durante la asimilación oxidativa del sustrato causa la reducción de un colorante indicador tetrazolio, que torna el pozo de incoloro a violeta. En la actualidad, el sistema Biolog MicroPlate incluye la GN MicroPlate para la identificación de 569 especies gramnegativas y la GP Biolog MicroPlate, el que incluye 225 microorganismos grampositivos en su base de datos. Miller y Biddle, en los CDC, y Quenzer y McLaughlin en la University of New Mexico realizaron una evaluación conjunta de la GP Biolog MicroPlate para la identificación de 113 aislamientos catalasa positivos, incluidos 33 tipos de cepas de estafilococos, 5 cepas de especies de *Micrococcus* y 1 cepa de *R. mucilaginosa*.³⁰¹ Estos investigadores encontraron que la exactitud total del sistema fue 69% y 73% en los CDC y en los laboratorios de New Mexico, respectivamente. Estos resultados indican que el sistema Biolog no es todavía lo suficientemente exacto para ser usado como método de rutina para la identificación de estafilococos coagulasa negativos y los microorganismos relacionados.

Métodos moleculares para identificación y tipificación de estafilococos

Diversas pruebas que emplean métodos moleculares recién desarrollados y métodos tradicionales se han usado para identificar estafilococos y caracterizar cepas en estudios epidemiológicos y en brotes de cepas multirresistentes o inusuales. Antes, los estudios epidemiológicos estaban basados en marcadores fenotípicos tales como reacciones bioquímicas o utilización de hidratos de carbono poco comunes, patrones de sensibilidad a los antibióticos, serotipificación, biotipificación y sensibilidad ante series de bacteriófagos.^{415,443} Otros estudios,

Cuadro 12-4 Características fenotípicas para la identificación de *Micrococcus* y especies relacionadas

Especies	Disposición celular				Catalasa	Oxidasa	Pigmentación	ADH	Reducción de nitrato
	Pares	Tétradas	Cubos	Grupos					
<i>Arthrobacter agilis</i>	+	+	–	+	+	+	Rojo-rosada	–	–
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	+	+	–	+	+	+	Naranja	–	V
<i>Kocuria rosea</i>	+	+	–	+	+	V–	Naranja-rosada a roja	–	+
<i>Kocuria varians</i>	–	+	–	+	+	–	Amarillo intenso	–	+
<i>Kocuria kristinae</i>	–	+	–	+	+	+	Crema pálido a naranja pálido	–	–
<i>Kocuria palustris</i>	+	+	+	–	+		Amarillo pálido	–	+
<i>Kocuria rhizophila</i>	+	+	+	–	+	–	Amarillo	–	–
<i>Kocuria polaris</i>						+	Naranja		+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	–	+	+	–	+	–	Blanco a amarillo manteca	+	V
<i>Kytococcus schroeteri</i>	+	+	–	–	+	–	Amarillo turbio	+	–
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+	+	+	+	Amarillo a amarillo verdoso	–	–
<i>Micrococcus lylae</i>	+	+	+	+	+	+	Blanco	–	–
<i>Micrococcus antarcticus</i>	+	–	+	+	+	+	Amarillo, mucoide	–	+
<i>Nesterenkonia halobia</i>	+	+	–	+	+	+	No pigmentada	–	–
<i>Nesterenkonia lacusekhoensis</i>	ND	ND	ND	ND	+	–	Amarillo brillante	ND	–
(Continúa)									

Cuadro 12-4 Características fenotípicas para la identificación de *Micrococcus* y especies relacionadas (cont.)

ESPECIES	MOVILIDAD	UREASA	HIDRÓLISIS DE:			ÁCIDO EN AEROBIOSIS DE:					
			Esculina	Almidón	Gelatina	Glucosa	Glicerol	Lactosa	Manitol	Manosa	Xilosa
<i>Arthrobacter agilis</i>	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	–	V+	–	V	+	V	–	–	–	–	–
<i>Kocuria rosea</i>	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Kocuria varians</i>	–	+	–	–	+ ^d	+	ND	ND	–	–	+
<i>Kocuria kristinae</i>	–	V	+	–	–	+	ND	ND	–	+	–
<i>Kocuria palustris</i>	–	–	–	–	–	+	ND	ND	–	–	–
<i>Kocuria rhizophila</i>	–	–	–	–	+	+	ND	ND	–	+	–
<i>Kocuria polaris</i>	–	–	–	+	–	+	ND	ND	+	–	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Kytococcus schroeteri</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Micrococcus luteus</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Micrococcus lylae</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Micrococcus antarcticus</i>	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Nesterenkonia halobia</i>	–	–	ND	+	ND	+	+	+	+	+	+
<i>Nesterenkonia lacusekhoensis</i>	–	ND	ND	–	ND	–	ND	–	–	ND	–

^aBastones cortos con ramificaciones, predominan los cocos en cultivos viejos.
 +: reacción positiva; –: reacción negativa; V: reacción variable; V+: reacción variable pero la mayoría de las cepas son positivas; V–: reacción variable pero la mayoría de las cepas son negativas; +^d: reacción positiva débil.

como el análisis proteico de la célula completa usando electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía gas-líquido, cromatografía líquida de alta presión, espectrometría de masa y electroforesis de enzimas multilocus, son más discriminatorios para reconocer similitudes y diferencias entre cepas, pero son costosos e insumen mucho tiempo.^{39,345,447} La SDS-PAGE de las proteínas celulares totales y de las proteínas de unión a la penicilina y la cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares han mostrado el 92% a más del 95% de concordancia con procedimientos fenotípicos para la identificación y tipificación de estafilococos coagulasa negativos.^{236,345}

Las técnicas genéticas y moleculares más nuevas han ganado popularidad como métodos altamente discriminatorios y de relativo bajo costo para la identificación, tipificación epidemiológica y caracterización de cepas de *S. aureus* y para la identificación y caracterización de estafilococos coagulasa negativos. Estos métodos incluyen análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de ácidos nucleicos de plásmidos, ribosómicos y cromosómicos, electroforesis en gel de campo pulsado del DNA total, ribotipificación, reacción en cadena de la polimerasa/procedimientos de hibridación de sondas de ácidos nucleicos, análisis de inserción de elementos y regiones espaciadoras intergénicas de 16S-23S rRNA por PCR, clonación/secuenciación de los genes de proteínas de choque térmico, análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la coagulasa de *S. aureus* y de los genes de la proteína A, hibridación in situ dirigida por 16S rRNA y secuenciación de 16S sRNA.^{38,41,76,95,138,139,179,180,243,245,295,324,325,416,434,459,472}

Estos procedimientos se han usado para investigar los brotes de *S. aureus* resistentes a la oxacilina en recién nacidos y adultos en unidades de cuidados intensivos, la diseminación de *S. haemolyticus* resistente a la vancomicina en pacientes y cuidadores, y la variación fenotípica e identificación de otros estafilococos coagulasa negativos (p. ej., *S. schleiferi*) aislados en infecciones graves. Tales técnicas también han sido útiles en estudios diseñados para identificar a individuos colonizados y para rastrear las fuentes de microorganismos causantes de infecciones, como la relación entre la portación de una cepa particular de *S. aureus* en la nariz de los pacientes y de sus cuidadores y el desarrollo posterior de peritonitis relacionada con diálisis peritoneal ambulatoria continua.³⁴⁷ Estos métodos también se están aplicando al análisis taxonómico de microorganismos y, al respecto, han revolucionado

los conceptos de parentesco de microorganismos, clasificación e identificación.

Identificación de *Micrococcus* y especies relacionadas

En los laboratorios, los micrococos y las especies relacionadas no suelen identificarse en la jerarquía de especies porque son pocos importantes desde el punto de vista clínico. Usando las pruebas descritas con anterioridad y en el cuadro 12-1, los laboratorios pueden emitir informes de "especie *Micrococcus*" sin otras pruebas. Sin embargo, con el reconocimiento de estos agentes como patógenos oportunistas a veces es necesario identificarlos como especie. Los criterios de identificación para los miembros recién reclasificados del antiguo género *Micrococcus* se presentan en el cuadro 12-4. Como ya se mencionó, estos microorganismos también se incluyen en la base de datos de algunos de los equipos comerciales usados en los laboratorios.

Identificación de *Rothia mucilaginosa*

Las colonias de *R. mucilaginosa* son viscosas o mucosas, claras a blancas y adherentes a la superficie del agar. Aparecen en los extendidos teñidos con Gram como grandes cocos gram-positivos dispuestos en pares o en grupos. Son catalasa positivos débiles, aunque algunas cepas son catalasa negativas. *R. mucilaginosa* puede diferenciarse de especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus* por su falta de crecimiento en medio agar nutritivo que contiene 5% de NaCl y por la presencia de una cápsula.^{29,30} Estos microorganismos también se incluyen en la base de datos de los sistemas API Staph-Ident®, API Staph® e ID32 Staph®. Otras características bioquímicas se observan en el cuadro 12-5. El medio usado para la identificación entérica puede ser inoculado para determinar las reacciones bioquímicas para este microorganismo y las pruebas de utilización de hidratos de carbono pueden realizarse con medios a base de agar cisteína tripticasa o caldo violeta que contengan 1% de hidratos de carbono esterilizados por filtración.

Enfoque para la identificación de estafilococos en el laboratorio

Como los estafilococos están entre los microorganismos aislados con mayor frecuencia en el laboratorio clínico, las decisiones se deben tomar con respecto a "cuán lejos ir" en su iden-

Cuadro 12-5 Características fenotípicas para la identificación de *Rothia mucilaginosa*

CARACTERÍSTICA	REACCIÓN	CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
Catalasa	V	Glucosa	+
Acetoína (VP)	+	Sacarosa	+
Hidrólisis de gelatina	+	Fructosa	+
Desarrollo en condiciones anaerobias	+	Salicina	+
Desarrollo en agar nutritivo con 5% de NaCl	—	Manosa	V
Coagulasa	—	Trehalosa	V
Fosfatasa alcalina	—	Manitol	—
		Sorbitol	—

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable.

tificación. Esto es válido en especial en referencia a los microorganismos coagulasa negativos. Muchos laboratorios han adoptado procedimientos rápidos para coagulasa (pruebas del látex o hemaglutinación), de manera que pruebas pueden realizarse de modo rápido en las colonias que "parezcan" estafilococos y sean catalasa positivas. Si las colonias son coagulasa positivas, el microorganismo se identifica como *S. aureus*. Para aislamientos que son coagulasa negativos, se puede realizar una prueba de disco de bacitracina o furazolidona, o la prueba de oxidasas modificadas para diferenciar estafilococos coagulasa negativos de *Micrococcus* y especies relacionadas. Los aislamientos estafilocócicos significativos de cultivos urinarios también deben probarse para la sensibilidad a la novobiocina para la identificación presuntiva de *S. saprophyticus*. La identificación completa de especie que utilice un método comercial o el procedimiento de referencia debe estar reservada para aislamientos significativos desde el punto de vista clínico. Éstos pueden incluir cepas que han sido aisladas en múltiples hemocultivos, en catéteres intravenosos infectados (donde el paciente puede tener el mismo aislamiento en múltiples hemocultivos), o en otros sitios normalmente estériles donde se ha aislado en forma repetida el mismo estafilococo coagulasa negativo. Las decisiones que implican identificaciones adicionales de estos microorganismos deben ser tomadas en cada caso con el aporte tanto del laboratorio como de los médicos a cargo del cuidado del paciente.

REFERENCIAS

1. Abraham J, Bilgrami S, Dorsky D, et al. *Stomatococcus mucilaginosus* meningitis in a patient with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 1997;19:639-641.
2. Ahrahamsson K, Hansson S, Jodal U, Lincoln K. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections in children. Eur J Pediatr 1993;152:69-71.
3. Akatova E, Schumacher-Perdreau F, Pulverer G. A DNA probe for the detection of the species *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Microbiol Lett 1992;15:93-96.
4. Akiyama H, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. J Dermatol 1998;25:563-568.
5. Alam SI, Singh L, Dube S, et al. Psychrophilic *Planococcus maitriensis* sp. nov. from Antarctica. Syst Appl Microbiol 2003;26:505-510.
6. Allignet J, Aubert S, Dyke KG, El Sohl N. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. Infect Immun 2001;69:712-718.
7. Allignet J, Galdart JO, Morvan A, et al. Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. Microbiology 1994;145:2033-2042.
8. Al-Rashdan A, Bashir R, Khan FA. Staphylococcal bacteremia: a rising threat in the newborn infant. Ann Clin Lab Sci 1985;13:246-251.
9. Anday E, Talbot G. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: a rising threat in the newborn infant. Ann Clin Lab Sci 1985;13:256-251.
10. Andresen LO. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. FEMS Immunol Med Microbiol 1998;20:301-310.
11. Andrew AH, Lampon A. Isolation of *Staphylococcus chromogenes* from an unusual case of impetigo in a goat. Vet Rec 1997;140:584.
12. Androm E, Bygdeman S, Ahlen S, et al. *Stomatococcus mucilaginosus* septicemia in two bone marrow transplanted patients. Scand J Infect Dis 1995;26:209-214.
13. Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, et al. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 1984;2:85-91.
14. Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th Ed. New York: Churchill-Livingstone, 2000:2092-2100.
15. Ariola CR, Montanaro L, Baldassarri L, et al. Slime production by staphylococci isolated from prosthesis-associated infections. New Microbiol 1999;22:337-341.
16. Aubert G, Passot S, Lucht F, Dorche G. Selection of vancomycin- and teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* during teicoplanin treatment of *S. epidermidis* infection. J Antimicrob Chemother 1990;25:491-493.
17. Baddour LM, Barker LP, Christensen GD, et al. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. J Clin Microbiol 1990;28:676-679.
18. Baddour LM, Smalley DL, Kraus AP Jr, et al. Comparison of characteristics of pathogenic and saprophytic coagulase-negative staphylococci from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Diagn Microbiol Infect Dis 1986;5:197-205.
19. Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. J Clin Microbiol 1984;19:875-879.
20. Baker JS, Borman MA, Boudreau DH. Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1985;21:726-729.
21. Baldassarri L, Donelli G, Gelosia A, et al. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Infect Immun 1996;64:3410-3415.
22. Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. Evaluation of the Vitek Systems gramp-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1993;31:1322-1325.
23. Bannerman TL, Kloos WE. *Staphylococcus capitis* subsp. ureolyticus subsp. nov. from human skin. Int J Syst Bacteriol 1991;41:144-147.
24. Basaglia G, Moras L, Bearz A, et al. *Staphylococcus cohnii* septicemia in a patient with colon cancer. J Med Microbiol 2003;53:101-102.
25. Becker K, Schumann P, Wullenweber J, et al. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel gram-positive actinobacterium isolated from a human clinical source. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:1609-1614.
26. Bedidi-Madani N, Kodjo A, Villard L, Richard Y. Ribotyping of *Staphylococcus caprae* isolated from goat milk. Vet Res 1998;29:149-158.
27. Bellamy R, Burkham T. *Staphylococcus lugdunensis* infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region. Clin Infect Dis 2002;35:E32-E34.
28. Bennett MI, Tai YMA, Symonds JM. Staphylococcal meningitis following SynchroMed intrathecal pump implant: a case report. Pain 1994;56:243-244.
29. Bergan T, Kocur M. *Stomatococcus mucilaginosus* gen. nov., sp. nov., emend. rev., a member of the family Micrococcaceae. Int J Syst Bacteriol 1982;32:374-377.
30. Bergan T, Kocur M. Genus II. *Stomatococcus*. In: Sneath PHA, Nair NS, Holt JG, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1008-1010.
31. Berdoli MS, Reiser RF, Crass BA, et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. Lancet 1981;1:1017-1021.
32. Berdoli MS, Schlievert PM. Toxic shock syndrome toxin. Lancet 1984;2:691.
33. Bergman B, Wedren H, Holm SE. *Staphylococcus saprophyticus* in males with symptoms of chronic prostatitis. Urology 1989;34:241-245.
34. Bhakdi S, Muhly M, Fussle R. Correlation between toxin binding and hemolytic activity in membrane damage by staphylococcal α -toxin. Infect Immun 1984;46:318-323.
35. Biavasco F, Vignaroli C, Lazzarini R, Valardo PE. Glycopeptide susceptibility profiles of *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3122-3126.
36. Biavasco F, Vignaroli C, Valardo PE. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:403-417.
37. Billot-Klein D, Gutmann L, Bryant D, et al. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. J Bacteriol 1996;178:4696-4703.
38. Bingen E, Barc MC, Brahimi N, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1995;32:2113-2119.
39. Birnbaum D, Herwaldt L, Low DE, et al. Efficacy of Microbial Identification System for epidemiological typing of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1994;32:2113-2119.
40. Blomster-Hautamaa DA, Kreiswirth BN, Novick RP, Schlievert PM. The resolution of highly purified toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) into two distinct proteins by isoelectric focusing. Biochemistry 1986;25:54-59.
41. Blumberg HM, Rimland D, Kiehlbauch JA, et al. Epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphism of tRNA genes: elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-nontypeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. J Clin Microbiol 1992;30:362-369.
42. Bobin S, Durand-Dubief A, Bouhour D, et al. Pacemaker endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of two cases. Clin Infect Dis 1999;28:404-405.
43. Boden M, Flock J-L. Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. Microb Pathog 1992;12:289-298.
44. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol 1990;17:251-272.
45. Bowman RA, Buck M. *Staphylococcus hominis* septicemia in patients with cancer. Med J Aust 1984;140:26-27.
46. Boyce JM. Strategies for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. J Chemother 1995;7(Suppl 3):81-85.
47. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol 1992;30:1654-1660.
48. Brakstad OG, Maeland JA, Chesneau O. Comparison of test designed to identify *Staphylococcus aureus* thermostable endonuclease. APMIS 1995;103:219-224.
49. Brun Y, Bes M, Boeufgras JM, et al. International collaborative evaluation of the ATB 32 Staph gallery for identification of the *Staphylococcus* species. Zentralbl Bakteriol 1990;273:319-326.

50. Brunet F, Vedel G, Dreyfu F, et al. Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicemia who recovered after administration of vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:145-147.
51. Bryan CS, Parisi JT, Strike DG. Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus warneri* attributed to a Hickman catheter. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987;8:57-59.
52. Bryant RE, Salmon CJ. Pleural empyema. *Clin Infect Dis* 1996;22:747-762.
53. Burgen SJ, LaRoco MT, Wilansky S. Destructive native valve endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *South Med J* 1999;92:812-814.
54. Buttery JP, Easton MN, Pearson SR, Hogg GG. Pediatric bacteremia due to *Staphylococcus warneri*: microbiological, epidemiological, and clinical features. *J Clin Microbiol* 1997;35:2174-2177.
55. Calderwood SB, Swinski LA, Waternaux CM, et al. Risk factors for the development of prosthetic valve endocarditis. *Circulation* 1985;72:31-37.
56. Calvo J, Hernandez JL, Farinas MC, et al. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification by an automated bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 2000;38:3887-3889.
57. Camacho M, Guis S, Mallei JP, et al. Three-year outcome in a patient with *Staphylococcus lugdunensis* discitis. *Joint Bone Spine* 2002;69:85-87.
58. Caputo G, Archer G, Calderwood S, et al. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: clinical and microbiologic features. *Am J Med* 1987;83:619-625.
59. Caragee EJ. Pyogenic vertebral osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:874-880.
60. Carney DN, Fossieck BE, Parker RH, et al. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* in patients with cancer: report on 45 cases and a review of the literature. *Rev Infect Dis* 1982;4:1-12.
61. Cartwright MJ, King MH, Weinberg RS, Guerry RK. Micrococcus endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1523-1524.
62. Castro JG, Dowdy L. Septic shock caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Infect Dis* 1999;28:681-682.
63. Cavasini N, Wenger A, Jaton K, et al. Evaluation of MRSA Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1591-1594.
64. Celard M, Lelievre H, Obadia JF, et al. Long-standing bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with an implantable cardioverter defibrillator. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:387-388.
65. Celard M, Vandenesch F, Darbas H, et al. Pacemaker infection caused by *Staphylococcus schleiferi*, a member of the human preaxillary flora: four case reports. *Clin Infect Dis* 1997;24:1014-1015.
66. Centers for Disease Control and Prevention. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin—Japan, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:624-626.
67. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:765-766.
68. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—Illinois, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:1165-1167.
69. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:565-567.
70. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—Pennsylvania, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:902.
71. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—New York, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:322-323.
72. Chamberlain NR. Identification and partial characterization of an extracellular activator of fatty acid modifying enzyme (FAME) expression in *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 1999;48:245-252.
73. Chamberlain NR, Brueggemann SA. Characterisation and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 1997;46:693-697.
74. Chesneau O, Auben S, Morvan A, et al. Usefulness of the ID32 Staph System and a method based on rRNA gene restriction site polymorphism analysis for species and subspecies identification of staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30:2346-2352.
75. Chesneau O, Morvan A, Grimont F, et al. *Staphylococcus pasteuri* sp. nov. isolated from human, animal, and food specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1991;43:237-244.
76. Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2186-2190.
77. Christensen GD, Bisno A, Parisi J, et al. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Intern Med* 1992;96:1-10.
78. Climo MW, Patron RL, Archer GL. Combinations of vancomycin and β -lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1747-1753.
79. Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E. Characterization of a Rothialike organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1247-1251.
80. Collins MD, Lawson PA, Labrenz M, et al. *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1145-1150.
81. Cooper GJ, Hopkins CC. Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct gram staining of catheter segments. *N Engl J Med* 1985;312:1142-1147.
82. Coudron PE, Markowitz SM, Mohanty LB, et al. Isolation of *Stomatococcus mucilaginosus* from drug user with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1987;25:1359-1363.
83. Coural SA, SA, Wet BC. Endocarditis caused by *Staphylococcus xylosum* associated with intravenous drug abuse. *J Infect Dis* 1984;149:826-827.
84. Couto I, Sanchez IS, Sa-Leao R, De Lencastre H. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 2000;38:1136-1143.
85. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 1986;23:43-45.
86. Cunniffe JG, Mallia C, Alcock PA. *Stomatococcus mucilaginosus* lower respiratory tract infection in a patient with AIDS. *J Infect* 1994;29:327-330.
87. Dan M, Marien G, Goldsand G. Endocarditis caused by *Staphylococcus warneri* on a normal aortic heart valve following vasectomy. *Can Med Assoc J* 1984;131:211-213.
88. Darouche RO, Raad II, Heard SO, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. *N Engl J Med* 1999;320:1-8.
89. Dassy B, Stringfellow WT, Lieb M, Fournier JM. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J Gen Microbiol* 1991;137:1155-1162.
90. Davis GH, Hoyling B. Use of a rapid acetoin test in the identification of staphylococci and micrococci. *Int J Syst Bacteriol* 1973;23:281-282.
91. Davis TE, Fuller DD. Direct identification of bacterial isolates in blood culture by using a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1991;29:2193-2196.
92. Dawson MS, Hartord AM, Garner BK, et al. Total volume culture technique for the isolation of microorganisms from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with peritonitis. *J Clin Microbiol* 1985;22:391-394.
93. Degener JE, Heck MEO, Van Leeuwen WJ, et al. Nosocomial infection by *Staphylococcus haemolyticus* and typing method for epidemiological study. *Clin Microbiol* 1994;32:2260-2265.
94. De La Fuente R, Suarez G, Schleifer JH. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:99-102.
95. Deplano A, Vanechoutte M, Verschraegen G, Struelens MJ. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-/IS256 spacer length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1997;35:2580-2587.
96. Devriese LA, Hajek V, Oeding P, et al. *Staphylococcus hyicus* (Sompolsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:482-490.
97. Devriese LA, Poutrel B, Kilpper-Balz R, et al. *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:480-486.
98. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16-34.
99. Doern LK, Earls JE, Jeznach PA, et al. Species identification and biotyping of staphylococci by the API Staph-Ident system. *J Clin Microbiol* 1983;11:260-263.
100. Eidhin DN, Perkin S, Francois P, et al. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998;30:245-257.
101. Elliott SP, Yogev R, Schulman ST. *Staphylococcus lugdunensis*: an emerging cause of ventriculoperitoneal shunt infections. *Pediatr Neurosurg* 2001;35:128-130.
102. Elsner HA, Dahmen GP, Laufs R, Mack D. Intra-articular empyema due to *Staphylococcus caprae* following arthroscopic cruciate ligament repair. *J Infect* 1998;37:66-67.
103. Engelhard MA, Daly K, Swannell RP, Head IM. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J Appl Microbiol* 2001;90:237-247.
104. Falk D, Guering SJ. Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the Taxo A bacitracin disk. *J Clin Microbiol* 1983;18:719-720.
105. Faller A, Schleifer KH. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 1981;13:1031-1035.
106. Fernandes AP, Perl TM, Herwaldt LA. *Staphylococcus cohnii*: a case report on an unusual pathogen. *Clin Perform Qual Health Care* 1996;4:107-109.
107. Fervenza FC, Contreras GE, Garratt KN, Steckelberg JM. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis: a complication of vasectomy? *Mayo Clin Proc* 1999;74:1227-1230.
108. Fey PD, Ulphani JS, Gotz F, et al. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesion and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1999;179:1561-1564.
109. Fidalgo S, Vasquez F, Mendoza M, et al. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic feature. *Rev Infect Dis* 1990;12:520-528.
110. Forgren A, Sjogulst J. "Protein A" from *Staphylococcus aureus* 1. Pseudo immune reaction with human globulin. *J Immunol* 1966;97:822.
111. Foster G, Ross HM, Hutson RA, Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:724-726.
112. Fournier JM, Boutonnier A, Bouvet A. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination procedures are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* 1989;27:1372-1374.
113. Fournier JM, Bouvet A, Boutonnier A, et al. Predominance of capsular type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1912-1933.
114. Fournier JM, Bouvet A, Mathieu D, et al. New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1342-1344.

115. Fournier JM, Vann WF, Karakawa WW. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1984;45:87-93.
116. Fowler CG Jr, Sanders LL, Kong LK, et al. Infective endocarditis due to *Staphylococcus aureus*: 59 prospectively identified cases with follow-up. *Clin Infect Dis* 1999;28:106-114.
117. Fowler VG Jr, Sanders LL, Sexton DJ, et al. Outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia according to compliance with recommendation of infectious diseases specialists: experience with 244 patients. *Clin Infect Dis* 1998;27:478-486.
118. Frame PT, McLaun RL. Treatment of CSF shunt infection with intrashunt plus oral antibiotic therapy. *J Neurosurg* 1984;60:354-360.
119. Frank LA, Kania SA, Hnilica KA, et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:451-454.
120. Freeman J, Goldmann DA, Smith NE, et al. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *N Engl J Med* 1990;323:301-308.
121. Freney J, Brun Y, Bes M, et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:168-172.
122. Freney J, Kloos WE, Hajek V, Wehster JA. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:489-501.
123. Gailliot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of CHROMagar Staph. aureus a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:1587-1591.
124. Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K, et al. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:167-170.
125. Garrity G, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the road map to the manual. New York: Bergey's Manual Trut, 2000.
126. Gatermann S, Kreft B, Marre R, et al. Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect Immun* 1992;60:1055-1060.
127. Gatermann SG, Meyer HG. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect Immun* 1994;62:4556-4563.
128. Gatermann S, Meyer HG, Wanner G. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin in a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infect Immun* 1992;60:4127-4132.
129. Geary C, Stevens M. Rapid lysosaphin test to differentiate *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *J Clin Microbiol* 1986;23:1044-1045.
130. Geary C, Stevens M. Detection of phosphatase production by *Staphylococcus* species: a new method. *Med Lab Sci* 1989;46:291-294.
131. Geary C, Stevens M. A rapid test to detect the most clinically significant *Staphylococcus* species. *Med Lab Sci* 1991;8:99-105.
132. George CG, Kloos WE. Comparison of SmaI-digested chromosomes of *Staphylococcus epidermidis* and the closely related species *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus caprae*. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:404-409.
133. Gerke C, Kraf A, Suhmuth R, et al. Characterization of N-acetyl-glucosaminyltransferase activity in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998;273:18586-18693.
134. Gerstadt K, Daly JS, Mitchell M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass graftin. *Clin Infect Dis* 1999;29:218-219.
135. Giger P, Charilaou CC, Cundy KR. Comparison of the API Staph-Ident and the DMS Staph-Trac systems with conventional methods used for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1984;19:68-72.
136. Girard C, Higgins R. *Staphylococcus intermedius* cellulitis and toxic shock in a dog. *Can Vet J* 1999;40:501-502.
137. Glimaker M, Granert C, Krook A. Septicemia caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *Scand J Infect Dis* 1988;20:347-348.
138. Goh SH, Potter S, Wood JO, et al. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:818-823.
139. Goh SH, Santucci Z, Kloos WF, et al. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* 1997;35:3116-3121.
140. Goldman M, Chaudhary UB, Greist A, Fausel CA. Central nervous system infections due to *Stomatococcus mucilaginosus* in immunocompromised hosts. *Clin Infect Dis* 1998;27:1241-1246.
141. Goldstein J, Schulman R, Kelley E, et al. Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:592-595.
142. Gombert ME, Landesman SH, Corrado ML, et al. Vancomycin and rifampin therapy for *Staphylococcus epidermidis* meningitis associated with CSF shunts: report of three cases. *J Neurosurg* 1981;55:633-636.
143. Gonzalez C, Rubio M, Romero-Vivas J, et al. Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus*: a comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms. *Clin Infect Dis* 1999;29:1171-1177.
144. Grant CE, Sewell DL, Pfaller M, et al. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:1-5.
145. Grasmick AE, Naito N, Bruckner DA. Clinical comparison of the AutoMicrobic system gram-positive identification card API Staph-Ident, and conventional methods in the identification of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 1983;18:1323-1328.
146. Gray GS, Kehoe M. Primary sequence of the α -toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. *Infect Immun* 1984;46:615-618.
147. Greston DB, Low DE, Skulnick M, et al. Problems with rapid agglutination of *Staphylococcus aureus* when *Staphylococcus saprophyticus* is being tested. *J Clin Microbiol* 1988;26:1398-1399.
148. Grossi EA, Culliford AT, Kneger KH, et al. A survey of 77 major infectious complications of median sternotomy: a review of 7,949 consecutive operative procedures. *Ann Thorac Surg* 1985;40:224-228.
149. Gruson D, Hilbert G, Pigneux A, et al. Severe infection caused by *Stomatococcus mucilaginosus* in a neutropenic patient: case report and review of the literature. *Hematol Cell Ther* 1998;40:167-169.
150. Guardati MC, Guzman CA, Piatti G, et al. Rapid methods for identification of *Staphylococcus aureus* when both human and animal staphylococci are tested: comparison with a new immunoenzymatic assay. *J Clin Microbiol* 1993;31:16167-169.
151. Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *J Clin Microbiol* 1983;18:1098-1101.
152. Gunn BA, Davis CE Jr. *Staphylococcus haemolyticus* urinary tract infection in a male patient. *J Clin Microbiol* 1988;26:1055-1057.
153. Gupta K, Hooton TM, Wobbe CL, Stamm WE. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogenic causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Im J Antimicrob Agents* 1999;11:305-308.
154. Guzman CA, Guardati MC, Fenoglio D, et al. Novel immunoenzymatic assay for identification of coagulase- and protein A-negative *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1992;30:1194-1197.
155. Haile DT, Hughes J, Vetter E, et al. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:654-656.
156. Hajek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol* 1976;26:401-408.
157. Hajek V, Devreise LA, Mordarski M, et al. Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. chromogenes (Devreise, et al., 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenes* (Devreise, et al. 1978) comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 1986;8:169-173.
158. Hajek V, Ludwig W, Schleifer KH, et al. *Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:97-101.
159. Hajek V, Meugnier H, Bes M, et al. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. bovis subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:792-796.
160. Hajjeh RA, Reingold A, Weil A, et al. Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979-1996. *Emerg Infect Dis* 1999;5:807-810.
161. Harjola VP, Valtanen M, Sivonen A. Association of *Stomatococcus mucilaginosus* with cholangitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:606-608.
162. Hebert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2425-2431.
163. Hebert GA, Crowder CG, Hancock GA, et al. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species from other members of the Family Micrococcaceae. *J Clin Microbiol* 1988;26:1939-1946.
164. Hedin G, Wilderstrom M. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:673-675.
165. Hedman P, Ringenz O, Eriksson B, et al. *Staphylococcus saprophyticus* found to be a common contaminant of food. *J Infect* 1990;21:11-19.
166. Hedman P, Ringertz O, Lindstrom M, Olsson K. The origin of *Staphylococcus saprophyticus* from cattle and pigs. *Scand J Infect Dis* 1993;25:57-60.
167. Hedman P, Ringertz O, Olsson K, Wollin R. Plasmid-identified *Staphylococcus saprophyticus* isolated from the rectum of patients with urinary tract infection. *Scand J Infect Dis* 1991;23:569-572.
168. Heilmann C, Hussain M, Peter G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997;24:1013-1024.
169. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996;30:1083-1091.
170. Hell W, Kern T, Klouche M. *Staphylococcus saprophyticus* as an unusual cause of nosocomial pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:685-686.
171. Hell W, Meyer HG, Gatermann SG. Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol* 1998;29:871-881.
172. Hernandez JL, Calvo J, Sota R, et al. Clinical and microbiological characteristic of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;20:153-158.
173. Herrmann M, Vaudeaux PE, Pittet D, et al. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as a mediator for adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign materials. *J Infect Dis* 1988;158:693-701.
174. Herwaldt L, Boyken L, Pfaller M. In vitro selection of resistance to vancomycin in bloodstream isolates of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:1007-1012.
175. Hiramatsu IC, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-136.
176. Hjelm E, Lundell-Etherden I. Slime production by *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect Immun* 1991;59:445-448.
177. Ho G, Campbell WH, Bergdoll MS, et al. Production of a toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* strains associated with sheep, goats and cows. *J Clin Microbiol* 1989;27:1946-1948.

178. Honkeppel HK, Braun DG, Vischer W, et al. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular serotypes 5 and 8. *J Clin Microbiol* 1987;25:526-530.
179. Hoefnagel-Schuurmans A, Peetermans WE, Struelens MJ, et al. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1997;35:2514-2520.
180. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 1997;36:1083-1089.
181. Hosotsubo K, Hosotsubo H, Nishijima MK, et al. Rapid screening for *Staphylococcus aureus* infection by measuring enterotoxin B. *J Clin Microbiol* 1989;27:2794-2798.
182. Hovelius B, Mardh PA. *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:328-337.
183. Hsueh P-R, Teng L-J, Yang P-C, et al. Dissemination of two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones exhibiting negative Staphylase reactions in intensive care units. *J Clin Microbiol* 1999;37:504-509.
184. Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, et al. A 140 kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 1997;65:519-524.
185. Hussain Z, Stoaxes L, Stevens DL, et al. Comparison of the MicroScan system with the API Staph-Ident system for species identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1986;23:126-128.
186. Ieven M, Janssens H, Ursi D, et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by commercially available fluorescence test. *J Clin Microbiol* 1995;33:2183-2185.
187. Ieven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1060-1063.
188. Igarashi MA, Fujikawa H, Shigaki M, et al. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin. *J Clin Microbiol* 1986;23:509-512.
189. Igimi S, Atohe H, Tohya Y, et al. Characterization of the most frequently encountered *Staphylococcus* sp. in cats. *Vet Microbiol* 1994;39:255-260.
190. Igimi S, Kawamura S, Takahashi E, et al. *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:373-377.
191. Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditor meatus of dogs with external ear otitis. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:409-411.
192. Janda WM, Ristow K, Novak D. Evaluation of RapiDEC Staph for identification of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2056-2059.
193. Jansen B, Schumacher-Perdreau F, Peters G, et al. Native valve endocarditis caused by *Staphylococcus simulans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:268-269.
194. Jarlov JO, Højbjerg T, Busch-Sørensen C, et al. Coagulase-negative staphylococci in Danish blood cultures: species distribution and antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 1996;32:217-227.
195. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, et al. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* 1999;37:2446-2449.
196. John MDV, Hibberd PL, Karchler AW, et al. *Staphylococcus aureus* prosthetic valve endocarditis: optimal management and risk factors for death. *Clin Infect Dis* 1998;26:1302-1309.
197. Jones RM, Jackson MA, Ong C, Lofland GK. Endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:254-268.
198. Junge K, Gosink JJ, Hoppe HG, Staley JL. Arthrobacter, Brachybacterium, and Planococcus isolates identified from Antarctic sea brine. Description of *Planococcus mceekini* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 1998;21:306-314.
199. Jungkind DJ, Torhan NJ, Korman KE, et al. Comparison of two commercially available test methods with conventional coagulase tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1984;19:191-193.
200. Kaabia N, Scaurda D, Lena G, Drancourt M. Molecular identification of *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with meningitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1824-1825.
201. Kahler RC, Boyce JM, Bergdoll MS, et al. Case report: toxic shock syndrome associated with TSST-1-producing coagulase-negative staphylococci. *Am J Med Sci* 1986;292:310-312.
202. Kamalesh M, Aslam S. Aortic valve endocarditis due to *Staphylococcus capitis*. *Echocardiography* 2000;17:685-687.
203. Kamaraju S, Nelson K, Williams DN, et al. *Staphylococcus pulmonary* valve endocarditis in a patient on chronic hemodialysis. *Am J Nephrol* 1999;19:605-608.
204. Kanda K, Suzuki E, Hiramatsu K, et al. Identification of a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus caprae* from a human clinical specimen. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:174-176.
205. Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, et al. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1988;56:1090-1095.
206. Karchmer AW, Archer GL, Dismukes WE. *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. *Ann Intern Med* 1988;98:447-455.
207. Kauffman CA, Hertz CS, Sheagren JN. *Staphylococcus saprophyticus*: role in urinary tract infections in men. *J Urol* 1983;130:493-494.
208. Kauffman CA, Sheagren JN, Quie PG. *Staphylococcus epidermidis* mediastinitis and disseminated intravascular coagulation. *Ann Intern Med* 1984;100:60-61.
209. Kawabata S, Monta T, Iwanaga S, et al. Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *J Biochem* 1966;98:1603-1605.
210. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, et al. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical isolates and emended description of *Staphylococcus caprae*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2038-2042.
211. Kaya IS, Gamberzade S, Toppare MF, et al. Neonatal sepsis and meningitis due to *Staphylococcus cohnii*. *JPMA J Pak Med Assoc* 1996;46:43-44.
212. Kellogg JA, Hanna MD, Nelsen SJ, et al. Predictive values of species identifications from the Vitek Gram-Positive Identification card using clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Am J Clin Pathol* 1996;106:374-377.
213. Kent TH. Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in rhesus monkeys. *Am J Pathol* 1966;48:387-407.
214. Kessler RB, Kimbrough RC, Jones SR. Infective endocarditis caused by *Staphylococcus hominis* after vasectomy. *Clin Infect Dis* 1998;27:216-217.
215. Kilpper-Balz R, Schleifer KH. Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig* 1981;2:324-331.
216. Kleunum KT, Bannerman TL, Kloos WE. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol* 1993;31:1318-1321.
217. Kloos WE, Baidard DN, George CG, et al. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macroccoccus caseolyticus* gen. nov., comb. nov., and *Macroccoccus equiperis* sp. nov., and *Macroccoccus bovis* sp. nov., and *Macroccoccus caroselicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:859-877.
218. Kloos WE, Ballard DN, Webster JA, et al. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylococcal enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:313-323.
219. Kloos WE, George CG. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies with the MicroScan Pos ID and Rapid Pos ID panel systems. *J Clin Microbiol* 1991;29:738-744.
220. Kloos WE, George CG, Oligante JS, et al. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel thehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:799-812.
221. Kloos WE, Lambe DW Jr. *Staphylococcus*. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th Ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991;222-237.
222. Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of staphylococci from human skin: II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 1975;25:62-79.
223. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1975;1:82-87.
224. Kloos WE, Schleifer KH. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:9-14.
225. Kloos WE, Schleifer KH. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1984, 19^{AL} (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 163). In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986;1013-1035.
226. Kloos WE, Schleifer KH, Smith RF. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int J Syst Bacteriol* 1976;26:22-37.
227. Kloos WE, Wolfsohl JF. Identification of *Staphylococcus* species with the API Staph-Ident system. *J Clin Microbiol* 1982;16:509-516.
228. Kloos WE, Wolfsohl JF. *Staphylococcus* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov., and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:284-289.
229. Kluytman J, Berg H, Steegh P, et al. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2214-2219.
230. Kluytman J, Van Griethuysen A, Willemsse P, Van Keulen P. Performance of CHROMagar selective medium with oxacillin-resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2002;40:2480-2482.
231. Koch C, Schumann P, Stackebrandt E. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter ogilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:837-839.
232. Kocur M, Genus I. *Micrococcus*. In: Sneath PHA, Nair NS, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986;1004-1008.
233. Kocur M, Genus III. *Planococcus*. In: Sneath PHA, Nair NS, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986;1011-1013.
234. Komori Y, Iimura N, Yamashita R, et al. Characterization of coagulase from *Staphylococcus intermedius*. *J Nat Toxins* 2001;10:111-118.
235. König B, Prevost G, König W. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *J Med Microbiol* 1993;46:479-485.
236. Kotilainen P, Huovinen P, Eerola E. Application of gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1991;29:315-322.
237. Kovcs G, Burghardt J, Pradella S, et al. *Kouria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:167-173.

238. Kragshjerg P, Bomfim-Loogna J, Tornqvist E, Soderqvist B. Development of antimicrobial resistance in *Staphylococcus lugdunensis* during treatment: report of a case of bacterial arthritis, vertebral osteomyelitis, and infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:496-499.
239. Kremery V Jr, Trupl J, Drgona L, et al. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:259-261.
240. Kremery V Jr, Trupl J, Spanik S. Bacteremia due to teicoplanin-resistant and vancomycin-susceptible *Staphylococcus haemolyticus* in seven patients with acute leukemia and neutropenia receiving prophylaxis with ofloxacin. *Infection* 1997;25:51-52.
241. Krishnan S, Haglund L, Ashfaq A, et al. Prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Clin Infect Dis* 1996;22:722-723.
242. Krothapalli RK, Senekjian HO, Ayu JC. Efficacy of intravenous vancomycin in the treatment of gram-positive peritonitis in long-term peritoneal dialysis. *Am J Med* 1983;75:145-148.
243. Kumari DN, Keer V, Hawkey PM, et al. Comparison and application of ribosomal spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997;35:881-885.
244. Kwok AY, Chow AW. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *In J Syst Evol Microbiol* 2003;53:87-92.
245. Kwok AY, Su SC, Reynolds RP, et al. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1181-1192.
246. Lambe DW Jr, Ferguson KP, Keplinger JL, et al. Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can J Microbiol* 1990;36:453-463.
247. Lambert LH, Cox T, Mitchell K, et al. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:511-518.
248. Landau W, Kaplan RL. Room temperature coagulase production by *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Microbiol Newslett* 1980;2:10.
249. Langbeig JM, LeBlack JC, Drake J, Milner R. Efficacy of antimicrobial prophylaxis in placement of cerebrospinal fluid shunts: Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 1993;17:98-103.
250. Langlois BE, Harmon RJ, Akers K, et al. Comparison of methods for determining DNase and phosphatase activities by staphylococci. *J Clin Microbiol* 1989;27:1127-1129.
251. Larkill SM, William DN, Osterholm MT, et al. Toxic shock syndrome: clinical, laboratory, and pathologic findings in nine fatal cases. *Ann Intern Med* 1982;96:858-864.
252. Latham RH, Running K, Stamm WE. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA* 1983;250:3063-3066.
253. Latorre M, Rojo PM, Franco R, Cisterna R. Endocarditis due to *Staphylococcus capitis* subspecies ureolyticus (letter). *Clin Infect Dis* 1993;16:343-344.
254. Layton MC, Hierholzer WJ Jr, Patterson JE. The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:12-17.
255. Lee JC, Park JS, Shepherd SE, et al. Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. *Infect Immun* 1997;65:4146-4151.
256. Lee JC, Liu M-J, Parsonnet J, et al. Expression of type 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2612-2615.
257. Lee JC, Takeda S, Livolsi PJ, Paoletti LC. Effects of in vivo and in vitro growth conditions of expression of type-8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993;61:1853-1858.
258. Lee W, Carpenter RJ, Phillips LE, Faro S. Pyelonephritis and sepsis due to *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect Dis* 1987;155:1079-1080.
259. Lee VT, Chang AH, Chow AW. Detection of staphylococcal enterotoxin B among toxic shock syndrome (TSS)- and non-TSS-associated *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis* 1992;166:911-915.
260. Lerche A, Rasmussen N, Wandall JH, et al. *Staphylococcus aureus* meningitis: a review of 28 consecutive community-acquired cases. *Scand J Infect Dis* 1995;27:569-573.
261. Leung MJ, Nutall N, Mazur M, et al. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify clumping factor-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 1999;17:3353-3356.
262. Lewis JF, Brake SR, Anderson DJ, et al. Urinary tract infection due to coagulase-negative staphylococci. *Am J Clin Pathol* 1992;77:736-739.
263. Lin WS, Cunneen T, Lee CY. Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1994;176:7005-7016.
264. Lina B, Vandenesch F, Reverdy ME, et al. Non-puerperal breast infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:686-687.
265. Lina C, Piemont Y, Godall-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128-1132.
266. Linares J, Stiges-Serra A, Garu J, et al. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985;21:357-360.
267. Lindsay JA, Aravena-Roman MA, Riley TV. Identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis* from blood culture by testing susceptibility to desferrioxamine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:127-131.
268. Lindsay JA, Riley TV. Susceptibility of desferrioxamine: a new test for the identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 1991;35:45-48.
269. Liu H, Xu Y, Ma Y, Zhou P. Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychophilic bacterium from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:715-719.
270. Longshaw CM, Wriht JD, Farrell AM, Holland KT. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *J Appl Microbiol* 2002;93:810-816.
271. Low DE, Schmidt BK, Kirpalani HM, et al. An endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* colonizing and causing bacteremia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatrics* 1992;89:696-700.
272. Luijendijk A, van Belkum A, Verbrugh H, Kluytmans J. Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Clin Microbiol* 1996;34:2267-2269.
273. Mack D, Fischer W, Krottsch A, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear, β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996;178:175-183.
274. Mack D, Haeder M, Siemssen N, Laufs R. Association of biofilm production of coagulase negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* 1996;174:881-884.
275. Mack D, Riedewald J, Rohde H, et al. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun* 1999;67:1004-1008.
276. Magee JT, Burnett IA, Hindmarch JM, Spencer RC. *Micrococcus* and *Stomatococcus* spp. from human infections. *J Hosp Infect* 1990;16:67-73.
277. Mahoudeau I, Delabranche X, Prevost G, et al. Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J Clin Microbiol* 1997;35:2153-2154.
278. Males BM, Banholomew WR, Amsterdam D. *Staphylococcus simulans* septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyoarthritis. *J Clin Microbiol* 1985;21:255-257.
279. Mandell GL. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis of staphylococcal-leukocyte interaction. *J Clin Invest* 1966;55:561-564.
280. Mannerova S, Pantucek R, Doskar J, et al. *Micrococcus brunensis* sp. nov., *Micrococcus hajekii* sp. nov., and *Micrococcus lamae* sp. nov., from the skin of llamas. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1647-1654.
281. Marques MB, Weller PF, Parsonnet J, et al. Phosphatidylinositol-specific phosphatase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2451-2454.
282. Marrack R, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705-711.
283. Marsou R, Bes M, Boudouma M, et al. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. *Res Microbiol* 1999;150:531-541.
284. Martinez-Martinez L, Cuervex-Mons V, Alonso-Pulpon L, et al. *Staphylococcus xylosum* from a patient with cardiac and hepatic transplants. *Clin Microbiol Newslett* 1988;10:47-48.
285. Mastroianni A, Coronado O, Nanetti A, Chiodo F. *Staphylococcus xylosum* isolated from a pancreatic pseudocyst in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1994;19:1173-1174.
286. Mastroianni A, Coronado O, Nanetti A, et al. Community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus cohnii* in an HIV-infected patient: case report and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:904-908.
287. Mastroianni A, Coronado O, Nanetti A, et al. *Staphylococcus cohnii*: an unusual cause or primary septic arthritis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996;23:1112-1113.
288. Mayhall CG, Archer NH, Lamb A, et al. Ventriculostomy-related infections: a prospective epidemiologic study. *N Engl J Med* 1984;310:553-550.
289. McCarthy JS, Stanley PA, Mayall B. A case of *Staphylococcus simulans* endocarditis affecting a native heart valve. *J Infect* 1991;22:211-212.
290. McDonald CL, Chapin K. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic two-hour tube coagulase test. *J Clin Microbiol* 1995;33:50-52.
291. McKenney D, Hubner J, Muller E, et al. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* 1998;66:4711-4720.
292. McTaggart LA, Elliott TSJ. Is resistance to novobiocin a reliable test for confirmation of the identification of *Staphylococcus saprophyticus*? *J Med Microbiol* 1989;30:253-266.
293. McTaggart LA, Rigby RC, Elliott TSJ. The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, and *S. epidermidis*. *J Med Microbiol* 1990;32:135-141.
294. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000;38:1032-1035.
295. Mendoza M, Meugnier H, Bes M, et al. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1039-1055.
296. Merlino J, Leroy M, Bradbury R, et al. New chromogenic identification and detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2378-2380.
297. Meugnier H, Bes M, Vernozy-Rozand C, et al. Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *Int J Food Microbiol* 1996;31:325-331.

298. Meyer HG, Gatermann S. Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus*: hydrophobicity, haemagglutination, and *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein (Ssp) represent distinct entities. *APMIS* 1994;102:538-544.
299. Meyer HG, Muthing J, Gatermann SG. The hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* binds to a protein receptor on sheep erythrocytes. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1997;186: 37-43.
300. Meyer HG, Wengler-Becker U, Gatermann SG. The hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* is a major adhesin for uroepithelial cells. *Infect Immun* 1996;64:3893-3896.
301. Miller JM, Biddle JW, Queller VK, et al. Evaluation of the Biolog for identification of members of the Family *Micrococcaceae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:3170-3173.
302. Mitchell CJ, Geary C, Steven M. Detection of *Staphylococcus aureus* in blood cultures: evaluation of a two-hour method. *Med Lab Sci* 1991;48:106-109.
303. Mitchell PS, Huston BJ, Jone RN, et al. *Stomatococcus mucilaginosus* bacteremias: typical case presentations, simplified diagnostic criteria, and a literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:521-525.
304. Miwa K, Fukuyama M, Kunitomo T, et al. Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera. *J Clin Microbiol* 1994;32:539-542.
305. Monday SR, Bobach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:3411-3414.
306. Monson T, Ronnmark M, Olofsson C, Wistrom J. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:327-335.
307. Montanaro L, Arciola J, Borsetti E, et al. A polymerase chain reaction (PCR) method for the identification of collagen adhesin gene in *Staphylococcus* induced prosthesis infection. *New Microbiol* 1998;21:359-263.
308. Moreau M, Richard JC, Fournier JM, et al. Structure of the type-5 capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* 1990;117:113-123.
309. Mulder JG. A simple and inexpensive method for the identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1052-1056.
310. Muller E, Takeda H, Shiro D, et al. Occurrence of capsular polysaccharide-adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 1993;169:1211-1218.
311. Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:2240-2244.
312. Murdoch DR, Everts RJ, Chambers ST, Cowan IA. Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:993-994.
313. Nakagawa Y, Sakane T, Yokata A. Emendation of the genus *Planococcus* and transfer of *Flavobacterium okeanokoites* Zobell and Upham 1944 to the genus *Planococcus* as *Planococcus okeanokoites* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:866-870.
314. Nakatomi Y, Sugiyama J. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin binding protein 2f. *Microbiol Immunol* 1998;42:739-743.
315. Nataro JP, St Geme JW. Septicemia caused by *Staphylococcus saprophyticus* without associated urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:601-602.
316. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 6th Ed. Approved standard, M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Laboratory Standards, 2003.
317. Neill RJ, Fanning GR, Delahoz F, et al. Oligonucleotide probes for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* strains containing genes for enterotoxins A, B, and C and toxic shock syndrome toxin 1. *J Clin Microbiol* 1990;28:1514-1518.
318. Nielsen H. Vertebral osteomyelitis with *Stomatococcus mucilaginosus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:775-776.
319. Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, et al. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun* 1997;65:4216-4221.
320. Nilsson M, Frykberg L, Flock J-I, et al. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1998;66:2666-2673.
321. O'Brien T, Collin J. Prosthetic vascular graft infection. *Br J Surg* 1992;79:1262-1267.
322. Oh B, Kim H, Lee J, et al. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity, and gene cloning. *FEMS Microbiol Lett* 1999;179:385-392.
323. Ohshima Y, Schumacher-Perdreau F, Peters G, et al. Antiphagocytic effect of the capsule of *Staphylococcus simulans*. *Infect Immun* 1990;58:1350-1354.
324. Olivera DC, Cristostomo I, Santos-Sanches P, et al. Comparison of DNA sequencing of the protein A Gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing epidemiologically diverse collection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001;39:574-580.
325. Olmos A, Camarena JJ, Nogueira JM, et al. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:1128-1134.
326. Ortiz de la Tabla V, Gutierrez-Rodero F, Martin C, et al. *Staphylococcus legdunensis* as a cause of abscesses in the perineal area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:405-407.
327. Osterlund A, Nordlund E. Wound infection caused by *Staphylococcus hyicus* subspecies *hyicus* after a donkey bite. *Scand J Infect Dis* 1997;29:95.
328. Ozturker H, Kocabeyoglu O, Yergok YZ, et al. Distribution of coagulase-negative staphylococci, including the newly described species *Staphylococcus schleiferi*, in nosocomial and community acquired urinary tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:1076-1079.
329. Palazo E, Pierre J, Besbes N. *Staphylococcus lugdunensis* arthritis: a complication of arthroscopy. *J Rheumatol* 1992;19:327-328.
330. Pantucek R, Sedlacek I, Doskar J, Rosypal S. Complex genomic and phenotypic characterization of the related species *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus pisciformans*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:941-951.
331. Parsonnet J. Case definition of staphylococcal TSS: A proposed revision incorporating laboratory findings. In: Arhuthnot J, Furman B. eds. European Conference on Toxic Shock Syndrome. International Conference and Symposium Series 229 New York: Royal Society of Medicine Press, 1998:15.
332. Patel R, Piper KE, Rouse MS, et al. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience. *J Clin Microbiol* 2000;38:4262-4263.
333. Patel SR, Oleginski TP, Perquet JL, et al. Pyomyositis: clinical feature and predisposing conditions. *J Rheumatol* 1997;24:1734-1738.
334. Patey O, Malkin JE, Coutaux A, et al. AIDS-related *Stomatococcus mucilaginosus* infection. *Lancet* 1991;338:621-632.
335. Paulsson M, Ljungh A, Wadstrom T. Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen cell surface binding proteins in coagulase-negative staphylococci by particle agglutination assays. *J Clin Microbiol* 1992;30:2006-2012.
336. Peacock SJ, Lina G, Etienne J, Foster TJ. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* expresses a fibronectin-binding protein. *Infect Immun* 1999;67:4272-4275.
337. Peces R, Gago E, Tejada F, et al. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2428-2429.
338. Pei L, Palma M, Nilsson M, et al. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1999;67:4525-4530.
339. Pennell DR, Rott-Petri JA, Kurzynski TA. Evaluation of three commercial agglutination tests for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1984;20:611-617.
340. Perdeau-Remington F, Stefanik D, Peters G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* on the hands of health care workers: a route of transmission or a source? *J Hosp Infect* 1995;31:195-203.
341. Perl TM, Kruger WA, Houston A, et al. Investigation of suspected nosocomial clusters of *Staphylococcus haemolyticus* infections. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 1999;20:128-131.
342. Perl TM, Rhomberg PR, Bale MJ, et al. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:151-155.
343. Perry JD, Remington C, Butterworth LA, et al. Evaluation of S. aureus ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5695-5698.
344. Piccolomini R, Catamo G, Picciani C, et al. Evaluation of Staf-Sistem 18-R for identification of staphylococcal clinical isolates to the species level. *J Clin Microbiol* 1994;37:649-653.
345. Pierre J, Gutmann L, Bornet M, et al. Identification of coagulase-negative staphylococci by electrophoretic profile of total proteins and analysis of penicillin-binding proteins. *J Clin Microbiol* 1990;28:443-446.
346. Pierre J, Williamson R, Bornet M, Gutmann L. Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1691-1694.
347. Pignatari A, Pfaller M, Hollis R, et al. *Staphylococcus aureus* colonization and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1990;28:1898-1902.
348. Pinna A, Zanetti S, Sotgiu M, et al. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol* 1999;83:771-773.
349. Pinsky RL, Piscitelli V, Patterson JE. Endocarditis caused by relatively penicillin-resistant *Stomatococcus mucilaginosus*. *J Clin Microbiol* 1989;27:215-216.
350. Piper J, Hadfield T, McClesley F, et al. Efficacies of rapid agglutination tests for identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1907-1909.
351. Place RB, Hietand D, Burri S, Teuber M. *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from surface-ripened cheese. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:353-359.
352. Poirier LP, Gaudreau CL. *Stomatococcus mucilaginosus* catheter-associated infection with septicemia. *J Clin Microbiol* 1989;27:1125-1126.
353. Ponce de Leon S, Wenzel RP. Hospital-acquired bloodstream infections with *Staphylococcus epidermidis*: review of 100 cases. *Am J Med* 1984;77:639-644.
354. Poutrel B, Caffin JP. Lysostaphin disk test for routine presumptive identification of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1981;13:1023-1025.
355. Press OW, Ramsey PG, Larson EB, et al. Hickman catheter infections in patients with malignancies. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:189-200.
356. Prevost G, Cribier B, Couppie P, et al. Pantone-Valentine leukocidin and γ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995;63:4121-4129.
357. Probst AJ, Hertel C, Richter L, et al. *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:651-658.
358. Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, et al. Nucleotide sequence: the β -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 1989;17:3305.

359. Qadri SMH, Ueno Y, Imambaccus H, Almodovar E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Crystal MRSA ID System. *J Clin Microbiol* 1994;32:1830-1832.
360. Raad I, Alrahwam A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis* 1998;26:1182-1187.
361. Razonable RR, Lewallen DG, Patel R, Osmon DR. Vertebral osteomyelitis and prosthetic joint infection due to *Staphylococcus simulans*. *Mayo Clin Proc* 2001;76:1067-1070.
362. Read II, Bodey GP. Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin Infect Dis* 1992;15:197-210.
363. Reddy GS, Prakash JS, Prabakar V, et al. *Kocuria polaris* sp. nov., an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:183-187.
364. Reddy GS, Prakash JS, Vairamani M, et al. *Planococcus antarcticus* and *Planococcus psychrophilus* spp. nov. isolated from cyanobacterial mat samples collected from ponds in Antarctica. *Extremophiles* 2002;6:253-261.
365. Relman DA, Ruoff K, Farraro MJ. *Stomatococcus mucilaginosus* endocarditis in an intravenous drug abuser. *J Infect Dis* 1987;5:1080-1082.
366. Renneberg J, Reineck K, Gutschnick E. Evaluation of Staph ID32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1150-1153.
367. Rhoden DL, Hancock GA, Miller JM. Numerical approach to reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:490-493.
368. Rhoden DL, Miller JM. Four-year prospective study of Staph-Ident system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus* spp. *J Clin Microbiol* 1995;33:96-98.
369. Riley TV, Schneider PF. Infrequency of slime production by urinary isolates of *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect* 1992;24:63-66.
370. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, et al. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 1992;30:3217-3219.
371. Romano I, Giordano A, Lama L, et al. *Planococcus rifietensis* sp. nov., isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst Appl Microbiol* 2003;26:357-366.
372. Rosenstein R, Gotz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* 2000;82:1005-1014.
373. Rossney AS, English LF, Keane CT. Coagulase testing compared with commercial kits for routinely identifying *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 1990;43:246-252.
374. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with bacteremia. *Emerg Infect Dis* 1999;5:147-149.
375. Ruane RJ, Morgan MM, Citron DM, et al. Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1986;24:490-491.
376. Rubin RH, Moellering RC Jr. Clinical microbiologic and therapeutic aspects of purulent pericarditis. *Am J Med* 1975;59:68-71.
377. Rubin SJ, Lyons RW, Murcia AJ. Endocarditis associated with cardiac catheterization due to gram-positive coccus designated *Micrococcus mucilaginosus* incertae sedis. *J Clin Microbiol* 1978;7:546-549.
378. Rupp ME, Soper DE, Archer GL. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2975-2979.
379. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, et al. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular of biomaterial-based infection in a mouse foreign body model. *Infect Immun* 1999;67:2627-2632.
380. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* 1999;67:2656-2659.
381. Salar A, Carratala J, Fernandez-Sevilla A, et al. Pneumonia caused by *Micrococcus* species in a neutropenic patient with acute leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:546-548.
382. Sandoe JA, Kerr KG, Reynold GW, Jain S. *Staphylococcus capitis* endocarditis two cases and review of the literature. *Heart (Br Card Soc Online)* 1999;82:el.
383. Sandoe JA, Longshaw CM. Ventriculoperitoneal shunt infection caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:385-387.
384. Sanyal D, Johnson AP, George RC, et al. Peritonitis due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet* 1991;337:54.
385. Saravolatz LD, Pohold DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med* 1982;97:325-329.
386. Saria D, Hayden M, Verma P. Evaluation of Dryspot Staphytest Plus for the differentiation of *Staphylococcus* species. Abstracts of the 100th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington American Society for Microbiology, Washington, DC: American Society for Microbiology, 2000:184.
387. Sau S, Sun J, Lee CY. Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997;179:1614-1621.
388. Schleifer KH, Fischer U. Description of a new species in the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:153-156.
389. Schleifer KH, Geyer U, Kilpper-Balz R, et al. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos, et al.) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos, et al.) comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 1983;4:382-387.
390. Schleifer KH, Kilpper-Balz R, Devriese LA. *Staphylococcusw arlettae* sp. nov., equorum sp. nov., and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst Appl Microbiol* 1984;5:501-509.
391. Schleifer KH, Kloos WE. Isolation and characterization of staphylococci from human skin I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosum*. *Int J Syst Bacteriol* 1975;25:50-61.
392. Schleifer KH, Kloos WE. A simple test system for the separation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 1975;11:337-338.
393. Schlievert PM. *Staphylococcal enterotoxin B* and toxic shock Syndrome toxin-1 are significantly associated with non-menstrual TSS. *Lancet* 1986;1:1149-1150.
394. Schlievert PM, Shands KN, Dan B, et al. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *J Infect Dis* 1981;143:509-516.
395. Schmalzried TP, Amstutz HC, Au MK, et al. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1992;280:200-202.
396. Schmitz FJ, Steiert M, Hofmann B, et al. Development of multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 1998;47:335-340.
397. Schneider PF, Riley TV. Cell-surface hydrophobicity of *Staphylococcus saprophyticus*. *Epidemiol Infect* 1991;106:71-75.
398. Schneider PF, Riley TV. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections: epidemiological data from Western Australia. *Eur J Epidemiol* 1996;12:51-54.
399. Schnitzler N, Meilicke R, Conrads G, et al. *Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy. *J Clin Microbiol* 1998;36:812-813.
400. Schumann P, Sproer C, Burghardt J, et al. Reclassification of the species *Kocuria erythromyxa* (Brooks and Murray 1981) as *Kocuria rosea* (Flügge 1886). *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:393-396.
401. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, et al. In vitro activity of LY333328n, an investigational glycopeptide antibiotic, against enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2416-2419.
402. Schwalbe RS, Ritz WJ, Verma PR, et al. Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *J Infect Dis* 1990;161:45-561.
403. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 1987;316:927-931.
404. Schwarzkopf A, Karch H, Schmidt H, et al. Phenotypic and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2281-2285.
405. Shimaoka M, Yoh M, Segawa A, et al. Development of enzyme-labeled oligonucleotide probe for detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1866-1869.
406. Shiro H, Meluleni A, Groll A, et al. The pathogenic role of *Staphylococcus epidermidis* capsular polysaccharide/adhesin in a low-inoculum rabbit model of prosthetic valve endocarditis. *Circulation* 1995;92:2715-2722.
407. Shiro H, Muller E, Gutierrez N, et al. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* 1994;169:1042-1049.
408. Shuttlesworth R, Behme RJ, McNabb A, Colby WD. Human isolates of *Staphylococcus caprae*: association with bone and joint infections. *J Clin Microbiol* 1997;35:2537-2541.
409. Sieradzki K, Roberts RH, Serur D, et al. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J Clin Microbiol* 1999;37:39-44.
410. Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;47:100-107.
411. Simons JW, Van Kampen MD, Riel S, et al. Cloning purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*—comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *Eur J Biochem* 1998;253:675-683.
412. Singh VR, Raad I. Fatal *Staphylococcus saprophyticus* native valve endocarditis in an intravenous drug addict. *J Infect Dis* 1990;162:784-785.
413. Skulnick M, Patel MP, Low DE. Evaluation of five commercial systems for identification of staphylococci to species level. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:1001-1003.
414. Skulnick M, Simor AE, Patel MP, et al. Evaluation of three methods for the rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19:5-8.
415. Sloos JH, Horrevorts AM, Van Boven CP, Dijkshoorn L. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. *J Clin Pathol* 1998;51:62-67.
416. Sloos JH, Van de Klundert JA, Dijkshoorn L, Van Boven CP. Changing susceptibilities of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin in a teaching hospital. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:787-791.
417. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999;340:493-501.
418. Soldati D, Mudry A, Monnier P. Necrotizing otitis externa caused by *Staphylococcus epidermidis*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:439-441.
419. Sorlin P, Maes N, Deplano A, et al. Chorioamnionitis as a apparent source of vertical transmission of *Staphylococcus cohnii* and *Ureaplasma urealyticum* to a neonate. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:807-808.
420. Soro O, Grazi G, Valardo PE, et al. Phosphatase activity of staphylococci is constitutive in some species and repressed by phosphates in others. *J Clin Microbiol* 1990;28:2707-2710.
421. Sotutu V, Carapetis J, Wilkinsin J, et al. The surreptitious *Staphylococcus*: *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis in a child. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:984-986.

422. Spellerberg B, Steidel K, Lutticken R, Haase G. Isolation of *Staphylococcus caprae* from blood cultures of a neonate with congenital heart disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;7:61-62.
423. Stackbrandt E, Koch C, Gvozdiak O, Schumann O. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. amend. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:682-692.
424. Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis* 1996;23:255-259.
425. Stepanovic S, Dakic I, Djukic S, et al. Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:685-686.
426. Stepanovic S, Vukovica D, Trajkovic V, et al. Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*. *FEMA Microbiol Lett* 2001;15:47-53.
427. Stoakes L, John MA, Lannigan R, et al. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:1908-1910.
428. Stoakes L, Schieven BC, Ofori E, et al. Evaluation of the MicroScan Rapid Pos Combo panels for identification of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1992;30:93-95.
429. Stringfellow WT, Dassy B, Lieb M, Fournier JM. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:618-621.
430. Sturgess I, Martin FC, Eykyn S. Pubic osteomyelitis caused by *Staphylococcus simulans*. *Postgrad Med J* 1993;69:927-929.
431. Supersac G, Prevost G, Piemont Y. Sequencing of leukocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leukocidins and γ -hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun* 1993;61:580-587.
432. Tabé Y, Nakamura A, Oguri T, Igari J. Molecular characterization of epidemic multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:177-183.
433. Takagi Y, Futamura S, Asada Y. Action site of exfoliative toxin on keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1990;94:52-54.
434. Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:725-728.
435. Talen DA, Goldstein EJC, Staatz D, et al. *Staphylococcus intermedius*: clinical presentation of a new human dog bite pathogen. *Ann Emerg Med* 1989;18:410-413.
436. Talen DA, Staatz D, Staatz A, et al. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted wound infections: a newly recognized zoonotic pathogen. *J Clin Microbiol* 1989;27:78-81.
437. Talen DA, Staatz D, Staatz A, et al. Frequency of *Staphylococcus intermedius* as human nasopharyngeal flora. *J Clin Microbiol* 1989;27:2393.
438. Talon R, Dublet N, Montel MC, Cantonnet M. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr Microbiol* 1995;30:11-16.
439. Tan R, White V, Servais G, et al. Postoperative endophthalmitis caused by *Stomatococcus mucilaginosus*. *Clin Infect Dis* 1994;18:492-493.
440. Tanasupawat S, Hashimoto Y, Ezaki T, et al. *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov. from fermented fish in Thailand. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:577-581.
441. Tanner MA, Everett CL, Youvan DC. Molecular phylogenetic evidence for non invasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J Clin Microbiol* 2000;38:1628-1631.
442. Tee WS, Soh SY, Lin R, Loo LH. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. *J Clin Microbiol* 2003;41:519-520.
443. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:407-415.
444. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001;7:327-332.
445. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36:1020-1027.
446. Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* 1998;66:5183-5189.
447. Thomson-Carter FM, Pennington TH. Characterization of coagulase-negative staphylococci by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2199-2203.
448. Timmerman CP, Fleer A, Besnier JM, et al. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991;59:4187-4192.
449. Todd J, Fishaut M. Toxic shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. *Lancet* 1978;2:1116-1118.
450. Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, et al. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1988;157:713-722.
451. Tolaymat A, Al-Jayoussi Z. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infection in male children. *Child Nephrol Urol.* 1991;11:100-102.
452. Torre D, Ferraro G, Fiori GP, et al. Ventriculoatrial shunt infection caused by *Staphylococcus warneri*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:49-52.
453. Trevino M, García-Zabarte A, Quintas A, et al. *Stomatococcus mucilaginosus* septicemia in a patient with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:505-507.
454. Tselenis-Kotsowilis AD, Koliomichalis MP, Papavasiliou TT. Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosum*. *J Clin Microbiol* 1982;16:593-594.
455. Tu KK, Palutke WA. Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1976;3:77-78.
456. Tveten Y. Evaluation of new agglutination test for identification of oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1333-1334.
457. Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, et al. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1992;30:1728-1733.
458. Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal exotoxin: formation of the heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 1997;36:13298-13304.
459. Van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1537-1517.
460. Vandenesch F, Celard M, Arpin D, et al. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2508-2510.
461. Vandenesch F, Etienne J, Reverdy ME, et al. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:871-876.
462. Vandenesch F, Eykyn SJ, Bes M, et al. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolated as human pathogens and from goat milk. *J Clin Microbiol* 1995;33:888-892.
463. Vandenesch F, LeBeau C, Bes M, et al. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:388-392.
464. Vandenesch F, Perrier-Gros-Claude JD, Bes M, et al. Staphylococcus pasteuri-specific oligonucleotide probes derived from a randomly amplified DNA fragment. *FEMS Microbiol Lett* 1995;132:147-152.
465. Van Der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, et al. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J Clin Microbiol* 2003;41:1404-1409.
466. Van Der Zwet WC, Debets-Ossenopp YJ, Reinders E, et al. Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002;40:2520-2525.
467. Van Kampen MD, Rosenstein R, Gotz F, Egmond MR. Cloning, purification and characterization of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochem Biophys Acta* 2001;1544:229-241.
468. van Leeuwen WB, Van Pelt C, Luijendijk A, et al. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-Screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1999;37:309-3030.
469. Varaldo PE, Kilpper-Balz R, Biavasco F, et al. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:436-439.
470. Veach LA, Pfäffer MA, Barrett M, et al. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 1990;28:2064-2018.
471. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Meugnier H, et al. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1521-1527.
472. Villard L, Kodjo A, Borges E, et al. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosum* by 16-23S spacer amplification. *FEMS Microbiol Lett* 2000;185:83-87.
473. Von Baum H, Klemme FR, Geiss HK, Sonntag H-G. Comparative evaluation of a commercial system for identification of gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:849-852.
474. Von Eiff C, Kuhn N, Herrmann M, et al. *Micrococcus luteus* as a cause of recurrent bacteremia. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:711-713.
475. Von Eiff C, Vandaux P, Kahl J, et al. Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation. *Clin Infect Dis* 1999;29:932-934.
476. Von Rheinbaben KE, Hadlock RM. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agar. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol Serol* 1981;47:41-51.
477. Wade JC, Schimpf SC, Newman KA. *Staphylococcus epidermidis*: an increasing cause of infection in patients with granulocytopenia. *Ann Intern Med* 1982;96:1-10.
478. Waldvogel FA. Chapter 183. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. New York: Churchill-Livingstone. 2002:2069-2092.
479. Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for *DnaE* detection. *J Clin Microbiol* 1985;21:195-199.
480. Wallet F, Stuit L, Boulanger E, et al. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis* 2000;32:697-698.
481. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001;39:2439-2444.
482. Wang EEL, Prober CG, Hendrick BE, et al. Prophylactic sulfamethoxazole and trimethoprim in ventriculoperitoneal shunt surgery. *JAMA* 1984;251:1174-1177.
483. Wang SM, Liu CC, Teng HW, et al. *Staphylococcus capitis* bacteremia of very low birth weight premature infants at neonatal intensive care units: clinical significance and antimicrobial susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect* 1999;32:26-32.
484. Wanger AR, Morris SL, Ericsson C, et al. Latex agglutination-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from neonates: epidemiologic feature and comparison of typing methods. *J Clin Microbiol* 1992;30:2583-2588.
485. Wasserman E, Lombard L, Walzi G. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis in a young previously healthy female. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:289-291.

486. Weber DJ, Hoffman KL, Thoft RA, et al. Endophthalmitis following intraocular lens implantation: report of 30 cases and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1986;8:12-20.
487. Webster JA, Bannerman TL, Hubner RJ, et al. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rDNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:454-460.
488. Weinblatt ME, Sahdev I, Berman M. *Stomatococcus mucilaginosus* infections in children with leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:678-679.
489. Weinstein MP, Murrett S, Van Pelt L, et al. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive panels versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol* 1998;36:2089-2092.
490. Wenzel RP, Edmond MB. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. *Clin Infect Dis* 1998;27:245-251.
491. Wenzel RP, Reagen DR, Bertino JS, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am J Infect Control* 1998;26:102-110.
492. Wergeland HI, Haaheim LR, Natas OB, et al. Antibodies to staphylococcal peptidoglycan and its peptide epitopes, teichoic acid, and lipoteichoic acid in sera from blood donors and patients with staphylococcal infections. *J Clin Microbiol* 1989;27:1286-1291.
493. West TE, Walshe JJ, Krol CP, et al. Staphylococcal peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1986;23:809-812.
494. Westblom TU, Gorse J, Milligan TW, et al. Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2818-2819.
495. Wharton M, Rice JR, Mcallum R, et al. Septic arthritis due to *Micrococcus luteus*. *J Rheumatol* 1986;13:659-660.
496. Wieser M, Denner EBM, Kampfer P, et al. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos, et al. 1974) *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:629-637.
497. Wilkerson MS, McAllister S, Mill JM, et al. Comparison of five agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1997;35:148-151.
498. Wood CA, Sewell DL, Strausbaugh LJ. Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis caused by *Staphylococcus warneri*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:261-263.
499. Wooster DL, Louch RE, Krajden S. Intraoperative bacterial contamination of vascular grafts: a prospective study. *Can J Surg* 1985;28:407-409.
500. Wu S, de Leucastre H, Tomasz A. Genetic organization of the mecA region in methicillin-susceptible and methicillin-resistance strains of *Staphylococcus sciuri*. *J Bacteriol* 1998;180:236-242.
501. Yonezawa M, Takahata M, Banzawa-Futakuchi N, et al. DNA gyrase gyrA mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1065-1066.
502. Yoon JH, Kang SS, Lee KC, et al. *Planomicrobium koreense* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the Korean traditional fermented seafood jeotgal, and transfer of *Planococcus okenokoites* (Nakagawa, et al. 1996) and *Planococcus mcmeekini* (Junge, et al. 1998) to the genus *Planobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51: 1511-1520.
503. Yoon JH, Weiss N, Kang KH, et al. *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:2013-2017.
504. Yoo YO, Kim KJ, Min BM, Chung CP. *Staphylococcus lugdunensis* potential pathogen in oral infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:287-302.
505. Yu J, Montelius MN, Paulsson M, et al. Adhesion of coagulase-negative staphylococci and adsorption of plasma proteins to heparinized polymer surfaces. *Biomaterial* 1994;15:805-814.
506. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, et al. A novel mechanisms of phase variation in virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999;32:345-356.

Cocos grampositivos

Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias “similares a *Streptococcus*”

Características generales de los estreptococos

Estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

Factores de virulencia
Importancia clínica

Estreptococos β -hemolíticos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*)

Factores de virulencia
Importancia clínica

Estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G

Estreptococos β -hemolíticos del grupo F

Otros estreptococos del grupo de “cocos piógenos”

Streptococcus pneumoniae
Factores de virulencia
Vacunas antineumocócicas
Importancia clínica

Estreptococos viridans

Grupo anginoso: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*

Estreptococos del grupo D: el “complejo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*” y especies relacionadas

Streptococcus suis

Otros estreptococos viridans aislados en animales

Otros estreptococos

Especies de *Enterococcus*

Taxonomía
Factores de virulencia
Importancia clínica
Género *Melissococcus*

Bacterias “similares a *Streptococcus*”

Especies de *Abiotrophia* y de *Granulicatella*
Especies de *Aerococcus* y de *Helcococcus*
Especies de *Leuconostoc*
Especies de *Pediococcus* y de *Tetragenococcus*
Especies de *Gemella*
Especies de *Vagococcus*
Especies de *Alloiococcus*
Especies de *Globicatella*
Especies de *Facklamia*
Especies de *Dolosigranulum*, *Ignavigranum* y *Dolosicoccus*

Especies de *Eremococcus*

Género *Lactococcus*

Aislamiento e identificación de estreptococos y bacterias "similares a *Streptococcus*"

Frotis directos con tinción de Gram

Medios de cultivo

Hemólisis en agar sangre

Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β -hemolíticos del grupo A en muestras faríngeas

Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β -hemolíticos del grupo B y *Streptococcus pneumoniae*

Morfología de las colonias y prueba de la catalasa

Reconocimiento y caracterización preliminar de los estreptococos y las bacterias "similares a *Streptococcus*"

Identificación presuntiva de estreptococos

Sensibilidad a la bacitracina

Sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol

Prueba CAMP y producción de pigmento

Hidrólisis de hipurato de sodio

Prueba de bilis esculina

Prueba de tolerancia a la sal (caldo de NaCl al 6,5%)

Prueba de la leucina aminopeptidasa (LAP)

Prueba de la pirrolidónil arilamidasa (PYR)

Sensibilidad a la optoquina

Prueba de solubilidad en bilis

Pruebas comerciales de identificación presuntiva

Identificación serológica de estreptococos β -hemolíticos

Prueba de la precipitina capilar

Coaglutinación

Aglutinación del látex

Identificación serológica de *Streptococcus pneumoniae*

Características bioquímicas para la identificación de estreptococos agrupables

Identificación de estreptococos viridans

Grupo Sanguis

Grupo Mitis

Grupo Mutans

Grupo Salivarius

Grupo Anginosus

Grupo Bovis

Identificación de *Streptococcus suis* y otros estreptococos aislados en animales

Identificación de especies de *Enterococcus*

Identificación de especies de *Abiotrophia* y *Granulicatella*

Identificación de especies de *Aerococcus* y *Helcococcus*

Identificación de especies de *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*

Identificación de especies de *Gemella*

Identificación de especies de *Vagococcus*

Identificación de especies de *Alloiococcus*, *Globicatella*, *Facklamia*, *Dolosigranulum*, *Ignavigranum* y *Dolosicoccus*

Identificación de especies de *Lactococcus*

Sistemas comerciales para la identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas

API Rapid Strep

Sistema de identificación para grampositivos BBL Crystal

Rapid ID 32 Strep

Rapid STR

Tarjeta de identificación para grampositivos Vitek (GPI)

Panel combinado de valor crítico para grampositivos de Microscan

Los estreptococos, los enterococos y las bacterias similares a *Streptococcus* son bacterias grampositivas, catalasa negativas que tienden a crecer en pares y en cadenas. La detección de las enzimas citocromo con la prueba de catalasa distingue a los miembros de distintos grupos de especies de micrococos y estafilococos (catalasa positivos) de los estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*", que son catalasa negativos. Como sucede con otros grupos de microbios, la clasificación y la taxonomía de los estreptococos y las bacterias similares a *Streptococcus* han cambiado radicalmente con las descripciones de varios géneros nuevos de cocos catalasa negativos. Estos cambios tienen una importancia que excede lo académico para los microbiólogos clínicos ya que, a medida que se avanza en el siglo XXI, se aíslan cada vez con más frecuencia microorganismos pertenecientes a estos grupos en infecciones humanas que antes eran infrecuentes y, aunque se investiga activamente, aún se desconoce el

potencial patogénico de las especies viejas y de las recién descritas.

La aplicación de métodos taxonómicos moleculares y la descripción de varios géneros nuevos de cocos grampositivos catalasa negativos han conducido a una reorganización compleja de la taxonomía de los estreptococos en comparación con la publicada en la edición de 1984 del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*. En un principio se utilizaban los métodos moleculares como hibridación de DNA-DNA, hibridación de DNA-RNA ribosómico (rRNA) y secuenciación de rRNA de subunidades pequeñas (16S) para validar la división de la familia *Streptococcaceae* en los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, y no se los ha aplicado a los estreptococos viridans recientemente descritos, enterococos y otras cepas catalasa negativas para determinar sus relaciones con estos tres géneros.^{79,80,558} En la nueva edición del *Manual de Bergey*, los cocos grampositivos catalasa negativos de origen humano se

clasifican en seis familias en el orden propuesto "Lactobacillales" y una familia en el orden Bacillales; ambos están en la clase "Bacilos" en el filo *Firmicutes* (recuadro 13-1). El género *Streptococcus*, que contiene los patógenos humanos más importantes, puede ser dividido operacionalmente en siete grupos, como se muestra en el recuadro 13-2.

Con la descripción de varios géneros y especies nuevas de cocos grampositivos, catalasa negativos en la última década, se debe agregar una nota en relación con los nombres bacterianos utilizados en este capítulo. En general, los taxonomistas Bacterianos siguen las reglas para nombrar las bacterias como se describen en el Código Internacional de Nomenclatura bacteriana (International Code of Nomenclature of Bacteria), pero con el paso de los años algunos nombres de bacterias que aparecen en la bibliografía son gramaticalmente incorrectos en relación con el Código Internacional, como sucede con los nombres de las especies de uso común para cuatro estreptococos viridans—*S. sanguis*, *S. crista*, *S. parasanguis* y *S. rattus*—que deben modificarse a *S. sanguinis*, *S. cristatus*, *S. parasanguinis* y *S. ratti*. Sin embargo, otra regla del Código Internacional establece que la libertad para "corregir" un nombre bacteriano se debe utilizar con precaución y se debe reservar para evitar la confusión. Si bien se han propuesto estos cambios en la nomenclatura gramatical, otros autores recomendaron la conservación de los nombres "gramaticalmente incorrectos" familiares más antiguos, conducta que se ha adoptado^{567,968} en este capítulo en gran parte para evitar confusiones.

Características generales de los estreptococos

Los estreptococos son anaerobios facultativos, aunque algunas cepas crecen mejor en condiciones anaerobias. Si bien casi todas las especies crecen en el aire, el crecimiento de la mayoría de ellas es estimulado por un aumento del CO_2 . Los estreptococos, los enterococos y los aerococos de importancia clínica son **homofermentadores**, lo que significa que el único producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico sin producción de gas. Los estreptococos también son catalasa negativos y oxidasa negativos, propiedad que, junto con la tinción de Gram, diferencia los estreptococos de las especies de *Neisseria*. Los miembros del género *Streptococcus* crecen característicamente en cadenas (o cadenas de diplococos) cuando lo hacen en medios de caldo. Esta característica es compartida con los enterococos, los lactococos y algunos géneros recién reconocidos o propuestos (especies de *Leuconostoc*, especies de *Vagococcus* y especies de *Globicatella*). Otras bacterias similares a *Streptococcus* (aerococos, especies de *Alloiococcus*, especies de *Gemella*, especies de *Pediococcus*,

especies de *Tetragenococcus* y especies de *Helcococcus*) crecen como pares o tétradas en caldo. La disposición celular se evalúa mejor mediante la tinción de Gram de un cultivo del microorganismo que crece en caldo de tioglicolato. Cuando se utiliza este caldo se debe fijar el preparado del frotis en metanol después de la desecación por aire, en lugar de fijarse con calor, para evitar que las bacterias "desaparezcan" del portaobjetos durante el proceso de tinción.

La composición de la pared celular de los estreptococos es similar a la de otras bacterias grampositivas, que están compuestas principalmente por peptidoglucano, en el cual están introducidos distintos hidratos de carbono, ácidos teicoicos, lipoproteínas y antígenos proteicos de superficie (véase cap. 5). Algunas especies de estreptococos pueden ser clasificadas desde el punto de vista serológico sobre la base de los antígenos de la superficie celular constituidos por hidratos de carbono. El trabajo pionero de Rebecca Lancefield estableció el sistema de grupos que lleva su nombre para los estreptococos β -hemolíticos.⁵⁹⁶ Los antígenos detectados en el sistema de grupos de Lancefield son polisacáridos de la pared celular (como en los estreptococos humanos grupos A, B, C, F y G) o son ácidos lipoteicoicos de la pared celular (estreptococos del grupo D y especies de *Enterococcus*). Al principio, estos antígenos de la pared celular eran extraídos con ácido hidroc্লórico o nitroso diluido, formamida o mediante tratamiento con autoclave, y se determinaron los grupos por las reacciones de las precipitinas capilares. Los sistemas comerciales para la determinación de grupos de estreptococos utilizan técnicas de extracción enzimática y coaglutinación o aglutinación de partículas del látex para detectar antígenos. Otros estreptococos, sobre todo los miembros de los grupos de los estreptococos viridans no tienen ninguno de los antígenos de la pared celular que determinan los grupos de Lancefield, aunque algunas cepas pueden tener antígenos similares que darán reacciones cruzadas con anticuerpos específicos de grupos de estreptococos β -hemolíticos. Los estreptococos viridans bien estudiados, como el microorganismo cariogénico *S. mutans*, han sido divididos en serotipos según los carbohidratos antigénicos de su propia pared celular. Más tarde, los distintos serotipos de *S. mutans* fueron elevados al estado de especie y comprenden ahora el "grupo mutans" de los estreptococos bucales.

Estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

Factores de virulencia

Los estreptococos patógenos tienen varias características que contribuyen a su virulencia. Los mecanismos de virulencia

Recuadro 13-1 Clasificación de los estreptococos, Enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" del Dominio Bacteria, filo *Firmicutes*, clase "Bacilli"

Orden	Familia	Género
Bacillales	"Staphylococcaceae"	<i>Gemella</i>
"Lactobacillales"	"Lactobacillaceae"	<i>Pediococcus</i>
	"Aerococcaceae"	<i>Aerococcus</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Dolosicoccus</i> , <i>Eremococcus</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Globicatella</i> , <i>Ignavigranum</i>
	"Carnobacteriaceae"	<i>Alloiococcus</i> , <i>Dolosigranulum</i>
	"Enterococcaceae"	<i>Enterococcus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> , <i>Vagococcus</i>
	"Leuconostocaceae"	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i>
	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>

Recuadro 13-2 Grupos de especies de estreptococos sobre la base del análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas

Grupo	Nombre del grupo	Miembros del grupo (grupo[s] de Lancefield)	Hábitats
I	Grupo piógeno	<i>S. pyogenes</i> (estreptococos β-hemolíticos del grupo A) <i>S. agalactiae</i> (estreptococos β-hemolíticos del grupo B) <i>S. equi</i> subespecie <i>equi</i> (estreptococos β-hemolíticos del grupo C) <i>S. equi</i> subespecie <i>zooepidemicus</i> (estreptococos β-hemolíticos del grupo C) <i>S. dysgalactiae</i> subespecie <i>dysgalactiae</i> (estreptococos β-hemolíticos de los grupos C y L) <i>S. dysgalactiae</i> subespecie <i>equisimilis</i> (estreptococos β-hemolíticos de los grupos C y G) <i>S. canis</i> (estreptococos de los grupos G, L y M) <i>S. iniae</i> (designación de grupos distintos de Lancefield) <i>S. porcinus</i> (estreptococos grupos E, P, U y V) <i>S. phocae</i> (estreptococos grupos C, F o no agrupables) <i>S. didelphis</i> (sin grupo) <i>S. urinalis</i> (sin grupo)	Seres humanos Seres humanos Caballos, burros Muchos animales Cerdos, ganado bovino Seres humanos Muchos animales Delfines de agua dulce Cerdos, seres humanos Focas Zarigüeyas Seres humanos
II	Grupo Sanguis	<i>S. sanguis</i> (<i>S. sanguinis</i>) (3 biotipos) <i>S. parasanguis</i> (<i>S. parasanguinis</i>) <i>S. gordonii</i> <i>S. sinensis</i>	Seres humanos Seres humanos Seres humanos Seres humanos
III	Grupo Mitis	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. crista</i> (<i>S. cristatus</i>) <i>S. peroris</i> <i>S. infantis</i> <i>S. australis</i> <i>S. oligofermentans</i>	Seres humanos Seres humanos Seres humanos Seres humanos Seres humanos Seres humanos Seres humanos
IV	Grupo Mutans	<i>S. mutans</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. downei</i> <i>S. rattus</i> (<i>S. ratti</i>) <i>S. macacae</i> <i>S. ferus</i>	Seres humanos Seres humanos Hámsters, ratas (seres humanos) Monos Ratas, seres humanos Monos Ratas
V	Grupo Salivarius	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. infantarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. hyointestinalis</i>	Seres humanos Seres humanos Seres humanos Productos lácteos Hembras porcinas
VI	Grupo Anginosus	<i>S. constellatus</i> , subespecies <i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i>	Seres humanos Seres humanos Seres humanos
VII	Grupo Bovis	<i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i> <i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>gallolyticus</i> (<i>S. bovis</i> I) <i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i> (<i>S. bovis</i> II.2) (" <i>S. pasteurianus</i> ") <i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>macedonicus</i> (<i>S. macedonicus</i> , <i>S. waius</i>) <i>S. infantarius</i> subespecie <i>infantarius</i> (<i>S. bovis</i> II.1) <i>S. infantarius</i> subespecie <i>coli</i> (" <i>S. lutetiensis</i> ") <i>S. alactolyticus</i> <i>S. suis</i> (grupos R, S, T)	Ganado bovino, caballos Seres humanos, ganado bovino, koalas, osos Seres humanos Ambiental (quesos) Seres humanos, ganado bovino Seres humanos Cerdos, perros, pollos Cerdos, ganado bovino, seres humanos
	Otros	<i>S. uberis</i> / <i>parauberis</i> (Grupo E o no agrupable) <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. hyovaginalis</i> <i>S. thoraltensis</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. uberis</i> / <i>parauberis</i> (Grupo E o no agrupable) <i>S. entericus</i> <i>S. ovis</i> <i>S. gallinaceus</i> <i>S. minor</i>	Ganado bovino Cerdos Cerdos Cerdos Ganado bovino, ovejas, gatos, canarios Ganado bovino Ganado bovino Ovejas Pollos Perros, gatos, ganado bovino

de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*S. pyogenes*), en particular, han sido estudiados en forma extensa. Este microorganismo sigue siendo un patógeno humano extremadamente importante cuyos únicos reservorios conocidos en la naturaleza son la piel y las mucosas de los seres humanos. En los Estados Unidos, las infecciones por estreptococos del grupo A ocurren con una tasa anual de unos 3,5 casos por 100 000 habitantes, lo que conduce a más de 9 600 casos y 1 100 a 1 300 muertes por año.⁷³⁴ Además de las infecciones agudas, los estreptococos del grupo A se han asociado con dos secuelas no supuradas –fiebre reumática aguda y glomerulonefritis posestreptocócica aguda– que siguen ocurriendo, sobre todo en los países en vías de desarrollo.

La pared celular de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A consiste en un peptidoglucano grueso junto con ácidos lipoteicoicos integrales y otras moléculas asociadas con la superficie, como se describe en el capítulo 5. Se cree que los ácidos lipoteicoicos integrales desempeñan un papel central en la promoción de la adherencia inicial de estos estreptococos a las células epiteliales faríngeas.^{66,737} Además de los ácidos lipoteicoicos integrales, se describieron otras varias adhesinas de los estreptococos del grupo A, diversas proteínas que fijan fibronectina, como la proteína F1 (Sfbl, proteína fijadora de fibronectina de los estreptococos), y las proteínas F2 (SbfII), FPB54 y PFBP.^{239,459,529,588,817} Estas últimas promueven la adherencia tanto al tipo celular faríngeo como cutáneo. También se cree que las proteínas M desempeñan un papel en la adherencia, sobre todo a los queratinocitos en la piel a través de la interacción con el cofactor de la membrana de los queratinocitos CD46.⁷³⁹ El principal antígeno de la pared celular del grupo A es un polisacárido complejo que consiste en L-ramnosa y N-acetil-D-glucosamina en una relación 2:1.¹⁰⁰ El antígeno está unido de forma covalente al peptidoglucano. El papel del antígeno de grupo de la pared celular como factor de virulencia se desconoce, aunque el material peptidoglucano propiamente dicho tiene actividad biológica, que incluye la inducción de fiebre, necrosis dérmica y cardíaca en animales, lisis de eritrocitos y plaquetas, y aumento de la resistencia inespecífica.

Algunas cepas del grupo A tienen una **cápsula** de ácido hialurónico, un polímero lineal de alto peso molecular compuesto por unidades repetidas de disacáridos con uniones β (1-4) de ácido D-glucurónico y (1-3)- β -D-N-acetilglucosamina.¹⁰³⁸ Este material es el producto de enzimas codificadas por un grupo de tres genes que consiste en *hasA*, *hasB* y *hasC*.²⁴² Estos tres genes codifican una ácido hialurónico sintasa, una UDP-glucosa deshidrogenasa y una glucosa pirofosforilasa, respectivamente.¹⁷ y se encuentran altamente conservados entre las cepas de estreptococos del grupo A. Es probable que las variaciones en el grado de expresión de los genes capsulares reflejen diferencias en la regulación de la transcripción genética. Las cepas que tienen una expresión máxima de estos genes parecen mucoides cuando crecen en agar sangre de carnero.¹⁰⁴¹ Dos productos genéticos, *CrsS* y *CrsR*, parecen funcionar como un sistema regulador de dos componentes que es capaz de aumentar o de disminuir el grado de encapsulación mediante una regulación positiva o negativa de la expresión del gen *has*.⁶²¹ Desde el punto de vista químico, este material capsular es indistinguible de la sustancia fundamental del tejido conectivo, lo que puede explicar la falta de inmunogenicidad de esta sustancia en el huésped infectado. In vitro, la producción de la cápsula es máxima durante el crecimiento logarítmico y los microorganismos eliminan sus cápsulas a medida que entran en la fase estacionaria de crecimiento; es probable que esta pérdida se deba a la elaboración de **hialuronidasa** durante las últi-

mas etapas de la fase de crecimiento logarítmico. La cápsula de ácido hialurónico funciona para ayudar a los microorganismos a resistir la destrucción de las células fagocíticas dependiente del complemento. En modelos animales, se ha demostrado que la cápsula de ácido hialurónico contribuye a la capacidad de los estreptococos del grupo A para causar infecciones invasoras de los tejidos blandos,⁴⁰ así como para adherirse a las células epiteliales al modular la interacción de la proteína M y otras moléculas de superficie y servir como ligando al unirse al receptor CD44 sobre las superficies de las células epiteliales.^{864,1038}

El principal factor de virulencia de *Streptococcus* del grupo A es un antígeno de la superficie celular designado **proteína M**.¹⁰⁰ Las proteínas M, proteínas fibrilares estables al ácido, termoestables y lábiles a la tripsina asociadas con la superficie externa de la pared celular, están compuestas por dos cadenas polipeptídicas que forman un complejo entre ellas en una configuración de hélices α enrolladas entre sí.³⁶³ La proteína M está unida a la membrana celular, se extiende a través de la capa de peptidoglucano y se proyecta desde la superficie de la célula bacteriana (fig. 13-1).⁷⁷⁴ La secuencia de aminoácidos y la estructura del extremo carboxilo terminal de la molécula se disponen dentro de la membrana celular y la pared celular del microorganismo y casi no presentan variaciones entre las cepas del grupo A. El extremo N se extiende más allá de la superficie celular y termina con una secuencia de unos 11 residuos aminoácidos. Esta secuencia terminal varía entre las cepas clínicas y constituye la base para la clasificación serológica de Lancefield de los estreptococos del grupo A. Las cepas que son ricas en proteína M son resistentes a la fagocitosis y la destrucción intracelular por los leucocitos polimorfonucleares; las células que carecen de proteína M demostrable son fácilmente fagocitadas y destruidas.⁵⁹⁷ Al parecer la proteína M ejerce sus efectos antifagocíticos interfiriendo en la opsonización de las células bacterianas a través de la vía alternativa del complemento.⁹⁵ Las proteínas M también pueden formar complejos con fibrinógeno que luego se unen a integrinas β_2 de los neutrófilos. Esta unión produce la liberación de mediadores inflamatorios que inducen pérdida vascular, un componente patológico del shock tóxico estreptocócico.⁴⁸¹ La tipificación serológica de M suele realizarse en extractos ácidos calientes de estreptococos del grupo A que utilizan técnicas de inmunodifusión en precipitinas capilares o gel de agarosa. Las cepas del grupo A expresan sólo un único antígeno tipo M y se han identificado 93 serotipos M diferentes utilizando estos métodos.^{334,543} Lamentablemente, muchas de estas cepas no son tipificables desde el punto de vista serológico; no existe el antisero M apropiado o es posible que la proteína M de una cepa dada no se exprese en forma óptima en las condiciones de cultivo.⁸⁰⁹ También se han identificado los genes que codifican distintas proteínas utilizando sondas de oligonucleótidos que corresponden a las secuencias NH₂-terminales de tipos M específicos.⁵⁵⁵ Estas sondas pudieron hibridarse con DNA genómico de cepas de estreptococos del grupo A obtenido por inmunotransferencia en puntos (*dot blot*) e identificar varios tipos M con mayor facilidad que los procedimientos de tipificación M serológicos convencionales. Además de la proteína M, algunos estreptococos tienen otras proteínas “similares a M” (p. ej., la proteína Spa de los estreptococos del grupo A tipo M 18) que se ha demostrado que contribuyen a la virulencia y la aumentan.⁶⁷⁸

La clonación del gen de la proteína M, denominado gen *emm*, ha conducido a la expansión y la estandarización de la tipificación *emm* para reemplazar el método serológico convencional. El sistema de tipificación *emm* se realiza median-

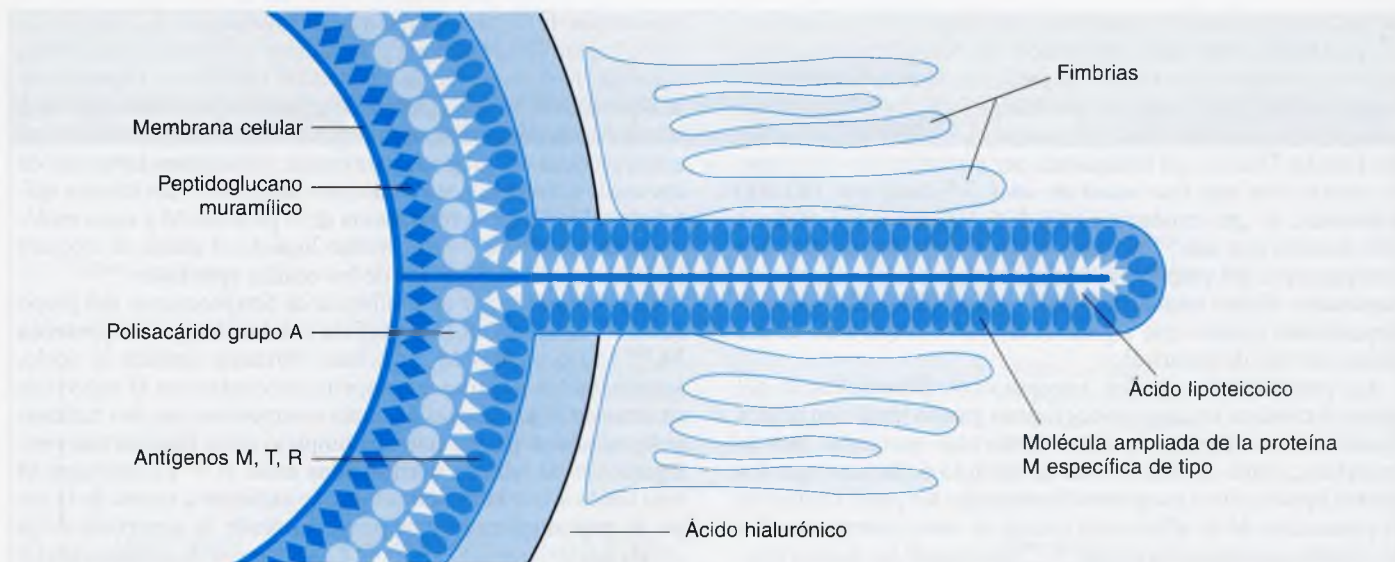


Figura 13-1 Principales determinantes antigénicos conocidos sobre la superficie de los estreptococos del grupo A encapsulados virulentos.

te el análisis de las secuencias de los residuos de nucleótidos NH_2 -terminales y ha conducido a la identificación de más de 124 genotipos *emm* reconocidos.^{340,848} La definición de una nueva secuencia de tipo *emm* se basa sobre la identificación de más de 160 bases de nucleótidos en el término 5' de la región hipervariable. Los diferentes tipos *emm* tendrán una homología de secuencia inferior al 80% con otros tipos *emm*.^{67,334} El análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas M de muchos tipos también ha identificado porciones de la molécula de la proteína M que son comunes entre varios tipos de proteína M; es decir, esta secuencia de aminoácidos está altamente conservada.⁷⁹¹ Los sueros de individuos que viven en diferentes regiones geográficas con tasas elevadas de infección estreptocócica reaccionaron con este péptido M conservado en un inmunanálisis de adsorción enzimática (ELISA). Además, los anticuerpos dirigidos contra este péptido pudieron opsonizar los estreptococos pertenecientes a distintos tipos M. Esta porción altamente conservada de la molécula de la proteína M es investigada mejor como posible antígeno para la vacuna contra la infección por estreptococos del grupo A y la fiebre reumática. Otras diversas proteínas de la superficie celular relacionadas con la proteína M han sido identificadas en los estreptococos del grupo A y los genes que codifican estas moléculas (p. ej., *enn*, *mrp*, *arp*, *fcrA*, *proth*) han sido agrupados como miembros de la superfamilia de genes *emm*.³³⁹ Al parecer, estas moléculas funcionan junto con las proteínas M para ayudar a los microorganismos a resistir la fagocitosis. Estas moléculas similares a las proteínas M también pueden unirse a varias proteínas del huésped como plasminógeno y fibrinógeno y, a través de esta interacción, ejercen además efectos antiopsonicos. Las secuencias de los tipos *emm* reconocidos pueden hallarse en línea en http://www.cdc.gov/nci-dod/biotech/infotech_hp.html.

El **factor de opacidad (OF)** describe otro antígeno de la superficie celular asociado con la proteína M de los estreptococos del grupo A que es un factor de virulencia posible.⁸⁰⁶ OF es una α -lipoproteína capaz de opacificar (volver opaco) los medios que contienen suero de mamífero.⁵⁴³ Los anticuerpos dirigidos contra OF son específicos al inhibir la reacción de

opacidad del tipo M que la produce, de modo que se puede utilizar la opacificación OF como reacción de tipificación suplementaria o complementaria. OF es producida por cepas que pertenecen a 29 tipos M diferentes y puede detectarse en aquellos tipos M incluso cuando la reactividad específica del tipo M se pierde o es indetectable (la presencia de OF sólo se asocia con tipos M específicos). Por lo tanto, las reacciones OF positivas y OF negativas se asocian en forma constante con los tipos M específicos. OF se asocia principalmente con cepas de estreptococos del grupo A aisladas en infecciones de la piel.⁹¹ Los estreptococos del grupo A también pueden tener antígenos T y R. Los antígenos T son antígenos estables al ácido y termoeestables que pueden estar limitados a un único tipo M o pueden ser compartidos por varios tipos M diferentes.¹⁰⁰ Ni el antígeno T ni el antígeno R se asocian con virulencia y pocas veces se los utiliza en los sistemas de tipificación actuales desde la descripción de la tipificación *emm* y OF. Además de estos métodos serológicos, los estreptococos del grupo A pueden ser tipificados mediante biotipificación fenotípica con sistemas de identificación comerciales, electroforesis de enzimas multilocus, polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), RFLP de genes rRNA (ribotipificación) y análisis de DNA polimorfo amplificado aleatorio.^{124,133,440,713,877}

Los estreptococos del grupo A producen dos hemolisinas: estreptolisina A y estreptolisina S. La **estreptolisina O (SLO)** es lábil al oxígeno, es antigénica, es inhibida por el colesterol y es tóxica para distintos tipos celulares, entre ellos leucocitos, monocitos y células en cultivo. Debido a su labilidad al oxígeno, SLO es principalmente responsable de la β -hemólisis que se observa alrededor de las colonias de la subsuperficie de los estreptococos del grupo A en las placas donde se vierten o en las regiones de corte de las placas de agar sangre de carnero con inoculación en superficie. También es producida por algunos estreptococos de los grupos C y G. Parece existir en dos formas activas, con pesos moleculares entre 50 y 70 kDa; la escisión de estas moléculas durante la secreción produce la forma completamente activa de SLO que tiene un peso molecular de unos 57 kDa.⁹³ SLO produce la formación de poros en la membrana de las células sensibles mediante la fijación ini-

cial de los monómeros de SLO al colesterol de la membrana celular. Esta unión conduce a un cambio en la conformación de la molécula que produce la congregación de otros monómeros de SLO sobre la membrana.⁸⁷⁶ Estos agregados forman al principio estructuras con aspecto de arco sobre la membrana que por último se convierten en poros completamente formados, lo que conduce a la lisis osmótica de la célula afectada. La SLO también induce la desgranulación y la lisis de leucocitos polimorfonucleares, inhibe la fagocitosis por los macrófagos y deteriora la respuesta de los linfocitos a los mitógenos; además puede estimular la producción de citocinas.⁴⁴⁷ La medición de los anticuerpos contra estreptolisina O (títulos antiestreptolisina O [ASO]) en suero es útil para el diagnóstico retrospectivo de infecciones estreptocócicas faríngeas recientes. La respuesta de ASO luego de las infecciones cutáneas es mala, debido tal vez a la inactivación del antígeno por el colesterol presente en la piel. En estos casos, los títulos anti-DNasaB son más confiables (véase la explicación más adelante).

La **estreptolisina S (SLS)** es estable al oxígeno, no antigénica y, al igual que SLO, es tóxica para distintos tipos celulares. Existe en la forma extracelular ligada a la superficie celular y en la forma intracelular, y suele estar asociada con algún tipo de molécula transportadora, como albúmina en suero, RNA o α -lipoproteína. SLS, una molécula pequeña que tiene un peso molecular de unos 1 800 daltons, es producida en cantidades máximas durante las fases logarítmica tardía y estacionaria temprana de crecimiento, y requiere hierro para una producción máxima.^{19,439} Se piensa que interactúa con los fosfolípidos de la membrana para ejercer sus efectos tóxicos. Los eritrocitos expuestos a SLS sufren edema, seguido de lisis debida a la interrupción de la barrera osmótica y la pérdida de iones desde la célula.¹⁹ Al contrario de SLO, no se observan hendiduras ni poros sobre las membranas de las células eritrocíticas afectadas mediante microscopia electrónica. SLS es activa tanto en la hemólisis de superficie como de subsuperficie cuando los microorganismos crecen en agar sangre de carnero. La actividad hemolítica de SLS es inhibida por las lipoproteínas en suero y otros fosfolípidos simples. Al igual que SLO, SLS puede dañar las membranas de las células PMN, las plaquetas y los orgánulos subcelulares internos.

Los estreptococos del grupo A también producen varios productos extracelulares; muchos de éstos desempeñan un papel real o teórico en su virulencia. Las **exotoxinas pirógenas estreptocócicas (SPE)** (sobre todo SPE A y SPE B) son responsables de la erupción de la escarlatina y también de los principales factores de virulencia en la patogenia del síndrome similar al shock tóxico estreptocócico. Se describieron tres SPE inmunológicamente distintas, designadas SPE tipos A, B y C, y se han identificado y caracterizado los genes que las codifican.^{417,418,468,729,1033} Los genes para las exotoxinas pirógenas estreptocócicas A y C (*speA* y *speC*) son codificados sobre un bacteriófago lisogénico estreptocócico, mientras que el gen para la exotoxina tipo B (*speB*) es cromosómico. El gen *speB* se encuentra en todos los estreptococos del grupo A, mientras que los otros dos genes pueden estar presentes o no. SPE B, el producto del gen *speB*, es en realidad una enzima **cisteína proteasa** capaz de escindir la inmunoglobulina humana, la fibronectina, la vitronectina y otras proteínas de las células huéspedes, lo que conduce a la formación de péptidos pequeños y biológicamente activos, que incluyen interleucina-1, histamina y cininas.^{480,1026} Las exotoxinas pirógenas como SPE A y SPE C no sólo inducen fiebre, como su nombre lo indica, sino que también funcionan como superantígenos. Los **superantígenos** son moléculas capaces de inducir proliferación de los linfoci-

tos T del huésped, independientemente de su especificidad antigénica, al unirse a las moléculas de clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (CMH).^{630,790} La activación de las células T por superantígenos conduce a la liberación masiva de distintas citocinas por los monocitos y los linfocitos humanos, que incluyen factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β y mediadores de las células T, como interleucina-2 e interferón- γ .^{447,448} Estas citocinas activan las cascadas del complemento, de la coagulación y fibrinolítica y producen pérdida desde los capilares con el resultado de hipotensión y shock, las manifestaciones más graves del síndrome del shock tóxico estreptocócico. Estos superantígenos también potencian la respuesta del huésped a pequeñas cantidades de endotoxina de gramnegativos por un factor mayor de 100 000 veces y tienen efectos tóxicos directos sobre las células endoteliales que revisitan los capilares. Las exotoxinas pirógenas estreptocócicas tienen pesos moleculares de 25 a 28 kDa y contienen sitios de unión a los receptores de las células T y de unión a las moléculas de clase II del CMH, más un sitio de unión al cinc que funciona mediando la unión de las moléculas de clase II a la exotoxina. Además de SPE A, B y C, se han identificado a partir de estudios de secuenciación de distintas cepas de estreptococos del grupo A otras exotoxinas pirógenas (p. ej., SSA [superantígeno estreptocócico], SPE D, SPE F MF [factor mitogénico], SMEZ-1, SMEZ-2, SpeG-SpeL) y sus loci genéticos (p. ej., *speG*, *speH*, *speJ*).^{693,730,789,802,909,982} La producción de estos superantígenos varía entre las cepas de estreptococos que pertenecen a diferentes tipos M o *emm*. Además de los estreptococos del grupo A, distintos genes de los superantígenos estreptocócicos (p. ej., *ssa*, *speM*, *smeZ*) se encuentran en algunos estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G (*S. dysgalactiae* subespecie *equisimilis* y *S. canis*).⁵⁰⁹

Los estreptococos β -hemolíticos del grupo A también producen otros distintos productos que contribuyen a la virulencia. Como se mencionó, SPE B es en realidad una **C5a peptidasa** que está unida a la superficie celular. Se piensa que esta molécula contribuye a la enfermedad debido en gran parte a su actividad de peptidasa más que como superantígeno funcionante. La C5a peptidasa escinde e inactiva C5a, el componente quimiotáctico del complemento, lo que conduce a la limitación del reclutamiento y la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares.⁷³⁶ Estos microorganismos también producen cuatro **desoxirribonucleasas** inmunológica y electroforéticamente diferentes, designadas DNasa A, B, C y D. Los anticuerpos contra la DNasa B (anti-DNasa B) son útiles, junto con los títulos de ASO, para la documentación serológica de infecciones faríngeas o cutáneas previas por estreptococos del grupo A. La **hialuronidasa** producida por estreptococos del grupo A despolimeriza la sustancia fundamental del tejido conectivo, lo que conduce a la propagación por contigüidad del microorganismo. Las **estreptocinasas** producidas por estos estreptococos hidrolizan los coágulos de fibrina y pueden funcionar en la virulencia al evitar la formación de las barreras de fibrina en la periferia de las lesiones estreptocócicas que se propagan. La contribución de estas enzimas y toxinas a la infección es incierta. Muchos de estos factores son producidos también por otros estreptococos β -hemolíticos. Las cepas de *Streptococcus* grupo A M-1 y algunos otros tipos M producen una proteína denominada **SIC** que inhibe al complemento al quedar incorporada en el complejo de ataque de membrana del complemento (C5b-C9), inhibiendo así la lisis de la célula diana.¹⁴ Se puede utilizar el polimorfismo en el gen *sic* para caracterizar las cepas M-1 que pueden estar ligadas desde el punto del vista epidemiológico.⁴⁸⁶

Importancia clínica

Los seres humanos constituyen el reservorio natural de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A, y el microorganismo es transmitido de una persona a otra por la vía respiratoria. La infección más frecuente causada por estos estreptococos es la **faringitis estreptocócica**. La mayoría de los casos de faringitis se observan en niños de edad escolar (5 a 15 años) durante el invierno o la primavera. Luego de un período de incubación inicial de 2 a 4 días, el inicio suele ser súbito, con fiebre, odinofagia, cefalea, malestar general y dolor abdominal. La porción posterior de la faringe suele estar inflamada y tumefacta, y se puede presentar un exudado blanco grisáceo sobre las amígdalas. Los ganglios linfáticos cervicales anteriores habitualmente son dolorosos a la palpación y están tumefactos. La presencia de rinorrea, disfonía, tos o diarrea habla en contra de una infección por estreptococos del grupo A; en cambio sugiere una etiología viral o por micoplasmas.^{98,99} La infección por cepas que elaboran las exotoxinas pirógenas A, B o C también puede producir una erupción escarlatiniforme (escarlatina clásica). Las complicaciones de la faringitis por estreptococos del grupo A pueden ser supuradas (absceso periamigdalino, absceso retrofaríngeo, adenitis cervical supurada, otitis media, sinusitis, mastoiditis, bacteriemia), no supuradas (fiebre reumática aguda y crónica, glomerulonefritis) o mediadas por toxinas (síndrome similar al shock tóxico estreptocócico).^{889,90} En ausencia de complicaciones, la faringitis estreptocócica es autolimitada. Sin embargo, casi siempre se la trata (en condiciones ideales, cultivo seguido de tratamiento antibiótico). Alrededor del 15% de los individuos con faringitis estreptocócica pueden convertirse en portadores asintomáticos de los microorganismos luego del tratamiento.¹⁰⁰ En la actualidad, las recomendaciones para el tratamiento de la faringitis estreptocócica son penicilina V por vía oral (niños, 250 mg dos o tres veces por día; adolescentes y adultos, 250 mg tres o cuatro veces por día; adolescentes y adultos, 500 mg dos veces por día) durante 10 días, o penicilina G benzatínica intramuscular (600 000 a 1.2 millones de unidades).⁹⁸ La eritromicina (dosificación dependiente de la fórmula utilizada) es una alternativa apropiada para los pacientes alérgicos a la penicilina. Aunque se ha comunicado una resistencia importante a los macrólidos entre los estreptococos del grupo A en varios países (p. ej., Australia, Finlandia, Canadá, Hawái, Japón, Italia, Finlandia, Grecia, Filipinas, Suecia), se ha demostrado que menos del 5% de las cepas son resistentes a la eritromicina.^{231,235,531,549,552,878,879,1035,1089} Los estreptococos β -hemolíticos del grupo A siguen siendo altamente sensibles a la penicilina G. En los pacientes que están infectados por estreptococos del grupo A resistentes a la eritromicina y que no pueden tolerar los agentes β -lactámicos, también se puede utilizar clindamicina.⁹⁸

Además de la faringitis, los estreptococos β -hemolíticos del grupo A causan distintas infecciones cutáneas superficiales, entre ellas impétigo, erisipela, celulitis, sepsis puerperal e infecciones posparto. El **impétigo** suele ocurrir en niños de 5 a 15 años y se caracteriza por la aparición de lesiones vesiculares que evolucionan a pústulas,¹³² las cuales se abren en los 5 a 7 días siguientes para formar costras gruesas. En general, las lesiones de impétigo están sobre los miembros inferiores y también pueden involucrar otros patógenos, como *Staphylococcus aureus*. Como mencionamos, la infección cutánea por cepas de estreptococos del grupo A nefritogénicas puede dar origen a una glomerulonefritis posestreptocócica (véase más adelante). La **erisipela** es una infección aguda asociada con la afectación de los tejidos blandos y los linfáticos cutáneos y conduce a evidencia sistémica de infección, que incluye fiebre.

Las lesiones se presentan como áreas de edema y eritema que se propagan con rapidez, tienen un margen elevado y bien demarcado, se localizan casi siempre sobre el rostro y los pacientes suelen tener faringitis estreptocócica asociada (véase lámina en color 13-1A).¹¹³ La **celulitis** es muchas veces el resultado de una infección estreptocócica de lesiones previas, como heridas, quemaduras o incisiones quirúrgicas. Esta infección se presenta como un proceso inflamatorio que se propaga y puede afectar grandes áreas de la piel y los tejidos subcutáneos, junto con fiebre, escalofríos, linfangitis y, en ocasiones, bacteriemia, y suele observarse en los consumidores de drogas intravenosas.³¹³ La **sepsis puerperal** se observa en las mujeres luego de un parto o un aborto. Los microorganismos que colonizan el aparato genital o que provienen del personal obstétrico invaden los genitales internos y causan endometritis, linfangitis, bacteriemia, fascitis necrosante y síndrome del shock tóxico estreptocócico.^{56,406} La infección genital puede complicarse con celulitis pelviana, peritonitis y formación de abscesos. También se observó la transmisión intraparto de estreptococos del grupo A, lo que conduce a una enfermedad grave y a menudo mortal en el neonato.⁷⁵³ La afectación perinatal produce mortinatos, septicemia, ictericia y celulitis.

En el tratamiento de la faringitis por estreptococos del grupo A es importante considerar las complicaciones "no supurativas" y bien estudiadas de las infecciones por estreptococos del grupo A, es decir, la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis.^{96,655,932} La **fiebre reumática aguda** se asocia con una faringitis previa por estreptococos del grupo A, mientras que la glomerulonefritis se relaciona con una infección faríngea o cutánea previa por el microorganismo. La fiebre reumática aguda es una colagenopatía multisistémica tardía caracterizada por las manifestaciones mayores de carditis, poliartritis, nódulos subcutáneos, eritema marginado y corea, que comienza 2 a 5 semanas después de la faringitis estreptocócica.⁹⁶ Las infecciones cutáneas por estreptococos del grupo A no desencadenan fiebre reumática aguda. En general, la patología cardíaca afecta el endocardio, el miocardio, el pericardio y, más a menudo, la válvula mitral; se manifiesta clínicamente como soplos cardíacos característicos, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva o, pocas veces, paro cardíaco intratable y muerte. En general, la artritis es migratoria, afecta múltiples articulaciones (sobre todo rodillas, codos, tobillos y muñecas) y se resuelve en forma espontánea. Aparecen nódulos subcutáneos firmes e indoloros al mismo tiempo que la carditis y suelen hallarse sobre las extremidades cerca de áreas óseas de los pies y las manos. Las lesiones del eritema marginado son erupciones eritematosas con bordes rojos, elevados y serpinginosos y áreas centrales de resolución que suelen aparecer sobre el tronco, los brazos y las piernas. La corea es una manifestación neurológica caracterizada por espasmos musculares, incoordinación y debilidad muscular que aparecen durante la fiebre reumática aguda o después de varios meses. En general, las manifestaciones agudas de la fiebre reumática duran 3 a 6 meses. El diagnóstico diferencial es amplio debido a las manifestaciones proteiformes del síndrome e incluye artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, drepanocitosis, rubéola, artritis séptica, infección gonocócica diseminada, enfermedad de Lyme, endocarditis bacteriana y miocarditis. Los hallazgos de laboratorio son eritrosedimentación elevada, proteína C reactiva elevada y detección de una infección estreptocócica previa, demostrada por un cultivo de fauces positivo o una prueba directa de antígenos positiva para estreptococos del grupo A o por los títulos elevados o crecientes de anticuerpos antiestreptocócicos (p. ej., ASO, anti-DNasaB, antihialuronidasa).²⁴⁸ Una única prueba de

anticuerpos antiestreptocócicos positiva no es diagnóstica de fiebre reumática aguda, de modo que se recomienda realizar las tres pruebas de anticuerpos específicos si hay alta sospecha de enfermedad. El tratamiento consiste en analgésicos, salicilatos y corticosteroides para la fiebre y la inflamación y las medidas correspondientes para evitar la insuficiencia cardíaca.⁹⁶

La **glomerulonefritis aguda** es una enfermedad inflamatoria del glomérulo renal que se asocia con lesiones glomerulares difusas, hipertensión, hematuria y proteinuria.⁹⁶ Las técnicas de inmunofluorescencia permiten comprobar que las lesiones glomerulares contienen depósitos de componentes del complemento (sobre todo C3), properdina e inmunoglobulinas.^{599,683} Si bien la aparición de la fiebre reumática puede darse 1 a 5 semanas después de la faringitis estreptocócica, la instalación de una glomerulonefritis puede ocurrir tan sólo 10 días después de la faringitis o después de 3 a 6 semanas de las infecciones cutáneas.³¹ Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por malestar general, debilidad, anorexia, cefalea, edema y congestión circulatoria, según lo demuestran la hipertensión y la encefalopatía. Los hallazgos de laboratorio son anemia, eritrosedimentación elevada, disminución de C3 y del complemento total, hematuria y proteinuria. El análisis de orina muestra eritrocitos, leucocitos y cilindros. En general, se puede demostrar el antecedente de una infección por estreptococos del grupo A por el aislamiento de los microorganismos de las fauces o las lesiones de la piel o por la elevación de los anticuerpos antiestreptocócicos. Las respuestas de ASO luego de las infecciones cutáneas estreptocócicas no están fiablemente elevadas, y se deben realizar títulos para anticuerpos anti-DNasaB y anti-hialuronidasa.⁹⁶

Se han propuesto varias teorías vinculadas con el mecanismo por el cual los estreptococos del grupo A inducen fiebre reumática aguda y glomerulonefritis.^{44,491} La más sostenible es la de que los estreptococos inducen la formación de anticuerpos antiestreptocócicos contra los antígenos capsular (ácido hialurónico), de la pared celular (antihidratos de carbono de grupo, anti-M y otras proteínas asociadas) y de la membrana celular que dan reacciones cruzadas con distintas porciones antigénicas en el tejido cardíaco miocárdico, endocárdico y valvular, el sarcolema miocárdico, el músculo esquelético y las articulaciones. Estos estreptococos varían en sus capacidades de desencadenar fiebre reumática aguda o glomerulonefritis aguda, y se han identificado ahora ciertos tipos estreptocócicos M como "reumatógenos" o "nefritógenos". Las cepas de estreptococos β -hemolíticos del grupo A responsables de la fiebre reumática aguda suelen ser ricas en proteína M, muestran una morfología mucosa de las colonias debido a una encapsulación importante, suelen ser OF negativas y se asocian fundamentalmente con infecciones faríngeas. Estas cepas también evocan una fuerte respuesta inmunitaria específica de tipo. Se ha mostrado que los tipos M de estreptococos del grupo A, que abarcan los tipos M1, M3, M5, M16, M18, M19, M24 y algunos otros son "reumatógenos".^{931,932} Se ha demostrado que los epitopos antigénicos de algunos de estos tipos M comparten determinantes de antigenicidad con el músculo cardíaco, las proteínas de la membrana del sarcolema y las membranas sinoviales.^{46,249,250,267} Otros investigadores han demostrado reacciones inmunitarias similares entre el antígeno polisacárido de los estreptococos del grupo A y ciertas glucoproteínas de las válvulas cardíacas, entre el ácido hialurónico de los estreptococos (el material capsular) y el ácido hialurónico humano, y entre las membranas de las células estreptocócicas y los núcleos neuronales caudado y subalámico en el sistema nervioso central humano.^{360,409,503,870} Lo último puede explicar el papel de la

infección estreptocócica precedente en el compromiso neurológico de la fiebre reumática aguda. Asimismo, se han identificado cepas "nefritógenas" de estreptococos del grupo A que pertenecen a ciertos tipos M. Los tipos M M2, M49, M55, M57, M59, M60 y M61 se han asociado con glomerulonefritis luego de infecciones cutáneas, mientras que los tipos M1, M4, M12 y M25 están implicados más a menudo luego de infecciones faríngeas. Aunque se han demostrado reacciones cruzadas entre cepas estreptocócicas nefritógenas y tejidos renales, en realidad las anomalías anatomopatológicas pueden deberse al depósito de inmunocomplejos preformados que contienen antígenos estreptocócicos y anticuerpos del huésped en los tejidos glomerulares o a la unión renal de productos estreptocócicos seguida del depósito de anticuerpos para crear inmunocomplejos.^{101,416,491,972,996}

Desde finales de la Segunda Guerra Mundial, la incidencia de faringitis estreptocócica en los Estados Unidos y Europa Occidental se ha mantenido bastante estable, mientras que la de fiebre reumática aguda y glomerulonefritis aguda posestreptocócica ha disminuido en forma espectacular.⁷⁹⁴ Sin embargo, a mediados de la década de 1980 se comunicaron "brotes" de fiebre reumática en Salt Lake City, Colorado, California, Pensilvania, Carolina del Norte, Tennessee, Missouri, West Virginia, Texas, Ohio y Nueva York.^{141,164,165,438,616,666,1004,1023,1044,1045} En estos brotes, muchos individuos no recordaban haber tenido una infección estreptocócica. En tales casos y para el diagnóstico de secuelas no supuradas, se deben realizar estudios serológicos (anticuerpos séricos contra la estreptolisina O, anticuerpos séricos contra la DNasa B, anticuerpos séricos antihialuronidasa) para la documentación retrospectiva de las infecciones previas por estreptococos del grupo A. Entre las cepas aisladas en los pacientes que tenían cultivos faríngeos positivos durante estos distintos brotes, se observó que muchas eran cepas mucoides pertenecientes a los tipos M 1, 3, 5, 6 y 18; estas cepas habían sido aisladas con escasa frecuencia desde antes de 1985.

Poco después de la publicación de estos informes de fiebre reumática resurgente causada por los serotipos M reumatógenos reconocidos, se comunicaron varias infecciones invasoras graves por estreptococos del grupo A asociadas con un síndrome similar al shock tóxico en centros médicos de Europa y los Estados Unidos.^{62,136,176,183,230,369} En una de las comunicaciones iniciales, Stevens y cols. informaron sobre 20 pacientes de la región de las Montañas Rocosas que presentaron distintos tipos de infecciones de tejidos blandos por estos estreptococos (faringitis, celulitis, tromboflebitis supurada, peritonitis, fascitis necrosante, miometritis posparto, infección localizada de heridas) y que siguieron desarrollando otros síntomas similares a los hallados en pacientes con síndrome del shock tóxico estafilocócico clásico.^{924,928} Estas características clínicas incluían hipotensión, disfunción renal, hipoalbuminuria, trombocitopenia, hipocalcemia e insuficiencia respiratoria. Todos los pacientes tenían cultivos positivos para estreptococos del grupo A, incluidos 12 enfermos con hemocultivos positivos. De los 20 pacientes, 19 desarrollaron shock y 6 murieron como resultado de las infecciones. Es interesante señalar que 8 de las 10 cepas de estreptococos del grupo A que estuvieron disponibles para el estudio ulterior produjeron exotoxina pirógena estreptocócica A (SPE A), la toxina asociada con la escarlatina. Esto fue particularmente interesante porque se habían aislado pocas veces en los Estados Unidos desde 1976 cepas que produjeran SPE A. La vigilancia activa con base en el laboratorio y poblacional desde julio de 1995 a diciembre de 1999 en cinco estados de los Estados Unidos permitió detectar que los tipos M 1,

3, 11, 12 y 28 representaban el 49,2% de las cepas en infecciones invasoras y los tipos *emm* recientemente caracterizados representaban el 8,9% de las cepas.⁷³⁴

En la actualidad el síndrome similar al shock tóxico por estreptococos del grupo A es una entidad clínica bien reconocida.⁹²⁷ En los Estados Unidos, los CDC han estimado que la tasa de ataque es de aproximadamente 1 caso por 100 000 habitantes, aunque pueden observarse tasas regionales altas y entre los muy pequeños o los muy ancianos.^{924,925} Los pacientes que sufren infecciones invasoras por estreptococos del grupo A suelen tener enfermedades comórbidas, como diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca congestiva, neoplasias e inmunosupresión.⁷⁶ Alrededor del 20% de los pacientes con síndrome similar al shock tóxico presentan pródromos de tipo viral con fiebre, escalofríos y mialgias. Se pueden apreciar signos de infección de los tejidos blandos, como tumefacción, molestias a la palpación, eritema o dolor si la infección primaria es cutánea. En los pacientes con fascitis necrosante o miositis se presenta un síndrome tóxico y pueden aparecer rápidamente lesiones ampollares violáceas. Los pacientes pueden sufrir una amplia variedad de manifestaciones clínicas como miocarditis, hepatitis, peritonitis, miocarditis, artritis séptica, endoftalmitis, sepsis puerperal, meningitis y toxemia fulminante.⁵³⁸ El compromiso pulmonar asociado con la infección produce cianosis, taquipnea e insuficiencia respiratoria. La afectación renal ocurre al comienzo del curso clínico en más del 80% de los pacientes, como lo muestran las altas concentraciones de creatinina y la hemoglobiuria en suero. El deterioro renal suele persistir a pesar del tratamiento intensivo con antibióticos y líquidos intravenosos, y puede requerirse diálisis. Los pacientes pueden presentar rápidamente hipotensión y en la mayoría no responden a la administración de albúmina y líquidos con electrolitos. Aparece un síndrome de dificultad respiratoria aguda en más del 50% de los enfermos, que requiere intubación y ventilación mecánica. En las infecciones fulminantes y finalmente mortales, se puede observar el síndrome de Waterhouse-Friderichsen y coagulación intravascular diseminada.^{371,550} Se presenta bacteriemia por estreptococos del grupo A en alrededor del 70% de los pacientes. Si se observa infección de los tejidos blandos, pueden ser necesarios procedimientos quirúrgicos para eliminar los tejidos infectados, desvitalizados y necróticos. Este síndrome produce característicamente shock y falla multiorgánica poco después del inicio de los síntomas y su tasa de mortalidad puede alcanzar entre el 30% y hasta más del 80% de los casos.⁶⁵ El tratamiento requiere antibioterapia, administración de líquidos y medidas intensivas de sostén. La clindamicina tiene mayor eficacia que la penicilina y se la utiliza a menudo para el tratamiento junto con aquella.⁵³ Se ha demostrado que la clindamicina inhibe la expresión de proteínas M y la síntesis y exportación de toxinas (incluidas las exotoxinas pirógenas SPE A y SPE B), enzimas (p. ej., DNasa, SLO y SLS) y material capsular.^{131,665,916} Ciertas pruebas indican que la infusión de inmunoglobulina intravenosa también puede ser beneficiosa.⁷³¹

Se ha demostrado que las exotoxinas pirógenas estreptocócicas (SPE) desempeñan un papel importante en la patogenia del síndrome similar al shock tóxico. Hauser y cols. examinaron 34 cepas de estreptococos del grupo A del síndrome similar al shock tóxico y observaron que el 54% eran tipo M1 o M3. Si bien el 53% produjo SPE A, el 85% contenía el gen *sepA* que codifica SPE A.⁴⁶⁹ Todas las cepas contenían el gen que codifica SPE B (*speB*) y el 21% contenía el gen que codifica SPE C (*speC*). Estos investigadores llegaron a la conclusión de que SPE A se asociaba firmemente con estreptococos del grupo A

capaces de provocar síndrome similar al shock tóxico, aunque propusieron que otros factores también pueden estar involucrados, dado que no todas las cepas aisladas en los pacientes con ese síndrome contenían el gen *speA*. Musser y cols. examinaron los tipos M y la presencia de genes que codifican SPE A (genotipo *speA*) y SPE C (genotipo *speC*) en un conjunto de cepas de estreptococos del grupo A de casos de faringitis ocurridos en nueve estados.⁷¹⁴ Más del 50% de las cepas que expresaban el serotipo M1 o M3 hibridaron específicamente con una sonda para *speA*, lo que indicó que aquellos con capacidad de producir enfermedad estreptocócica grave estaban bien representados entre las que causaban faringitis extrahospitalaria. Otros autores no hallaron que SPE A ni otras exotoxinas pirógenas sean similares a las exotoxinas estafilocócicas ni superantígenos capaces de inducir la liberación de distintas citocinas y linfocinas.^{97,353,448} Por su parte, estas moléculas median los efectos sistémicos profundos que promueven la invasión sistémica rápida por los microorganismos y precipitan la afectación sistémica multiorgánica que caracteriza al síndrome.^{630,790} Como ya se mencionó, se recomienda el tratamiento con clindamicina y penicilina, dado que la clindamicina es mucho más potente para inhibir la síntesis de exotoxinas pirógenas (en especial SPE A y SPE B) que la penicilina.⁶⁶⁵

En forma simultánea con el reconocimiento del síndrome similar al shock tóxico, se observaron aumentos en la incidencia de otras infecciones por estreptococos del grupo A, sobre todo bacteriemias, fascitis necrosante y miositis, tanto en poblaciones adultas como pediátricas de los Estados Unidos y otros países.^{247,926} Al principio, estas infecciones estreptocócicas graves se comunicaron entre los adictos a drogas intravenosas en Filadelfia, los adultos en las áreas de Denver y Los Ángeles y los niños en Winston-Salem, Carolina del Norte y Denver, Colorado.^{166,619,1045} También se informaron casos agrupados en familiares y brotes focalizados en hospitales y asilos.⁸⁷² Además de la bacteriemia, muchos pacientes sufrieron fascitis necrosante estreptocócica. Ésta es una infección de los tejidos subcutáneos profundos que conduce a la desvitalización y la destrucción progresivas de las aponeurosis.⁸⁷⁴ La infección se inicia con eritema en el sitio de un traumatismo aparente o trivial, aunque también ocurre la siembra hematógena de músculo y tejido blando subcutáneos. En los niños, suele asociarse con una infección estreptocócica de lesiones de varicela en individuos antes sanos.⁵¹⁷ La infección se desarrolla y se propaga con rapidez de modo que en las siguientes 24 a 72 horas los tejidos cambian de color desde un tinte rojo eritematoso hasta un azul profundo o violáceo, con la formación de lesiones ampollares que contienen líquido serosanguinolento. En este punto, los tejidos se vuelven gangrenosos y el tejido desvitalizado se esfacela para poner en evidencia la necrosis extensa del tejido subcutáneo.³⁷¹ La infección se propaga con rapidez a lo largo de los planos aponeuróticos para afectar los tejidos blandos y los músculos, y conduce a miositis y mionecrosis.^{721,936,1031} Algunos estudios de resonancia magnética son útiles para identificar la extensión de la fascitis y el edema de los tejidos blandos que infiltran los planos aponeuróticos antes de que se manifieste la necrosis. El paciente se torna cada vez más obnubilado y estuporoso debido a un cuadro tóxico fulminante, e incluso con una cobertura antibiótica apropiada y el desbridamiento quirúrgico extenso de los tejidos desvitalizados, la mortalidad puede ser del 30% al 60%; algunas muertes ocurren ya a las 48 horas del inicio de los signos y los síntomas. La afectación muscular extensa predice un pronóstico incluso más ominoso, con tasas de letalidad de entre el 80% y el 100%. Debido a la gravedad de las infecciones y a la alta

mortalidad asociada con ellas, se requieren intervenciones médicas y quirúrgicas intensivas que pueden salvar la vida de muchos pacientes.^{371,1076} Con el reconocimiento de la gravedad de estas infecciones estreptocócicas y la aparición del síndrome similar al shock tóxico, *Streptococcus* del grupo A se ha vuelto a establecer como un microorganismo que debe tenerse en cuenta en el siglo XXI.

Los estreptococos β -hemolíticos del grupo A también pueden causar otras infecciones, como neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, peritonitis e infecciones hospitalarias. En general, la neumonía debida a estos estreptococos ocurre en huéspedes debilitados por otros trastornos, entre ellos gripe u otras infecciones intercurrentes por virus respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alcoholismo y enfermedad neoplásica.⁵⁷ La neumonía también puede formar parte de la presentación clínica de las enfermedades invasoras por estreptococos del grupo A, como el síndrome del shock tóxico estreptocócico. La neumonía estreptocócica a menudo tiene un inicio brusco con fiebre, escalofríos, malestar general, disnea y dolor torácico. Las radiografías de tórax suelen mostrar infiltrados basales con derrame pleural. En general, el diagnóstico se hace mediante cultivos de esputo, líquido pleural, líquido de empiema o sangre.^{702,826} El esputo suele ser purulento y tener estrías sanguinolentas. Las complicaciones de las infecciones pulmonares son sepsis, derrame pleural, empiema, neumotórax, pericarditis, mediastinitis, shock, abscesos pulmonares y metastásicos, bronquiectasias y osteomielitis.^{57,718} La osteomielitis se observa a menudo como una complicación de infecciones por varicela en los niños; en los adultos, suele ocurrir como complicación de la bacteriemia.¹³ La meningitis debida a estreptococos del grupo A ocurre en alrededor del 2% de todos los pacientes con infección sistémica por estos estreptococos y representa del 0,2% al 1% de todos los casos de meningitis.¹⁸⁷ Esta infección es similar en su presentación a otras meningitis bacterianas agudas, con cefalea, fiebre, rigidez de la nuca y déficits neurológicos focales.^{538,709} Los pacientes pueden tener un foco de infección que conduce a bacteriemia, con la invasión ulterior de las meninges.⁹¹² En una revisión de 41 pacientes adultos con esta infección, el 60% tenía antecedentes de otitis media, sinusitis, neumonía, traumatismo de cráneo reciente, neurocirugía reciente o presencia de un dispositivo neuroquirúrgico.⁹⁹⁴ La endocarditis por estreptococos del grupo A es una infección rara que ocurre en lactantes, niños y adultos. La endocarditis pediátrica puede asociarse con bacteriemia e infección por varicela.^{691,1065} En general, en los adultos ocurre en pacientes sin antecedentes de anomalías cardíacas y se asocia con tasa alta de complicaciones, como embolias cerebrales u otras embolias sistémicas, artritis, discitis y osteomielitis.⁴⁵ También se han comunicado infecciones intrahospitalarias por estreptococos del grupo A, habitualmente en asociación con la presencia de catéteres y otros dispositivos médicos permanentes.⁶⁶⁰ Estos estreptococos se han unido a la lista creciente de otros microorganismos implicados en la peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua.¹⁶³

Estreptococos β -hemolíticos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*)

Factores de virulencia

Streptococcus β -hemolítico del grupo B (*S. agalactiae*) tiene un antígeno del grupo de Lancefield, un polisacárido de la superficie celular específico de tipo y antígenos proteicos. El antígeno del grupo B está compuesto por un polímero de ram-

nosa-glucosamina fijado a la capa de peptidoglucano. La especificidad de tipo es proporcionada tanto por el polisacárido capsular como por los antígenos proteicos. Los estreptococos del grupo B son siempre encapsulados y pertenecen a uno de nueve serotipos capsulares reconocidos, los cuales están compuestos por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico); la especificidad de serotipo está determinada por las distintas disposiciones de estos cuatro componentes en cada uno de los nueve tipos capsulares. Los **antígenos polisacáridos capsulares** se designan Ia, Ib, II, III, IV, V, VII y VIII.^{533,582,1018,1019,1039} El **antígeno proteico** es designado sólo con la letra c, que existe en dos formas: $c\alpha$ y $c\beta$. Este antígeno c se encuentra en todas las cepas Ib (las cepas tipo Ia carecen de la proteína c), en el 60% de las cepas tipo II y pocas veces se encuentra en las cepas tipo III (no se han examinado suficientes cepas serotipos IV-VIII para detectar su presencia). Por lo tanto, las designaciones de los serotipos para las cepas que contienen antígeno c se expresan como Ib/c y II/c. La importancia de estos componentes capsulares como factores de virulencia está demostrada tanto por datos in vitro como in vivo. Los anticuerpos opsonizantes contra estreptococos del grupo B son específicos de serotipo, como lo demuestran los estudios que utilizan leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, y la falta de anticuerpos maternos contra estos antígenos es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de la enfermedad por estreptococos del grupo B en el recién nacido.³⁵⁸

Aunque las técnicas serológicas son los métodos de referencia para los determinantes de serotipos, también se han creado métodos con base molecular tanto para la serotipificación como para la subserotipificación de las cepas. Kong y cols. crearon cebadores y ensayos de secuenciación con base en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes *cps* capsulares de todos los serotipos que se correlacionaban en un 100% con los métodos serológicos.⁵⁸³ Se logró una mayor subserotipificación mediante la amplificación y la secuenciación de los genes para las proteínas de superficie $c\alpha$ (gen *bca*), similar a $c\alpha$ (genes *alp2*, *alp3* y *alp4*), Rib (gen *rib*) y $c\beta$ (gen *bac*).^{583,584} Bohnsack y cols. utilizaron patrones de digestión de restricción de DNA del gen de la hialuronato liasa de los estreptococos del grupo B (*hylB*) para subdividir las cepas de serotipo III, una de las cuales (III-3) se correlacionó con clones que tienen mayor virulencia.¹¹¹ También se describieron métodos moleculares de serotipificación para uso en laboratorios clínicos. Borchardt y cols. designaron cebadores para amplificar las secuencias de los genes capsulares y luego aplicaron sondas específicas de tipo *cps* en un formato de transferencia en puntos (*dot blot*) para determinar el serotipo.¹¹⁴ Utilizando este procedimiento, el 99% de 306 aislamientos fueron asignados a un serotipo, en comparación con el 89% que eran tipificables mediante el método de referencia de las precipitinas capilares. También se han utilizado otros métodos moleculares para caracterizar mejor las cepas de estreptococos del grupo B.¹⁰⁹³

La prevalencia de los distintos serotipos capsulares del grupo B varía en el tiempo y puede diferir de un lugar a otro. Antes de la década de 1990, la mayoría de las enfermedades por estreptococos del grupo B eran causadas por los serotipos Ia, Ib, II, III y V; los serotipos IV y VI a VII eran relativamente infrecuentes. Durante la primera mitad de la década de 1990, comenzaron a aparecer las cepas de serotipo V y el porcentaje de aislamientos de este grupo aumentó del 2,6% en 1992 al 20% en 1994.^{324,436} Los estudios llevados a cabo en los Estados Unidos y en otros países indican que los serotipos Ia, Ib, II, III y V predominan ahora entre los aislamientos vaginales y los aislamientos clínicos en los pacientes.^{82,106,628} Han aparecido

hace poco serotipos VI y VIII como serotipos predominantes en Japón.⁵⁹¹ En un estudio de 73 aislamientos vaginales en mujeres embarazadas que asistieron a un centro clínico obstétrico urbano en Kawasaki, Japón, el 35,6% era serotipo VIII y el 24,7% era serotipo VI. También se ha comunicado en Japón enfermedad neonatal de inicio temprano debida al serotipo VIII.⁶⁶⁹ Las cepas de tipo III de estreptococos del grupo B representan el 60% de los aislamientos en sepsis neonatal y más del 80% de los aislamientos en lactantes con meningitis, lo que indica la mayor virulencia de este serotipo.^{286,628} El polisacárido capsular de tipo III está formado por un esqueleto estructural repetitivo que consiste en galactosa, glucosa y *N*-acetil-glucosamina con cadenas laterales compuestas por galactosa y una porción de ácido *N*-acetilneuramínico terminal. El componente estructural de la cápsula de tipo III que parece estar asociado con la mayor virulencia es el ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico). La presencia de esta molécula sobre la superficie del microorganismo inhibe la activación de la cascada alternativa del complemento y evita la fagocitosis. La eliminación de residuos de ácido siálico con neuraminidasa conduce a activación del complemento, fagocitosis y destrucción intracelular de los microorganismos y menor virulencia en pruebas de exposición intravenosa en modelos murinos.^{311,312,1040} Se han obtenido resultados similares con mutantes de estreptococos del grupo B serotipo II isogénicos con una deficiencia capsular que carecen de los residuos de ácido siálico terminal. Cuando se los compara con las cepas madre, los mutantes son opsonizados y destruidos en presencia de complemento y células PMN.^{827,1042} Estos mutantes también se unen al factor del complemento C3b activo en forma más eficaz que en el tipo silvestre. En este último tipo, los residuos de ácido siálico bloquean la unión de C3 y promueven la inactivación de C3b.⁶⁵⁶ Estos mutantes capsulares de tipo III también fueron menos virulentos en modelos experimentales en ratas recién nacidas con bacteriemia y neumonía por estreptococos del grupo B que las cepas madre de tipo III isogénicas.^{661,1042} Mediante el análisis molecular de subtipos virulentos de cepas serotipo III (serotipo III-3) se identificaron regiones de DNA genómico que codificaban una proteína de superficie (Spb 1) que media la internalización y la invasión de células epiteliales por los microorganismos serotipo III.³

Los estreptococos del grupo B también producen otros distintos determinantes potenciales de virulencia. Al igual que los del grupo A, los del grupo B producen **C5a peptidasa**. C5a es un producto de la escisión de los componentes del complemento producido por las células epiteliales alveolares, atrae a las células inflamatorias y participa en el proceso de inflamación pulmonar.⁹³³ La C5a peptidasa producida por los estreptococos escinde C5a en el término C, interfiriendo así en la quimiotaxis de los neutrófilos mediada por C5a.¹¹⁰ La nueva información indica que esta peptidasa también se une a la fibronectina y sirve como adhesina e invasina bacterianas.^{69,182} Esta enzima existe en una forma asociada con las células y también requiere la presencia de la cápsula del grupo B para lograr una actividad máxima. La opsonización de los estreptococos del grupo B pertenecientes a los serotipos Ia, Ib, II, III y V con anticuerpos anti-peptidasa C5a conduce a una mayor destrucción tanto por parte de los macrófagos como de los leucocitos polimorfonucleares.¹⁸⁰ La inmunización de ratones con C5a peptidasa estreptocócica purificada produce una respuesta de anticuerpos que los protege de la infección por microorganismos del grupo B independiente del serotipo, lo que sugiere que la C5a peptidasa podría ser un antígeno con firmes posibilidades de utilizarse para vacunas.¹⁸¹ La C5a peptidasa también

es producida por estreptococos β -hemolíticos de los grupos A y G, y los genes que codifican la C5a peptidasa en las cepas grupo B (*scpB*) y grupo A (*scpA*) demuestran un 98% de homología de secuencia entre ellos. La **β -hemolisina/citolisina** de los estreptococos del grupo B puede actuar como factor de virulencia, sobre todo en las infecciones pulmonares.^{397,723} Esta β -hemolisina formadora de poros puede lisar las células epiteliales y endoteliales de los alvéolos humanos in vitro, lo que sugiere un papel para la hemolisina como factor de virulencia en las infecciones pulmonares neonatales.⁷²⁴ También puede aumentar la capacidad de los microorganismos para invadir las células endoteliales en el sistema nervioso central (SNC).⁷²⁵ Algunos estudios in vivo e in vitro indican que contribuye a la bacteriemia y la invasión bacteriana del hígado y activa las vías apoptóticas en los hepatocitos, lo que conduce a necrosis hepática.⁸¹⁴ El **ácido lipoteicoico** también se encuentra en los estreptococos del grupo B y puede participar facilitando la adherencia como primer paso de la infección.⁷²⁰ El ácido lipoteicoico purificado de los estreptococos del grupo B es citotóxico para las células encefálicas embrionarias y amnióticas humanas que crecen en cultivo tisular.⁴⁰⁷ Varias **proteínas de la superficie celular** (p. ej., antígenos c, R, BPS y Rib) se encuentran en distintas combinaciones en los diferentes serotipos de estos estreptococos.³²⁸ En particular, el **antígeno c**, puede actuar mediando la internalización de microorganismos dentro de las células epiteliales cervicales humanas luego de su fijación y los protege de la destrucción intracelular después de la fagocitosis.^{112,763} Estas moléculas son antigénicas y los anticuerpos dirigidos contra ellas son protectores contra la carga microbiana en modelos animales. Hace poco, Jones y cols. identificaron una **proteína de unión a penicilina de la superficie celular** (PBP1 a) que permitía a las células estreptocócicas resistir la destrucción intracelular de las células fagocíticas.⁵⁴⁴ Los estreptococos del grupo B producen además una **ácido hialurónico liasa**, que puede actuar tanto para propagar la infección por la degradación del ácido hialurónico en la matriz extracelular como sobre el ácido hialurónico presente en altas concentraciones en tejidos placentarios y fetales, y en el líquido amniótico.⁷⁸⁸ Se ha identificado la presencia del factor CAMP, enzimas proteasas y distintas nucleasas en algunos estreptococos del grupo B, pero el papel de estas moléculas en la patogenia de las enfermedades es incierto.

Importancia clínica

Los estreptococos β -hemolíticos del grupo B constituyen una causa importante de enfermedad en los períodos neonatal y perinatal. Las mujeres son colonizadas por el microorganismo en la vagina y el recto, y se observa colonización vaginal en el 10-35% de las embarazadas; hasta el 60% de las mujeres colonizadas portan el microorganismo en forma intermitente.^{458,805} En realidad, la colonización de la vagina puede reflejar la contaminación del recto y el tubo digestivo es el principal reservorio de los microorganismos. La colonización vaginal suele ser asintomática, aunque algunos informes documentan vaginitis asociada con una colonización importante y la resolución de los síntomas vaginales con el tratamiento.^{493,494} Esta colonización genera una respuesta inmunitaria específica de serotipo, con incrementos acumulativos de anticuerpos con el aumento de la edad; las concentraciones más bajas de anticuerpos en niñas adolescentes pueden traducirse en un mayor riesgo de enfermedad por estreptococos del grupo B en los hijos de estas mujeres más jóvenes.¹⁴⁹ La transmisión sexual es controversial. Algunos estudios han documentado tasas más

altas de colonización entre los que asisten a centros de atención de enfermedades de transmisión sexual y en pacientes con gonorrea.⁸²⁴ También se han observado tasas más altas de colonización en mujeres que tienen mayor actividad sexual y mayor cantidad de parejas sexuales.⁵¹⁵ Sin embargo, otros estudios no han comprobado ninguna correlación entre la colonización por estreptococos del grupo B, la experiencia sexual o la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual.⁴⁹⁴ También se han aislado estreptococos del grupo B en cultivos de fauces y en los genitales masculinos.

Su presencia en el aparato genital femenino en el momento del nacimiento puede conducir a la infección del recién nacido. Uno de cada dos lactantes hijos de mujeres colonizadas es colonizado en la piel o las superficies mucosas por la transmisión vertical desde la madre, ya sea in utero o durante el parto. Además, el recién nacido puede ser colonizado por la exposición hospitalaria al microorganismo después del parto. Entre los lactantes colonizados, la enfermedad puede ocurrir en 1 a 4 niños por 1 000 nacidos vivos.^{311,915} La enfermedad neonatal por estreptococos del grupo B sigue dos patrones, denominada enfermedad de inicio temprano y enfermedad de inicio tardío.

La **enfermedad de inicio temprano** ocurre con una incidencia de 0,7 en 1 000 a 3,7 en 1 000 nacidos vivos y se asocia con la adquisición in utero o perinatal del microorganismo.³¹¹ Es probable que esta incidencia sea una subestimación; un estudio de la enfermedad de inicio temprano llevado a cabo en el Reino Unido comunicó una incidencia de 3 a 6 infecciones por cada 1 000 nacidos vivos sobre la base de la cantidad de neonatos que requirieron la detección de una posible sepsis durante las primeras 72 horas de vida.⁶³⁹ El microorganismo se adquiere por una infección ascendente in utero antes del parto, a través de la rotura de membranas o durante el pasaje a través del canal de parto colonizado por los estreptococos. Aunque una proporción sustancial de estos lactantes (aproximadamente el 50%) estarán colonizados, sólo el 1-2% de ellos se infecta.^{311,359} El inicio de la enfermedad ocurre durante los 5 primeros días de vida; en más del 50% de los casos, los lactantes se enferman dentro de las primeras 12 a 20 horas después del nacimiento.³⁷⁴ El espectro de la enfermedad incluye bacteriemia, neumonía, meningitis, shock séptico y neutropenia. Aunque más del 50% de los casos ocurren en lactantes de término, los lactantes prematuros se asociaron con tasas de ataque más altas y mayor morbilidad.³⁵⁹ La mortalidad debida a enfermedad de inicio temprano en los lactantes de término varía del 2% al 8%; se observan tasas de mortalidad más altas en los lactantes prematuros y son inversamente proporcionales al peso de nacimiento.^{866,1081} Los factores maternos que aumentan el riesgo de infección de inicio temprano del recién nacido son trabajo de parto prematuro, rotura prolongada de membranas, bacteriemia posparto, amnionitis materna, colonización vaginal importante y bacteriuria por estreptococos del grupo B.^{24,286,331,374} Durante la década de 1970, alrededor del 50% de los lactantes en los que se desarrolló una enfermedad de inicio temprano murieron por la infección, y muchos pacientes que sobrevivieron a la meningitis por estreptococos del grupo B quedaron con secuelas neurológicas permanentes.

La **enfermedad de inicio tardío** ocurre con una incidencia de 0,5 en 1 000 a 1,8 en 1 000 nacidos vivos³¹¹ y se vuelve clínicamente evidente 7 días a 3 meses (promedio, 3 a 4 semanas) después del nacimiento. Aunque alrededor del 50% de las infecciones de inicio tardío se adquieren a partir del canal de parto de las madres colonizadas, los casos restantes son el resultado de la adquisición posnatal del microorganismo desde

la madre u otros cuidadores o dentro del hospital.⁷⁵⁵ La bacteriemia por meningitis asociada es la presentación clínica predominante.⁵⁷⁴ La mortalidad asociada con la enfermedad de inicio tardío es del 10-15%. Hasta el 50% de los niños con meningitis de inicio tardío tienen complicaciones y secuelas neurológicas permanentes.¹⁰²² La distribución de los serotipos de estreptococos del grupo B también varía según que la enfermedad sea de inicio temprano o tardío.³¹¹ Entre los recién nacidos con enfermedad de inicio temprano y sin meningitis, la distribución de los serotipos se divide por igual entre los serotipos Ic, II y III. Entre los que tienen una infección similar por meningitis, predominan las cepas del serotipo III. En la enfermedad de inicio tardío, en la cual la meningitis es la presentación clínica frecuente, las cepas del serotipo III representan más del 90% de los aislamientos. Por otra parte, la meningitis por estreptococos del grupo B en los adultos se asocia principalmente con microorganismos serotipo II.

Hacia mediados de la década de 1980, el mayor conocimiento de las infecciones por estreptococos del grupo B y el reconocimiento de los síntomas en los pacientes en riesgo llevaron a adelantos en la asistencia neonatal que condujeron a una reducción de la tasa de mortalidad hasta alrededor del 15%. Como es más probable que los lactantes hijos de madres muy colonizadas tengan enfermedad de inicio temprano y dado que los que adquieren un inóculo bacteriano grande durante el parto tienen una probabilidad significativamente mayor de sufrir tanto la enfermedad de inicio temprano como la de inicio tardío, la identificación de las madres colonizadas se convirtió en el centro de atención de las estrategias de prevención. Los investigadores examinaron las posibles intervenciones para evitar la enfermedad por estreptococos del grupo B, y varios ensayos clínicos demostraron que la administración intraparto de antibióticos interrumpía la transmisión del microorganismo de la madre al hijo y reducía la incidencia de infecciones de inicio temprano.^{128,387,624,697,976} Este enfoque quimioproláctico previno alrededor del 70-75% de la enfermedad de inicio temprano, pero no tuvo ningún efecto sobre la de inicio tardío. En ese momento, varios fabricantes de productos microbiológicos comenzaron a desarrollar métodos de detección directa para estreptococos del grupo B en muestras de hisopados vaginales similares a los utilizados para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados de fauces. Estas pruebas utilizaban anticuerpos antiestreptococos grupo B para detectar microorganismos directamente mediante los formatos de aglutinación del látex o inmunoanálisis visual o colorimétrico rápido. En teoría, estas pruebas rápidas podían realizarse en el período preparto inmediato para determinar el estado de la colonización, y se podía administrar una quimioprolaxis antibiótica antes del parto y durante su transcurso si los ensayos preparto eran positivos. Las pruebas comerciales rápidas para la detección directa de estreptococos del grupo B en las muestras de hisopados vaginales variaban significativamente en sensibilidad (11-88%) cuando se comparaban con técnicas de cultivo en caldo durante toda la noche y, en general, identificaban sólo a las mujeres que tenían una colonización importante.^{47,297,625,913,1084} La validez de la premisa de que el riesgo de infección neonatal es mayor para los lactantes nacidos de mujeres muy colonizadas fue puesta en duda por algunos informes clínicos. En una evaluación de un sistema de inmunoanálisis enzimático (EIA) rápido para la detección directa de estreptococos del grupo B en muestras vaginales, Towers y cols. comunicaron que la enfermedad de inicio temprano mortal se desarrolló en dos de nueve lactantes hijos de madres con colonización leve y resultados negativos en el EIA rápido.⁹⁵⁹ En otro estudio

de un método de detección rápido para la colonización por estreptococos del grupo B. Morales y Lim comunicaron que, en 37 mujeres con colonización leve y pruebas de cuidado rápido negativas, 6 dieron a luz niños con sepsis de inicio temprano.⁶⁹⁷ Además, también se discute la oportunidad de la prueba prenatal para la colonización por estreptococos del grupo B. Alrededor del 60-70% de las mujeres con cultivos vaginales positivos en el segundo trimestre estarán colonizados al término, pero hasta el 30% de las mujeres con cultivos negativos durante el segundo trimestre tendrán cultivos positivos en el momento del parto. Por lo tanto, el desarrollo de métodos precisos para la detección rápida, sensible y específica de la colonización por estreptococos del grupo B en las mujeres en el momento del parto o cerca de él se convirtió en el eje de la investigación microbiológica clínica.

En 1996, los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), junto con la American Academy of Pediatrics (AAP) y el American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG) acordaron por consenso recomendaciones sobre estrategias de prevención para la enfermedad por estreptococos del grupo B.^{21,22,167} Estas pautas aconsejaban los encargados del cuidado obstétrico que adoptan una estrategia basada sobre el cultivo o sobre los riesgos para la prevención de la enfermedad de inicio temprano. La implementación ulterior de estas pautas y su cumplimiento han conducido a una disminución importante de la incidencia de la enfermedad neonatal de inicio temprano.⁸⁶³ Un componente crítico de estas pautas es el uso de profilaxis antibiótica materna durante el trabajo de parto y el parto. Esto planteó preocupaciones en relación con los efectos adversos de un mayor uso de antibióticos y el riesgo aumentado de reacciones anafilácticas contra la penicilina, el fármaco de elección para la quimioprofilaxis. Otra preocupación ha sido el surgimiento potencial de resistencia a los antibióticos en los estreptococos del grupo B. Hasta la fecha, no se han aislado cepas resistentes a la penicilina, aunque se ha vuelto relativamente frecuente la resistencia a la clindamicina y a la eritromicina. Una tercera preocupación fue que la mayor administración de penicilina en el período neonatal puede proporcionar suficiente presión selectiva como para que conduzca a infecciones neonatales debido a microorganismos resistentes a la penicilina como *Escherichia coli*, el segundo agente en frecuencia de sepsis en el período neonatal. Esta posibilidad no se ha concretado hasta la fecha y se requiere una vigilancia continua para su detección y contención eventual. En 2002, el Committee on Obstetrical Practice (Comité sobre Prácticas Obstétricas) de los Estados Unidos emitió una declaración de apoyo al uso de estrategias de prevención con base en cultivos de acuerdo con los datos de la red del Active Bacterial Core Surveillance/ Emerging Infections Program que sugiere que el enfoque basado sobre cultivos es superior al basado sobre riesgos.²³ Los CDC emitieron nuevas pautas en 2002, que reemplazaron a las de 1996 y recomendaban la detección sistemática universal basada sobre el cultivo para la colonización vaginal y rectal de todas las mujeres embarazadas a las 35-37 semanas de gestación (recuadro 13-3).¹⁷⁰

El protocolo de cultivos recomendado por los CDC, la ACOG y la FDA comprende la recolección de muestras de hisopados vaginales y rectales durante las semanas 35 a 37 de gestación.^{167,170,367,865} Las muestras de hisopados vaginales se recogen del tercio inferior de la vagina y del conducto anal (un único hisopado de la vagina y luego del conducto anal o un hisopado recogido de cada sitio). Los hisopados se colocan en Trans-Vag® o caldo LIM (caldo de Todd-Hewith con 10 µg/mL de ácido nalidíxico, 15 µg/mL de colistina y 10 mg/mL

de extracto de levadura) y se incuban durante 18 a 24 horas.⁶²⁵ Después de la incubación, se subcultiva el caldo en agar sangre de camero y se incuba durante 18-24 horas. Las placas son reincubadas por un día adicional si no se encuentran estreptococos del grupo B. Entonces se los identifica mediante métodos bioquímicos (p. ej., prueba CAMP, hidrólisis de hipurato, API Rapid Strep), serológicos (seroagrupamiento mediante coagulación o aglutinación del látex) o hibridación quimioluminescente (Gen-Probe®, AccuProbe®). Todo el procedimiento de cribado puede llevar 2 a 3 días. La detección directa de estreptococos del grupo B en el caldo LIM luego de la incubación también puede tener valor para acortar el tiempo de detección, pero este método necesita otra evaluación. Guerrero y cols. examinaron 551 cultivos rectovaginales para estreptococos del grupo B y 101 fueron positivos por el método de subcultivo.⁴⁴² De estas 101 muestras, 99 (98%) de los cultivos en caldo dieron pruebas de aglutinación positivas con el reactivo de látex para grupo B. La prueba de AccuProbe Group B Streptococcus Culture Identification® (Gen-Probe, San Diego, CA), un ensayo de confirmación de cultivos con sonda de ácidos nucleicos quimioluminescente, también fue evaluada para la detección de estreptococos del grupo B en muestras de caldo LIM que contienen hisopados vaginorrectales después de la incubación durante 18 a 24 horas. Se obtuvieron sensibilidades del 94,7-95,6% y especificidades del 98,4-99,5% cuando se comparó la prueba AccuProbe con incubación en caldo LIM con el subcultivo e identificación.^{122,1063} También se puede utilizar la sonda DNA quimioluminescente AccuProbe para identificar cepas en medios de cultivo o en gránulos originales obtenidos mediante centrifugación de caldos de hemocultivo positivos.^{251,257} En ocasiones, los cultivos de cribado darán otros agentes de infección. Stefonek y cols. comunicaron el aislamiento de estreptococos β-hemolíticos del grupo A de cultivos de cribado rectovaginales de dos pacientes en los que se desarrolló sepsis puerperal por estreptococos del grupo A.⁹¹⁹

En 2002, la Food and Drug Administration aprobó un nuevo producto denominado ensayo IDI-Strep B (Infection Diagnostic, Sainte Foy, Quebec, Canadá) como una nueva prueba para la detección de estreptococos del grupo B en hisopados rectovaginales recogidos de mujeres embarazadas. Este es un ensayo de PCR en tiempo real que utiliza el instrumento Cepheid Smart Cyclyer para detectar DNA de estreptococos del grupo B. La prueba puede proporcionar resultados dentro de la hora y es la primera prueba sin cultivos que reúne los criterios de rendimiento recomendados por las pautas de los CDC en el recuadro 13-3. Este método tiene una sensibilidad de como mínimo un 85% en comparación con el método de amplificación-cultivo en caldo. Al igual que el método estándar, se recoge la muestra de una paciente con 35 a 37 semanas de gestación o cuando comienza el trabajo de parto. Esta prueba debe realizarse de modo de obtener los resultados con tiempo suficiente para que la mujer reciba 4 horas de antibioticoterapia antes del parto. Aun cuando puede realizarse como prueba estándar sola, sigue siendo necesario el cultivo de la muestra para efectuar las pruebas de sensibilidad a los antibióticos para clindamicina y eritromicina si el paciente es alérgico a la penicilina. Debido a la ventana de tratamiento de 4 horas, la prueba es útil sólo si los resultados se obtienen al menos 4 horas antes del parto. En las pacientes que acuden durante el trabajo de parto o que no han tenido cuidados prenatales, se puede realizar el ensayo IDI-Strep B si se dispone de 5 a 6 horas para las pruebas y la administración de tratamiento antibiótico.

Aunque los estreptococos del grupo B se asocian con un 20% de endometritis posparto, 25% de bacteriemias luego de la

Recuadro 13-3 Procedimientos para recoger y procesar muestras clínicas para cultivo de estreptococos del grupo B y para realizar pruebas de sensibilidad para clindamicina y eritromicina¹⁷⁰**Procedimiento para la recolección de muestras clínicas para cultivo de estreptococos del grupo B a las 35-37 semanas de gestación**

- Pase el hisopo por la porción más externa de la vagina (íntroito vaginal) y luego por el recto (inserte el hisopo a través del esfínter anal) utilizando el mismo hisopo o dos hisopos diferentes. El cultivo debe ser recolectado en la paciente ambulatoria por el personal sanitario de la salud o la propia paciente, con instrucciones apropiadas. No se recomiendan los cultivos del cuello uterino y no se debe utilizar un espéculo para recoger el cultivo.
- Coloque el/los hisopo/s en un medio de transporte de rutina. Existen en el comercio sistemas de transporte apropiados (p. ej., de Amie o de Stuart sin carbón). Si se recogen por separado hisopados vaginales y rectales, ambos hisopos pueden ser colocados en el mismo recipiente del medio. Los medios de transporte mantienen la viabilidad de los estreptococos del grupo B hasta durante 4 días a temperatura ambiente o bajo refrigeración.
- Los rótulos deben identificar claramente que las muestras son para cultivo de estreptococos del grupo B. Si se ordenan pruebas de sensibilidad para mujeres alérgicas a la penicilina, los rótulos de las muestras también deben identificar a la paciente como alérgica a la penicilina y deben especificar que se deben realizar pruebas de sensibilidad para clindamicina y eritromicina si se aíslan estreptococos del grupo B.

Procedimiento para el procesamiento de muestras clínicas para cultivo de estreptococos del grupo B

- Extraiga el/los hisopo/s del medio de transporte*. Inocule el/los hisopo/s en un medio de caldo selectivo recomendado, como caldo de Todd-Hewitt suplementado con gentamicina (8 $\mu\text{g/mL}$) y ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g/mL}$) o con colistina (10 $\mu\text{g/mL}$) y ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g/mL}$). Los ejemplos de opciones comerciales disponibles incluyen caldo de Trans-Vag suplementado con sangre de carnero desfibrinada o caldo LIM.^b
- Incube el caldo selectivo inoculado durante 18-24 horas a 35-37 °C en aire ambiente o CO_2 al 5%. Subcultive el caldo en una placa de agar sangre de carnero (p. ej., agar tripticosa soja con sangre de carnero desfibrinada).
- Inspeccione e identifique los microorganismos sugestivos de estreptococos del grupo B (zona estrecha de β -hemólisis, cocos grampositivos, catalasa negativos). Tenga en cuenta que puede ser difícil observar la hemólisis, de modo que las colonias típicas sin hemólisis deben ser evaluadas mejor. Si no se identifican estreptococos del grupo B después de la incubación durante 18-24 horas, reincube e inspeccione a las 48 horas para identificar los microorganismos sospechosos.
- Se pueden utilizar distintas pruebas de látex para el agrupamiento de *Streptococcus* u otras pruebas para detección de antígeno de estreptococos del grupo B (p. ej., sonda genética) para la identificación específica o se puede utilizar la prueba de CAMP para una identificación presuntiva.

Procedimiento para las pruebas de sensibilidad en disco para clindamicina y eritromicina en las cepas aisladas, cuando se indican en pacientes alérgicos^c

- Utilice un hisopo de algodón para fabricar una suspensión a partir de un crecimiento de 18-24 horas del microorganismo en solución salina fisiológica o caldo de Mueller-Hinton para equiparar el estándar de turbidez de McFarland 0,5.
- Dentro de los 15 minutos de ajustar la turbidez, sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. El hisopo debe rotarse varias veces y presionarse con firmeza en la pared lateral del tubo por encima del nivel del líquido. Utilice el hisopo para inocular toda la superficie de una placa de agar sangre de carnero. Una vez que la placa está seca, utilice una pinza estéril para colocar un disco de clindamicina (2 μg) en el 50% de la placa y un disco de eritromicina (15 μg) en la otra mitad.
- Incube a 35 °C en CO_2 al 5% durante 20-24 horas.
- Mida el diámetro de la zona de inhibición utilizando una regla o calibradores. Interprete según las pautas de NCCLS para especies de *Streptococcus* distintas de *S. pneumoniae* (valores críticos 2002^c: clindamicina: ≥ 19 mm = sensible, 16-18 mm = intermedio, ≤ 15 mm = resistente; eritromicina: ≥ 21 mm = sensible; 16-20 mm = intermedio, ≤ 15 mm = resistente).

*Antes del paso de inoculación, algunos laboratorios pueden decidir hacer rodar el/los hisopo/s sobre una sola placa de agar sangre de carnero o una placa de agar sangre de carnero con colistina-ácido nalidíxico (CAN). Esto sólo se debe hacer además de la inoculación en caldo selectivo y no en su lugar. La placa debe ser sembrada en estria para el aislamiento, debe ser incubada a 35-37 °C en aire ambiente o en CO_2 al 5% durante 28-24 horas y debe ser inspeccionada para detectar microorganismos sugestivos de estreptococos grupo B como se describió antes. Si las colonias sospechosas son confirmadas como estreptococos del grupo B, el caldo puede ser descartado, lo que acorta el tiempo para obtener los resultados de los cultivos.

^bFenton LJ, Harper M. H. Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective recovery of group B streptococci. J Clin Microbiol 1979;9:167-169. Aunque existe a menudo el medio Trans-Vag sin sangre de carnero, la comparación directa del medio con sangre de carnero y sin ella ha mostrado un rendimiento más alto cuando se agrega sangre. El caldo LIM también puede beneficiarse con el agregado de sangre de carnero, aunque la mejoría en el rendimiento es más pequeña y no existen aún datos suficientes para sostener una recomendación.

^cNational Committee for Clinical Laboratory Standards. Estándar de rendimiento para pruebas de sensibilidad a los antibióticos. M100-S12, cuadro 2H, Wayne, PA. NCCLS, 2002. NCCLS recomienda las pruebas de difusión con discos (M-2) o de microdilución en caldo (M-7) para evaluar la sensibilidad de estreptococos del grupo B. También se pueden utilizar sistemas comerciales que han sido aceptados o aprobados para el examen de estreptococos distintos de *S. pneumoniae*. No se recomiendan de rutina las pruebas de sensibilidad a la penicilina para estreptococos del grupo B porque hasta la fecha no se han confirmado cepas resistentes.

cesárea y 25-30% de casos de bacteriuria asintomática durante el parto y después de él, también se asocian con distintas infecciones en adultos sin embarazo.³⁴⁴ Con la declinación de la enfermedad neonatal por estreptococos del grupo B, más de dos tercios de las infecciones ocurren ahora en adultos y no se vinculan con embarazo. En general, los adultos infectados tienen una enfermedad subyacente importante, como diabetes, cirrosis hepática, accidente cerebrovascular, neoplasia o dis-

función de las vías urinarias.⁵¹⁶ Las infecciones de la piel y los tejidos blandos son las entidades clínicas más frecuentes asociadas con estreptococos del grupo B invasores e incluyen celulitis, abscesos, úlceras por decúbito infectadas e infecciones invasoras de heridas luego de procedimientos quirúrgicos.^{99,146} La osteomielitis puede ocurrir como complicación de la celulitis por la propagación contigua, sobre todo en asociación con úlceras por decúbito o como resultado de la siembra hematóge-

na desde otro sitio de infección.^{385,414} Es necesario el tratamiento antibiótico con aspiración o drenaje abierto de las articulaciones infectadas y la extracción de los dispositivos protésicos, si están presentes, para lograr la curación. Los estreptococos del grupo B también constituyen la principal causa de osteomielitis en los lactantes y la siembra hematógena del hueso es la fuente del microorganismo.⁹⁴⁰ La osteomielitis vertebral causada por estos estreptococos es rara y suele ser el resultado de la siembra hematógena desde otro foco o desde el tubo digestivo.^{320,352} También se ha comunicado osteomielitis vertebral como complicación rara de la bacteriemia posparto e infecciones urinarias.^{64,629} En general, la artritis séptica por estos estreptococos del grupo B se presenta con fiebre y dolor articular que sigue a la bacteriemia o es simultáneo con ella.³⁸⁴ Los pacientes con artritis suelen ser ancianos, tienen diabetes o una neoplasia como factores de riesgo y presentan hemocultivos o cultivos sinoviales positivos.⁸⁵¹ También se han comunicado raros casos de fascitis necrosante debida a estreptococos del grupo B.^{812,937} En general, la neumonía por estos estreptococos ocurre en huéspedes debilitados más ancianos, a menudo es el resultado de la aspiración del contenido orofaríngeo y se puede complicar con el desarrollo de empiema.^{392,1007} La conjuntivitis, la queratitis y la endoftalmitis hematógena por estreptococos del grupo B son infecciones graves, aunque raras, que ocurren en ojos con daño previo y conducen a una patología importante, que lleva a disminución de la agudeza visual o incluso a la ceguera.⁷⁴⁷

La bacteriemia por estreptococos del grupo B desde un foco distante de infección puede conducir a meningitis y endocarditis. La meningitis es rara, representa un 4% de la meningitis bacteriana en los adultos y ocurre principalmente en mujeres posparto y adultos de edad avanzada con enfermedades subyacentes crónicas, como diabetes, cirrosis, deterioro neurológico, neoplasias, insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular/pulmonar e infección por HIV.^{295,441,635} También se ha comunicado meningitis por estreptococos del grupo B luego de un traumatismo de cráneo grave o asociada con rinorrea de líquido cefalorraquídeo.¹⁰⁰² La endocarditis ocurre tanto en varones como en mujeres, se puede presentar de forma aguda o subaguda y representa el 2-18% de las enfermedades invasoras por estreptococos del grupo B en los adultos.^{45,345} Las anomalías cardíacas preexistentes suelen estar presentes antes del inicio de la enfermedad y, una vez establecidas, habitualmente se desarrollan grandes vegetaciones y la válvula mitral es la más afectada. Las complicaciones causadas por fenómenos embólicos o por la rápida destrucción del tejido valvular puede requerir el reemplazo valvular.^{382,873} La endocarditis en recién nacidos y lactantes ocurre pocas veces pero se asemeja a los casos en los adultos, con destrucción valvular extensa y aparición de fenómenos embólicos.^{20,901} La bacteriemia, la endocarditis y la meningitis por estreptococos del grupo B en los pacientes con cáncer gastrointestinal, colónico o pancreático han sugerido una asociación similar a la que existe entre *S. bovis*, y enfermedades colónicas y cáncer de colon.^{390,1066}

La bacteriuria por estreptococos del grupo B se ha asociado con una evolución desfavorable del embarazo, mayor tasa de trabajo de parto prematuro y rotura prematura de membranas.^{692,1074} Además de ser una causa bien reconocida de infección urinaria en las mujeres embarazadas, este microorganismo es una causa de cistitis y pielonefritis en hombres, mujeres no embarazadas y niños.⁷⁰⁴ Entre el 5% y el 20% de los adultos sin embarazo con bacteriemia tienen infección urinaria por estreptococos del grupo B.^{516,705} Los factores de riesgo para la infección urinaria causada por este microorganismo son edad avan-

zada, enfermedad subyacente (sobre todo diabetes), presencia de un catéter urinario permanente, infecciones urinarias previas, anomalías estructurales del aparato urinario y otros trastornos comórbidos (p. ej., enfermedad prostática).^{345,704} La pielonefritis y el absceso renal son posibles complicaciones de la infección ascendente y la diseminación hematógena de los estreptococos del grupo B.¹⁰⁷⁹

Estos estreptococos pueden producir el síndrome similar al shock tóxico que se asocia con estreptococos del grupo A.^{386,860} Schlievert y cols. comunicaron el caso de una mujer de 27 años que presentó una enfermedad similar al shock tóxico que consistía en fiebre, hipotensión y erupción eritematosa, descamación y falla multiorgánica.⁸⁶⁰ Aunque sus hemocultivos fueron negativos, se aislaron estreptococos β -hemolíticos grupo B en los cultivos de orina y vaginales. Otros estudios de estos cultivos demostraron que producían una sustancia tóxica que tenía las propiedades asociadas con las exotoxinas pirógenas; la sustancia producía fiebre, mayor sensibilidad a la endotoxina en animales de experimentación y actuaba como un mitógeno linfocítico potente.

Al igual que los estreptococos del grupo A, los del grupo B siguen siendo sensibles a la penicilina G, el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones y para la quimioprofilaxis perinatal de mujeres que eran portadoras vaginales de estreptococos del grupo B.⁷⁰⁸ También son altamente activas ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cefazolina, quinupristina-dalfopristina y meropenem, y la mayoría de las cepas tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$.^{27,551,668,708} Algunos estreptococos del grupo B demuestran resistencia a la eritromicina y la clindamicina, y la proporción de cepas resistentes varía con la localización geográfica. En una encuesta de 119 cepas invasoras y 227 cepas colonizadoras de estreptococos β -hemolíticos del grupo B aisladas en recién nacidos de seis centros académicos de los Estados Unidos, el 20,2% y el 6,9% eran resistentes a la eritromicina y la clindamicina, respectivamente.⁶²⁷ Entre las cepas aisladas en California, el 32% y el 12% fueron resistentes a la eritromicina y la clindamicina, respectivamente, mientras que las cifras correspondientes para las cepas aisladas en Florida fueron del 8,5% y del 2,1%. Los datos nacionales estadounidenses de sensibilidad de los microorganismos aislados en el torrente circulatorio de centros que participan en el programa de vigilancia SENTRY mostraron que el 25,4% de las cepas de los Estados Unidos y el 14,3% de las de Canadá eran resistentes a la eritromicina y el 7% de los aislamientos provenientes tanto de los Estados Unidos como de Canadá eran resistentes a la clindamicina.²⁷ Los genotipos de resistencia a macrólidos-gentamicina que se han detectado en estreptococos del grupo B incluyen *ermA* (resistentes a la eritromicina, sensibles a la clindamicina), *ermB* (resistentes a la eritromicina, resistentes a la clindamicina) y *mef* (resistentes a la eritromicina, sensibles a la clindamicina).²⁸⁵ Todas las cepas de estreptococos del grupo B evaluadas hasta la fecha han sido sensibles a la vancomicina.

***Streptococos* β -hemolíticos de los grupos C y G**

Los estreptococos β -hemolíticos del grupo C actualmente incluyen *S. dysgalactiae* subespecie *equisimilis*, *S. dysgalactiae* subespecie *dysgalactiae*, *S. equi* subespecie *equi* y *S. equi* subespecie *zooepidemicus*. Se ha demostrado que las cepas anteriores de *S. equisimilis* aisladas en seres humanos portan

los antígenos del grupo C o del grupo G de Lancefield y son desde el punto de vista genético lo suficientemente similares a las cepas del grupo C de los animales (subespecie *dysgalactiae*) como para ser ubicadas en la misma especie, pero corresponden a diferentes subespecies.^{89,992,1011} *S. dysgalactiae* subespecie *equisimilis* crece como colonias grandes en agar sangre de carnero (SBA) y suele ser β -hemolítico. Las cepas relacionadas que portan el antígeno del grupo C o L y son aisladas primariamente en animales se denominan ahora *S. dysgalactiae* subespecie *dysgalactiae*.⁹⁹² Las cepas de esta subespecie pueden ser α -hemolíticas, β -hemolíticas o no hemolíticas. Además, algunos estudios genéticos moleculares han hallado grandes semejanzas entre las especies anteriores *S. equi* y *S. zooepidemicus*; estas especies han sido reclasificadas ahora como *S. equi* subespecie *equi* y *S. equi* subespecie *zooepidemicus*.³⁴⁸ Estas subespecies son portadoras del carbohidrato antigénico del grupo C de Lancefield en su pared celular y producen hemolisinas que son similares a las de los estreptococos del grupo C. Las subespecies de *S. equi* y *S. dysgalactiae* forman colonias grandes en SBA, lo que las diferencia de los estreptococos α -hemolíticos, β -hemolíticos o no hemolíticos "diminutos" o de "colonias pequeñas" del grupo anginoso de estreptococos viridans, que también pueden portar el antígeno polisacárido del grupo C.⁹⁸⁷ Los microorganismos del grupo anginoso también difieren de los microorganismos del grupo C de "colonias grandes" desde el punto de vista genético y fenotípico.^{332,604} Algunos estudios de casos y controles indican que los microorganismos del grupo C de colonias grandes pueden producir faringitis, mientras que los del grupo anginoso que portan el antígeno del grupo C (o A, G o F) no lo hacen.¹⁹⁸ Sin embargo, algunos estudios recientes han realizado una asociación entre faringitis y una subespecie recién descrita de *S. constellatus*, *S. constellatus* subespecie *pharyngis*.¹⁰⁵¹

S. dysgalactiae subespecie *equisimilis*, la cepa humana más frecuente, ha sido aislada en la faringe de portadores y en personas con faringitis y amigdalitis exudativa.^{236,370,681,977,978,1090} Este microorganismo también ha sido aislado en otras infecciones, tanto en niños como en adultos, que incluyen sepsis en huéspedes neutropénicos, sepsis puerperal, celulitis, fascitis necrosante, neumonía, epiglotitis, empiema, bacteriemia, meningitis, absceso encefálico, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, endoftalmitis, absceso intraabdominal, sepsis relacionada con catéteres y meningitis.^{35,39,81,157,732,757,796,840,892,895,911,1062} La mayoría de los pacientes con estas infecciones tienen enfermedades subyacentes, como enfermedad cardiopulmonar crónica, diabetes, inmunosupresión, trastornos dermatológicos, neoplasias, infección por HIV y alcoholismo.^{840,892,922} Los estreptococos β -hemolíticos que tienen antígenos de los grupos C y G también han sido asociados con síndrome del shock tóxico estreptocócico, fascitis necrosante y fiebre reumática aguda.^{466,562,1062} El cribado de aislamientos de estreptococos de los grupos C y G para exotoxinas pirogénicas estreptocócicas ha identificado sólo el gen para SPE G (*speG*) y los otros SPE y sus respectivos genes naturales están ausentes.^{466,836} Sin embargo, Igwe y cols. examinaron 21 cepas de estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G y observaron que 11 eran PCR positivas al menos para uno de los genes *speM*, *ssa* o *smeZ*, que son miembros de la familia de los superantígenos de los estreptococos del grupo A.⁵⁰⁹

S. equi subespecie *zooepidemicus* causa distintos tipos de enfermedades en animales, entre ellas mastitis bovina, infecciones respiratorias en caballos, artritis purulenta en corderos y cabras, e infecciones genitales en aves de corral. *S. equi* subespecie *zooepidemicus* también ha sido implicado en infecciones humanas, como neumonía, bacteriemia, endocarditis, meningi-

tis, artritis séptica, aneurisma de la aorta abdominal, trombosis venosa profunda, nefritis y linfadenitis cervical.^{54,55,204,601,1088} Los brotes de faringitis humana causados por *S. equi* subespecie *zooepidemicus* han sido rastreados al consumo de leche de vaca no pasteurizada y queso casero que contenía los microorganismos.^{310,375} En algunos de los individuos afectados, también se observó glomerulonefritis postestreptocócica.³⁷⁵ *S. equi* subespecie *equi* es la causa de una infección respiratoria de los caballos llamada "gurma" o "papera equina", caracterizada por fiebre alta, secreción nasal mucopurulenta y abscesos en los ganglios linfáticos submandibulares y retrofaríngeos que finalmente se rompen y drenan en el aparato respiratorio del animal infectado.⁹⁵⁷ Este microorganismo es excepcional en seres humanos y ha sido aislado en casos de bacteriemia y meningitis.^{81,326}

Los estreptococos β -hemolíticos del grupo G constituyen una parte de la flora gastrointestinal, vaginal, orofaríngea y cutánea humana normal. Las cepas con antígeno del grupo G aisladas en humanos también se denominan *S. dysgalactiae* subespecie *equisimilis* y las cepas con este antígeno aisladas en animales corresponden a *S. canis*.^{277,1010} Las infecciones causadas por cepas del grupo G asociadas con seres humanos son faringitis, otitis media, infecciones pleuropulmonares, celulitis, tromboflebitis séptica, bacteriemia, endocarditis y meningitis.^{519,644,1001,1032,1069,1072} También se han comunicado infecciones graves de las prótesis óseas y articulares causadas por estos microorganismos.¹³⁹ Se ha informado celulitis y artritis séptica por estreptococos del grupo G en el sitio de una inyección parenteral o cerca de él, con bacteriemia y complicaciones hematógenas ulteriores, en adictos a drogas intravenosas.^{243,408} La bacteriemia por este microorganismo también se observa en las circunstancias clínicas de neoplasias subyacentes, sepsis puerperal, aborto séptico, enfermedad pulmonar crónica e insuficiencia cardíaca congestiva. Se ha comunicado meningitis y sepsis por estreptococos del grupo G en un paciente con SIDA.⁸⁰⁰ Se identificó *S. canis*, el estreptococo del grupo G aislado en perros, en un ser humano con sepsis en 1997.⁹⁰

En general, los estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G son sensibles a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona.^{52,159,961} Algunas cepas pueden mostrar una sensibilidad intermedia a la penicilina G, pero son sensibles a las cefalosporinas de tercera y de cuarta generación. Algunas cepas pueden ser resistentes a la eritromicina y a otros macrólidos (p. ej., clindamicina, claritromicina y azitromicina). Todas las cepas evaluadas hasta la fecha han sido sensibles a la vancomicina.

Estreptococos β -hemolíticos del grupo F

Los microorganismos de este grupo han sido llamados *S. milleri* en el esquema taxonómico británico y el **grupo anginoso** (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*) en los esquemas taxonómicos estadounidenses. Estos microorganismos pueden ser α -hemolíticos, β -hemolíticos o no hemolíticos y pueden tener el antígeno grupo F, C o G o pueden ser no agrupables. Estos estreptococos característicamente crecen en colonias diminutas en medios de agar. Las colonias son puntiformes después de 24 horas y, si son β -hemolíticas tienen una zona grande de hemólisis que se extiende mucho más allá del margen de la colonia. Los estreptococos β -hemolíticos del grupo F son causas reconocidas de infecciones supuradas graves, como celulitis, abscesos de tejidos profundos, bacteriemia,

osteomielitis y endocarditis (véase luego la sección sobre “El grupo anginoso”). El grupo anginoso se explicará con los estreptococos viridans.

Otros estreptococos del grupo de “cocos piógenos”

Se describieron otros estreptococos β -hemolíticos piógenos que portan otros antígenos de la pared celular de Lancefield y que producen infecciones en animales. Estos estreptococos son *S. porcinus*, *S. iniae* (*S. shiloi*), *S. phocae* y *S. didelphys*. Las cepas de *S. porcinus* pertenecen al grupo E, P, U o V de Lancefield y causan infecciones en cerdos. En 1995, Facklam y cols. comunicaron sobre 13 cepas de *S. porcinus* que se habían descubierto en seres humanos y fueron enviadas a los CDC en los 10 años anteriores.³³⁷ De estas 13 cepas, 5 provenían del aparato genital femenino (vagina, cuello uterino), 3 eran de tejidos placentarios, 2 fueron aislados en sangre y se aisló una en piel, una en orina y otra en una herida infectada. Nueve reaccionaron con el nuevo y provisorio antígeno C1 de grupo, 3 reaccionaron con el antisuero contra grupo P de Lancefield y 1 no fue agrupable. *S. iniae* es un patógeno de algunos peces, como la tilapia, pero puede causar bacteriemia, meningitis y endocarditis en personas que manipulan peces contaminados.¹⁰³⁴ *S. shiloi*, una especie de estreptococos β -hemolíticos que causa meningoencefalitis en las truchas, es idéntico desde el punto de vista bioquímico y genético a *S. iniae*.³¹⁷ *S. phocae* es un *Streptococcus* β -hemolítico que provoca infecciones pleuropulmonares en focas de puerto y focas grises. En la descripción original de esta especie, se caracterizaron 22 cepas.⁸⁹⁸ Cinco de las 22 cepas reaccionaron con los antisueros para el grupo C de Lancefield, pero las 17 restantes no fueron agrupables. Las mismas 5 cepas reaccionaron con el reactivo de látex grupo C Streptex, 13 reaccionaron con el reactivo de látex grupo F Streptex y 4 no reaccionaron con ningún reactivo Streptex. *S. didelphys* es un *Streptococcus* β -hemolítico que ha sido aislado en lesiones cutáneas, hígado, bazo y pulmones de zarigüeyas.⁸³⁵ Esta especie es inusual en cuanto que la prueba de catalasa es fuertemente positiva hasta que el microorganismo ha sido subcultivado varias veces.

S. urinalis es un *Streptococcus* antes no descrito que fue aislado en una muestra de orina de un paciente con cistitis.²¹² La secuenciación comparativa de genes RNA (rRNA) ribosómico 16S muestra que este microorganismo pertenece al subgrupo de cocos piógenos de los estreptococos y tiene afinidad filogenética estrecha con los estreptococos β -hemolíticos del grupo A y *S. canis* (grupo G). Al contrario de la mayoría de los miembros del subgrupo piógeno, esta especie es α -hemolítica en SBA.

Streptococcus pneumoniae

Factores de virulencia

La virulencia de *S. pneumoniae* es atribuible fundamentalmente a su capacidad para resistir la opsonización, la fagocitosis y la destrucción intracelular de las células fagocíticas.⁷¹¹ Esta resistencia se relaciona fundamentalmente con la **cápsula de polisacárido** del microorganismo. En modelos animales, la inhibición de la producción de la cápsula mediante técnicas genéticas (mutagénesis de transposones) vuelve a estos microorganismos avirulentos. Existen al menos 90 tipos capsulares de *S. pneumoniae*; 23 de estos tipos representan más del 88% de las bacteriemias y meningitis por neumococos.⁷¹¹ Los poli-

sacáridos capsulares en *S. pneumoniae* están compuestos por polímeros largos de unidades repetidas formadas por dos a siete monosacáridos, algunos de los cuales pueden estar en cadenas largas o ramificadas.⁹⁸⁸ Estos polímeros se sintetizan por el agregado de porciones de hidratos de carbono al extremo proximal de la cadena y la mayoría de los tipos están fijados al peptidoglucano y el polisacárido C de la pared celular. Algunos tipos de la cápsula neumocócica (p. ej., tipo 3) tienen propiedades biológicas que tornan a estos microorganismos más virulentos que otros y los neumococos que pertenecen a los diferentes serotipos capsulares varían en su capacidad para producir respuestas de anticuerpos humorales.⁹⁸⁸ Estas características pueden explicar la mayor virulencia asociada con algunos tipos capsulares sobre otros. Al parecer, la adherencia inicial de los neumococos a la mucosa nasofaríngea no está mediada por material capsular sino que está relacionada con adhesinas bacterianas que interactúan con receptores sobre las superficies de las células epiteliales faríngeas. La interacción puede ocurrir con el ácido siálico mucoso a través de la neuraminidasa neumocócica o a través de ligandos de la superficie celular del neumococo que se unen a residuos disacáridos de *N*-acetil-D-galactosamina-galactosa sobre las superficies de las células del aparato respiratorio.²⁶ Los neumococos también tienen tanto ácidos teicoicos como ácidos lipoteicoicos. Los **ácidos teicoicos** están ligados de forma covalente al peptidoglucano de la pared celular por enlaces fosfodiéster, mientras que los **ácidos lipoteicoicos** están ligados a la membrana celular. Estas moléculas son estructuralmente similares y están compuestas por unidades repetidas que contienen glucosa, 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxi-D-galactosa, *N*-acetil-glucosamina, fosfocolina y ribitol-5-fosfato. Las unidades repetidas están ligadas entre sí por enlaces fosfodiéster. Los ácidos teicoicos y los ácidos lipoteicoicos de *S. pneumoniae* también se denominan polisacárido C y antígeno F, respectivamente, y todos los serotipos neumocócicos tienen ambos antígenos.

Otros productos celulares de *S. pneumoniae*, como neumolisina, autolisina y moléculas de la superficie celular, pueden desempeñar un papel en la virulencia de los neumococos. Los mutantes defectuosos en la producción de estos distintos componentes tienen una virulencia menor en modelos animales, y la inmunización con productos purificados conduce a la producción de anticuerpos específicos que confieren una resistencia parcial ante la exposición a infecciones.¹²⁰ La **neumolisina** es una proteína citotoxina activada por tiol de 53 kDa que se acumula dentro de las células durante el crecimiento y es liberada con la lisis celular por la autolisina.¹²¹ La neumolisina interactúa con el colesterol en las membranas celulares de distintas células huéspedes, forma oligómeros sobre la membrana y dentro de ella que evolucionan a poros, y finalmente lisa las células. Además, inhibe la actividad bactericida de las células fagocíticas, detiene la motilidad ciliar, estimula la producción de citocinas por los macrófagos (sobre todo interleucina [IL]-1, IL-8 y factor de necrosis tumoral [TNF]) y activa la vía clásica del complemento.^{202,203,828} Los mutantes que carecen de capacidad para producir neumolisina tienen menor virulencia en modelos animales y la inmunización con neumolisina purificada proporciona una protección parcial a una carga de cepas virulentas, productoras de neumolisina.^{87,761} La **autolisina** es una *N*-acetil-muramoil-L-alanina amidasa que, junto con una enzima glucosidasa, funciona durante la división celular para separar las células hijas, y al final del crecimiento exponencial para dividir los microorganismos, produciendo dispersión lítica de neumolisina y α -hemolisina.⁸⁵ La virulencia está disminuida en los mutantes negativos para autolisina en comparación

con las cepas de tipo silvestre.¹⁵¹ Es probable que la menor virulencia se deba a la falta de liberación de componentes tóxicos de la pared celular y neumolisina y, por ende, a la generación de una respuesta inflamatoria muy reducida. Las cepas de *S. pneumoniae* también producen **dos enzimas neuraminidasa** diferentes (**NanA y NanB**), que escinden el ácido siálico terminal de las superficies celulares para exponer las porciones *N*-acetil-glucosamina-galactosa que median la adherencia de las células bacterianas.¹⁴⁸ Se ha propuesto que las neuraminidasas liberadas en el sistema nervioso central (SNC) por neumococos in vivo pueden producir la desialilación de la gp120 sialilada del HIV y de los receptores de quimiocinas/CD4 de las células de la microglía/linfocitos diana del HIV, lo que conduce a la progresión de la infección viral y al desarrollo manifiesto de encefalitis por HIV.⁸²² Algunas cepas neumocócicas también producen **hialuronidasa y IgA₁ proteasas**. La primera enzima facilita la propagación de los microorganismos en el tejido, mientras que la última inactiva la IgA secretoria para facilitar la colonización neumocócica y la invasión ulterior de las superficies mucosas.⁸⁶ También se describió una proteína de superficie denominada **PspA** (proteína de superficie A del neumococo) que es importante para la virulencia neumocócica, aunque su función se desconoce.^{241,674} PspA es la proteína antigénica inmunodominante sobre la superficie de las células neumocócicas, y los anticuerpos dirigidos contra PspA de una cepa neumocócica dada protegen a los animales de experimentación contra la carga de la cepa homóloga y de las cepas heterólogas. Los mutantes defectuosos en la producción de PspA son avirulentos. La inoculación intranasal de ratones con PspA evita tanto la colonización del aparato respiratorio como el desarrollo de enfermedad invasiva.¹⁰⁸⁰ Por esta razón, PspA es un antígeno que podría utilizarse para la elaboración de vacunas.¹³⁰

Vacunas antineumocócicas

Actualmente, existen dos vacunas para la prevención de la enfermedad debida a *S. pneumoniae*: vacunas de polisacáridos puros y vacunas conjugadas de polisacáridos y proteínas. Las **vacunas de polisacáridos neumocócicos** –Pneumovax23® (Merck and Company, Whitehouse Station, NJ) y Pneu-Imune23® (Lederle, Wyeth-Lederle, Inc., Pearl River, NY)– están compuestas por una mezcla de 23 polisacáridos capsulares neumocócicos.⁷¹² Los 23 serotipos capsulares incluidos en estas vacunas son 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Estos tipos capsulares representan por lo menos un 85-90% de los serotipos que causan infecciones neumocócicas invasivas en adultos y niños, y los seis serotipos que originan más a menudo infecciones neumocócicas resistentes a los fármacos en los Estados Unidos (serotipos 6B, 9V, 14, 19A, 19F y 23F).⁷³³ El Immunization Practices Advisory Committee (Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización) de los CDC recomienda la vacunación de: 1) personas de 65 años o mayores; 2) personas de 2-64 años que tienen una enfermedad crónica (p. ej., enfermedad cardiovascular crónica, miocardiopatías), enfermedad pulmonar crónica (p. ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], enfisema, pero no asma), diabetes mellitus, alcoholismo, hepatopatía (p. ej., cirrosis) o pérdidas de líquido cefalorraquídeo (LCR); 3) aquellos que presentan asplenia funcional o anatómica (p. ej., drepanocitosis, esplenectomía); 4) personas de 2-64 años que viven en ambientes o circunstancias que los colocan en riesgo de enfermedad neumocócica invasora (nativos de Alaska, algunas poblaciones de indígenas nortea-

americanos, residentes de asilos y otras instituciones de cuidados crónicos) y 5) personas de 2 años o mayores que están inmunodeprimidas, incluidas aquellas con infección por HIV, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, neoplasias, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrítico y otros trastornos asociados con inmunosupresión (p. ej., trasplante de médula ósea) y personas que reciben inmunoterapia supresora.^{143,168} Se ha demostrado que son vacunas seguras, eficaces y relativamente poco costosas. Estas vacunas de polisacáridos puros provocan una respuesta de anticuerpos en las células B, pero los antígenos son independientes de las células T, de modo que no se observa una respuesta inmunitaria protectora en los niños menores de 2 años.⁷⁷² Otros inconvenientes de las vacunas de polisacárido neumocócico son su incapacidad para afectar la portación nasofaríngea y, por lo tanto, la propagación de los microorganismos de una persona a otra, y su eficacia limitada en pacientes con neoplasias hematológicas o estados de inmunodeficiencia subyacente.

En febrero de 2000, se autorizó el uso de PCV7 (Pneumococcal Conjugate Vaccine 7), una nueva vacuna de conjugado neumocócico heptavalente (Prenar; Wyeth Lederle Vaccines, Pearl River, NY) en lactantes y niños.¹⁶⁹ PCV7 está compuesta por una proteína transportadora de toxina diftérica inerte (CRM₁₉₇) ligada de forma covalente con los antígenos polisacáridos capsulares de siete serotipos de *S. pneumoniae*. Los siete serotipos incluidos en la vacuna son los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, asociados con un 80% de enfermedad neumocócica que ocurre en niños menores de 6 años.^{169,772} Esta nueva vacuna se aplica en inyección intramuscular y se puede administrar simultáneamente con otras inmunizaciones infantiles. Se recomienda PCV7 para los niños de 2 años y menores, y se administra a los 2, 4 y 6 meses de edad, con una inmunización de refuerzo a los 12 y 15 meses de edad. La inmunización inicial con PCV7 ya se puede iniciar a las 6 semanas de vida. Para los niños de 2 a 5 años de edad, el Advisory Committee on Immunization Practices (Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización) de los Estados Unidos ha recomendado que los niños en alto riesgo de enfermedad neumocócica (niños con hemoglobinopatías por células falciformes, asplenia congénita/adquirida/funcional, inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, tratamientos inmunosupresores, enfermedades crónicas) reciban tanto PCV7 como la vacuna de polisacáridos para aumentar la respuesta inmunitaria por la administración de un antígeno dependiente de las células T y ampliar la cobertura de anticuerpos más allá de los siete serotipos incluidos en la PCV7. La vacuna conjugada PCV7 provoca una respuesta viva de anticuerpos dependientes de las células T, necesaria para la producción óptima de anticuerpos y la capacidad para montar una respuesta amnésica a través de la memoria inmunitaria.^{169,733,886} Algunos estudios grandes han mostrado que la nueva vacuna de conjugado heptavalente neumocócico es eficaz para evitar la enfermedad invasora en niños pequeños debida a los serotipos de *S. pneumoniae* de la vacuna.^{547,810} Estos estudios indican que se previno más del 90% de la enfermedad neumocócica invasora debida a los serotipos de la vacuna en los niños inmunizados. Es interesante señalar que no se observaron aumentos en las infecciones debidas a serotipos distintos de la vacuna durante los ensayos de eficacia clínica, y se observó que las tasas de portación nasofaríngea de *S. pneumoniae* estaban disminuidas en los niños vacunados, fenómeno no observado en los que recibieron la vacuna de polisacárido. En un pequeño estudio sobre eficacia se observó que la PCV7 provocaba también respuestas protectoras de anticuerpos en los niños con drepanocitosis.⁷³⁵

Importancia clínica

S. pneumoniae es la causa principal de neumonía bacteriana extrahospitalaria. El microorganismo puede estar alojado en las vías respiratorias altas del 5-10% de los adultos, aunque se han comunicado tasas de portación mayores del 60% en poblaciones cerradas.⁷¹¹ En general, los lactantes son colonizados alrededor de los 3 a 4 meses de edad y se mantienen así durante unos 4 meses con un serotipo dado; la incidencia máxima de colonización neumocócica ocurre a los 2 a 3 años cuando la tasa puede ser de hasta 40-60%.^{109,430} En los adultos, la colonización y la portación persisten desde 2 a 4 semanas, pero pueden mantenerse mucho más tiempo, y las tasas de portación entre los adultos suelen variar del 5% al 10%.³¹⁶ La duración de la portación disminuye con la edad y, por lo tanto, tiende a ser más prolongada en los niños que en los adultos. La colonización de los lactantes con neumococos se relaciona con la ausencia de anticuerpos anticapsulares específicos y los serotipos poco antigénicos que son frecuentes en este grupo etario.⁴³² La sensibilidad de las personas ancianas a la enfermedad neumocócica refleja el envejecimiento del sistema inmunitario y la producción disminuida ulterior de anticuerpos, junto con cambios generales en los niveles de actividad, los mecanismos de depuración mucociliar comprometidos, la desnutrición o el debilitamiento debido a otras enfermedades crónicas subyacentes, como diabetes y alcoholismo.¹⁴⁰

La mayoría de las infecciones graves por *S. pneumoniae* ocurren en lactantes menores de 3 años y en mayores de 65 años.^{686,711} Las tasas de ataque son cuatro a cinco veces mayores en los individuos de raza negra que en los de raza blanca.⁷⁸ Esta diferencia parece ser real, aunque otros factores (p. ej., acceso a la asistencia de salud, otras condiciones biológicas o ambientales subyacentes) pueden influir en estas tasas. Las tasas de ataque también son más altas entre las poblaciones de nativos de Alaska, las poblaciones de indígenas nativos de los Estados Unidos y los aborígenes australianos.^{256,964} Los pacientes con afecciones subyacentes que suprimen distintos mecanismos de defensa del huésped como hipogammaglobulinemia, deficiencias de los componentes del complemento y drepanocitosis, corren un riesgo mayor de enfermedad neumocócica invasiva.^{5,431,1068} Las personas que tienen asplenia funcional o aquellas que han sufrido esplenectomías quirúrgicas están expuestas a un riesgo particularmente alto de desarrollar una bacteriemia neumocócica invasora y a menudo mortal.⁹³⁴ Entre los niños, las infecciones suelen asociarse con los serotipos 6, 14, 18, 19 y 23. En un estudio pediátrico de 15 años de duración llevado a cabo en Birmingham, Alabama, estos serotipos fueron responsables del 70% de los casos de meningitis y bacteriemia.^{432,745} Entre los adultos, predominan los serotipos 1, 3, 4, 7, 8 y 12.

En el huésped apropiado, *S. pneumoniae* gana acceso a los espacios alveolares por la aspiración o inhalación y finalmente puede producir neumonía lobular, con consolidación y bacteriemia.⁷¹¹ Los trastornos que se reconocen por predisponer a los adultos a la enfermedad neumocócica son enfermedad broncopulmonar subyacente y compromiso de la inmunidad humoral.¹⁴⁰ Los trastornos que deterioran la respuesta inmunitaria humoral (p. ej., mieloma, linfoma, leucemia linfocítica crónica, cirrosis hepática, deficiencias de los componentes del complemento) probablemente tengan la influencia máxima sobre la sensibilidad individual a la infección neumocócica. La incidencia y la gravedad de la enfermedad neumocócica también están aumentadas en los individuos con defectos en los mecanismos de depuración de las vías respiratorias altas,

como los fumadores y los individuos con asma, bronquitis crónica, EPOC o carcinoma broncogénico y epidermoide del pulmón. Las infecciones respiratorias virales también predisponen a la infección neumocócica del aparato respiratorio porque estos agentes dañan los mecanismos de depuración bronquial. El inicio de la neumonía neumocócica es casi siempre brusco, aun en los pacientes en los que una infección viral respiratoria previa es el principal factor predisponente. En los niños mayores y los adultos jóvenes, los síntomas incluyen escalofríos, seguidos de fiebre sostenida, tos y producción de esputo purulento y a menudo hemoptoico. En los pacientes ancianos, la infección puede presentarse en forma insidiosa en varios días.⁶³¹ Los síntomas pueden variar desde una tos mínima, con disminución real de la temperatura, hasta una presentación fulminante, que conduce rápidamente al shock y la muerte. Los hemocultivos son positivos en el 20-30% de los pacientes con neumonía neumocócica. En general, los adultos mayores tienen otros trastornos que los colocan en mayor riesgo de enfermedad grave, como neoplasias, alcoholismo, cardiopatía, EPOC y diabetes.^{658,711} Las radiografías de tórax de los pacientes con neumonía neumocócica demuestran consolidación lobular en un 40-50% y el resto muestra un patrón bronconeumónico focal. Los infiltrados debidos a enfermedad neumocócica tienden a ser unilaterales y afectan los alvéolos, más que los bronquiólos y los tejidos intersticiales. Las complicaciones de la neumonía neumocócica son absceso pulmonar, infecciones pericárdicas, empiema, derrames pleurales y endocarditis.^{134,1086} Los derrames y los empiemas pleurales se pueden visualizar en las radiografías de tórax, pero se delinean mejor mediante tomografía computarizada (TC) y ecografía.¹³⁴ Si las colecciones líquidas son lo suficientemente grandes, puede ser necesario un drenaje a través de la colocación de un tubo de toracostomía para lograr la curación, junto con la antibioticoterapia. Las TC y la ecografía son útiles para el diagnóstico de las neumonías necrosantes y los abscesos pulmonares profundos debidos a *S. pneumoniae*. La tasa de mortalidad de la neumonía neumocócica es de un 5%, pero puede aproximarse al 20-30% cuando se acompaña por bacteriemia. La bacteriemia neumocócica sin afectación pulmonar es una entidad que ocurre en huéspedes inmunológicamente deprimidos. Las enfermedades o los trastornos subyacentes que predisponen a los pacientes a la bacteriemia neumocócica recurrente o recidivante son esplenectomía, leucemia mieloide aguda, trasplante de médula ósea, drepanocitosis, infección por HIV y síndrome de intestino corto.^{395,404,589,743,803,808,1068}

S. pneumoniae también es una causa importante de bacteriemia y sepsis tanto en niños como en adultos. En niños por otra parte sanos que tienen bacteriemia, alrededor del 25% se asocian con una otitis media neumocócica coexistente, el 30-40% están ligados a neumonía o infecciones neumocócicas focales y el resto no tiene ningún foco identificable.^{246,431,745} Por otra parte, más del 90% de las bacteriemias en los adultos son el resultado de una neumonía.⁵ Como ya se mencionó, otros trastornos comórbidos —asplenia, neoplasias, drepanocitosis e infección por HIV— contribuyen al desarrollo de bacteriemia y también afectan la respuesta final a los antibióticos y al tratamiento de sostén. Aunque la mortalidad para la bacteriemia neumocócica y la sepsis es bastante baja en los niños, en los adultos se aproximan al 35-40%. *S. pneumoniae* también ha surgido como causa importante de enfermedad en pacientes infectados por HIV.⁸⁰³ Estas infecciones tienden a ocurrir al comienzo de la evolución de la infección por HIV (a menudo antes de que se haya considerado incluso un diagnóstico de ésta), son extraordinariamente graves, y pueden tener presenta-

ciones clínicas inusuales junto con la bacteriemia.⁷⁷⁰ Rodríguez-Barradas informó cinco casos de infecciones neumocócicas graves en pacientes infectados por HIV; las presentaciones incluyeron neumonía con derrames pleurales recurrentes, pío-neumotórax complicado por una fístula broncopleural, púrpura fulminante con gangrena periférica de las extremidades, mediastinitis neumocócica con infección adyacente de los tejidos blandos de la pared torácica y absceso encefálico neumocócico.⁸¹⁹

S. pneumoniae también es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en adultos; con el uso creciente de las vacunas conjugadas de *H. influenzae* tipo b, el neumococo es el agente actual más frecuente en lactantes y niños pequeños.⁷¹¹ En los adultos, el neumococo representa alrededor de un tercio de las meningitis extrahospitalarias en los Estados Unidos y tiene una mortalidad asociada del 20-25%.³⁰⁴ En general, la meningitis por *S. pneumoniae* ocurre como resultado de la siembra de las meninges durante la bacteriemia, y los microorganismos probablemente entran a través del plexo coroideo. Los síntomas de presentación en alrededor del 60-70% de los adultos son fiebre, rigidez de la nuca y cambios del sensorio.⁹⁷³ En los lactantes, llanto, irritabilidad, malestar general, alimentación insuficiente, vómitos y convulsiones pueden dominar el cuadro clínico; se desarrolla un abombamiento de la fontanela sólo en un tercio de estos niños. En ancianos, en inmunocompromidos o en ambos, la presentación puede ser insidiosa y la norma es la somnolencia, la obnubilación y poca fiebre o ninguna. Sin embargo, puede ocurrir una meningitis, junto con el shock séptico mortal en pacientes que están profundamente inmunosuprimidos (p. ej., pacientes que han sufrido trasplante de médula ósea).⁴⁴⁹ *S. pneumoniae* también es la causa principal de meningitis luego de las fracturas de cráneo. El traumatismo de cráneo que produce una fractura de la base con pérdida de LCR interrumpe la integridad de la duramadre y puede permitir la entrada directa de microorganismos en el SNC desde un sitio adyacente de infección (p. ej., sinusitis, mastoiditis, otitis media).⁷¹¹

En la población pediátrica, *S. pneumoniae* representa el 40-50% de los casos de otitis media aguda y se ha asociado con sinusitis y mastoiditis.^{105,577} En los pacientes con otitis media, la membrana timpánica aparece inflamada, inmóvil y abombada en el examen con un otoscopio. Las complicaciones de la otitis media neumocócica aguda son perforación de la membrana timpánica, mastoiditis, parálisis del nervio facial, bacteriemia y artritis séptica.⁵⁸⁶ Es mejor obtener muestras para el diagnóstico a través de una miringotomía o timpanocentesis. Los neumococos, junto con *H. influenzae*, también son responsables de un 70% de las infecciones sinusales agudas y subagudas.

S. pneumoniae es una causa infrecuente de endocarditis, pericarditis, osteomielitis, artritis séptica, peritonitis, infecciones pelvianas agudas, infecciones neonatales e infecciones de piel/tejidos blandos. La mayoría de los pacientes tienen enfermedad subyacente, como diabetes, neoplasias, alcoholismo, lupus eritematoso sistémico o infección por HIV y otros focos de enfermedad neumocócica, como meningitis o neumonía. Las neumonías representan menos del 3% de los casos de endocarditis bacteriana y el 3-7% de todos los casos de endocarditis pediátrica.⁴⁰³ La endocarditis neumocócica sigue un curso agudo, se asocia con destrucción valvular y formación de abscesos perivalvulares aórticos y tiene una tasa de mortalidad de alrededor del 24% hasta más del 50%.^{391,615,783,893} El tratamiento de la endocarditis neumocócica con terapia farmacológicamente sola se asocia con malos resultados. En general, los

pacientes tienen cardiopatía preexistente y, en un estudio de endocarditis neumocócica en niños, la cardiopatía congénita fue el único factor de riesgo identificable.¹⁸⁶ La peritonitis primaria causada por los neumococos se observaba en otra época con frecuencia en los niños en asociación con síndrome nefrótico, pero en la actualidad ocurre sobre todo en adultos con cirrosis y otras hepatopatías junto con bacilos gramnegativos entéricos. La osteomielitis y la artritis séptica causadas por *S. pneumoniae* ocurren a menudo en niños con drepanocitosis.⁹⁴² En los adultos, la artritis séptica neumocócica suele ocurrir en pacientes con bacteriemia y afecta más de una articulación en alrededor de un tercio de los pacientes.⁸²⁵ La mayoría de los casos pueden ser manejados con cobertura antibiótica apropiada y artrocentesis. En algunas mujeres, *S. pneumoniae* puede formar parte transitoria de la flora vaginal, y pueden ocurrir infecciones pelvianas, obstétricas y ginecológicas, sobre todo con trastornos subyacentes como la presencia de un dispositivo intrauterino o la cirugía ginecológica reciente.^{303,1043} Los abscesos tuboováricos debidos a *S. pneumoniae* también pueden ser una fuente de infecciones peritoneales neumocócicas.⁸⁹⁷ Se han comunicado infecciones neumocócicas neonatales que representan el 1-11% de los casos de sepsis neonatal.⁴⁸⁸ Estos niños presentan meningitis, bacteriemia, neumonía, artritis/osteomielitis séptica u otitis media, casi siempre han nacido a término, y tienen 2 a 3 semanas de vida en el momento de la presentación. La fuente probable de infección es el aparato genital de la madre. *S. pneumoniae* también ha sido reconocido como causa importante de infecciones de los tejidos blandos, que incluyen celulitis facial y periorbitaria, fascitis, rabdomiólisis y abscesos.^{104,428,603,758,765,771,786,914,920} Estas infecciones ocurren en huéspedes con trastornos subyacentes, como lupus eritematoso sistémico, enfermedad renal en estadio terminal, artritis reumatoide, diabetes tipo 2 o infección por HIV. Algunos investigadores también han observado una asociación con las colagenopatías.²⁸⁷

Una preocupación importante con respecto a *S. pneumoniae* es la aparición de resistencia a los antibióticos, sobre todo a la penicilina.^{33,153,579} Los neumococos con resistencia disminuida a la penicilina fueron comunicados inicialmente en la década de 1960. Durante las décadas de 1970 y 1980, la resistencia a la penicilina entre las cepas de *S. pneumoniae* era rara en los Estados Unidos y sólo el 0.2% eran resistentes. Sin embargo, a mediados de la década de 1990, el 35% de la totalidad de los aislamientos neumocócicos de los Estados Unidos mostraron una menor sensibilidad a la penicilina.^{9,867} Algunos estudios más recientes entre poblaciones del sistema de vigilancia nacional de los CDC indican que la menor sensibilidad a la penicilina de las cepas de *S. pneumoniae* varía del 15% al 35%, según la región geográfica.¹⁰⁵⁶ Entre 10 103 cepas extrahospitalarias de *S. pneumoniae* aisladas en muestras respiratorias durante 2000-2001 en 206 centros de 154 regiones de los Estados Unidos, el 38.9% mostraron menor sensibilidad a la penicilina.²⁹¹ Esto también se documentó en cepas foráneas de *S. pneumoniae*. En un estudio de 2003, el porcentaje de cepas con menor sensibilidad a la penicilina fue del 6.5% en el Reino Unido, el 9.1% en Alemania, el 12.4% en Italia, el 36.4% en Grecia, el 54.5% en España y el 56.7% en Francia.⁵⁴⁵ La resistencia a la penicilina de *S. pneumoniae* se asocia con una alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBP) que tienen menor afinidad para fijar la penicilina a la pared de la célula bacteriana.⁵²⁷ Las PBP son en realidad enzimas transpeptidasa que participan en la síntesis de peptidoglucanos y se han identificado seis PBP —designadas 1A, 1B, 2A, 2B, 2X y 3— en *S. pneumoniae*. Las mutaciones en los genes que codifican PBP

2B explican la resistencia de bajo nivel a la penicilina, mientras que las mutaciones en el gen para PBP 2X se asocian con resistencia de alto nivel a la penicilina.^{903,904} Se considera que las cepas con CIM de penicilina de 0,06 µg/mL o menor son sensibles, las que tienen una CIM de 0,1 a 1 µg/mL tienen resistencia intermedia (y tienen una sensibilidad disminuida a la penicilina) y aquellas con CIM mayores de 1 µg/mL son resistentes.⁵²⁶ Las cepas que tienen una resistencia a la penicilina de alto nivel presentan una CIM de penicilina ≥ 2 µg/mL. Las cepas de *S. pneumoniae* que muestran menor sensibilidad o resistencia franca a la penicilina G también son menos sensibles a otras penicilinas y cefalosporinas de todas las generaciones, y se han comunicado fracasos terapéuticos para las infecciones neumocócicas graves con agentes que antes eran útiles como cefotaxima, cefuroxima y ceftriaxona.^{153,162,526,542} Además de las penicilinas y las cefalosporinas, se informó una resistencia simultánea de los neumococos a otros antibióticos, como macrólidos, sulfamidas y tetraciclinas.^{293,294,546,1056} En un estudio internacional publicado en 2004, la resistencia a los macrólidos fue máxima entre las cepas de *S. pneumoniae* en Asia (51,7% de resistencia), seguida de Europa (26% de resistencia), Estados Unidos (21,6% de resistencia), Medio Oriente (13,7% de resistencia), Pacífico Sur (10,6% de resistencia) y África (10% de resistencia).¹¹⁹ Se ha desarrollado una tendencia particularmente alarmante de resistencia neumocócica a los agentes antibióticos fluoroquinolonas.^{415,1056} En el capítulo 15 se presenta más información relacionada con la sensibilidad a los antibióticos de *S. pneumoniae* y los métodos para evaluarla.

Estreptococos viridans

El grupo viridans incluye varias especies de estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos, la mayoría de los cuales constituyen parte de la flora normal de las vías respiratorias altas y del aparato urogenital.³⁷⁶ Los estreptococos viridans causan el 30-40% de los casos de endocarditis bacteriana subaguda, lo que conduce a su aislamiento de múltiples conjuntos de hemocultivos.¹⁰²⁷ La endocarditis por estreptococos viridans ocurre principalmente en individuos con enfermedad preexistente de las válvulas nativas; también puede asociarse con infección de válvulas protésicas. Esta endocarditis se presenta de forma insidiosa, y la fiebre, la fatiga y la pérdida de peso son los hallazgos más frecuentes. También se presentan a menudo soplos cardíacos, estigmas periféricos de endocarditis (p. ej., hemorragias lineales subungueales y conjuntivales, petequias) y vegetaciones en los ecocardiogramas. Las complicaciones incluyen enfermedad multivalvular, aneurismas de la válvula mitral, abscesos paravalvulares y glomerulonefritis asociadas con inmunocomplejos circulantes.^{746,799} En un estudio reciente de 77 pacientes con endocarditis, el 18% tenía afectación de múltiples válvulas y el 36% de estas infecciones se debieron a estreptococos viridans.⁵⁷³ La identificación sistemática de las especies de estreptococos viridans asociadas con endocarditis bacteriana subaguda indican que *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. vestibularis* y *S. sinensis*, una nueva especie α -hemolítica, son los estreptococos viridans que con más frecuencia producen endocarditis.^{301,302,523,622,1027,1071} La orofaringe es la fuente probable de bacterias en la mayoría de estas infecciones; a menudo se observa mala higiene bucal y enfermedad periodontal en estos pacientes. Otros procedimientos, como sigmoidoscopia de fibra óptica y endoscopia gastrointestinal superior, también pueden pro-

vocar bacteriemia transitoria que puede infectar válvulas cardíacas ya dañadas.^{695,727} Algunas comunicaciones recientes de endocarditis debidas a estreptococos viridans resistentes a la penicilina han ocurrido en pacientes que recibieron profilaxis con penicilina para procedimientos dentales.^{450,500}

Aunque las bacteriemias transitorias por estos microorganismos suelen resolverse en el huésped normal sin ninguna secuela adversa, se ha reconocido como entidad clínica distinta la bacteriemia prolongada por estreptococos viridans, sobre todo en pacientes pediátricos y adultos neutropénicos que se someten a quimioterapia oncológica.^{12,107,108,253,752,974,1096} En estos enfermos, la bacteriemia se asocia con la quimioterapia citotóxica agresiva administrada para el tratamiento de leucemias, linfomas o tumores sólidos y para el trasplante de médula ósea.^{12,43,138,921} Los factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia por estreptococos viridans en estos pacientes inmunodeprimidos son la administración de dosis altas de agentes citotóxicos (p. ej., citarabina), la presencia de ulceraciones mucosas bucales secundarias a la quimioterapia citotóxica o radiación, la ausencia de antibioticoterapia previa y la neutropenia grave.^{12,108,752} La mucositis bucal probablemente sirve como puerta de entrada para estos microorganismos en el torrente circulatorio.²⁵³ Al respecto, la mala salud dental subyacente y la enfermedad periodontal son factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia por estreptococos viridans en los huéspedes neutropénicos.⁴²⁶ Algunos antibióticos utilizados para profilaxis en estos enfermos también se asocian con bacteriemia por estreptococos viridans. En un estudio de 38 niños con neutropenia, el 60% estaba recibiendo trimetoprim-sulfametoxazol profiláctico en el momento de que el primer hemocultivo se volvió positivo.¹² También se ha identificado el uso profiláctico de fluoroquinolonas como factor de riesgo de bacteriemia en pacientes con leucemia mieloide aguda.⁷⁶⁹ En estos pacientes, la bacteriemia por estreptococos viridans puede complicarse por el desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), hipotensión, shock y endocarditis bacteriana.^{12,107,108,741} Las especies de estreptococos viridans asociadas con bacteriemia neutropénica son *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* y *S. sanguis*.^{12,70,107,108,138,921} También se han comunicado infecciones bacteriémicas por estreptococos viridans en recién nacidos de término y de pretérmino de bajo peso al nacer.² Las madres de estos recién nacidos suelen tener varios factores de riesgo que afectan adversamente el pronóstico del embarazo, como corioamnionitis, rotura prematura de membranas, inicio prematuro del trabajo de parto e infección urinaria en el momento del parto.

Los estreptococos viridans también pueden ser aislados en raras ocasiones en otras infecciones graves, como meningitis y neumonía, sobre todo en huéspedes inmunodeprimidos. La meningitis causada por estreptococos viridans puede ocurrir tanto en adultos como en niños, y la presentación clínica difiere poco de la de otras meningitis piógenas (rigidez de la nuca, convulsiones, inflamación meníngea y alteración del sensorio).^{244,636} En general, el origen del microorganismo es endógeno; las anomalías estructurales congénitas de cabeza y cuello, las infecciones de cabeza y cuello, la endocarditis, las infecciones extracraneales y el traumatismo de cráneo o los procedimientos neuroquirúrgicos previos (p. ej., craneotomía) se han asociado con el desarrollo de meningitis, pero es posible que los orígenes definidos de la infección no estén señalados hasta en un tercio de los pacientes.⁵⁸⁵ Se ha documentado meningitis recurrente por estreptococos viridans en niños con anomalías estructurales del oído interno y los senos mastoideos.⁶⁸⁴ Las complicaciones de la meningitis incluyen supuración intracra-

neal y vasculitis cerebral.⁶³⁶ También se ha comunicado meningitis y bacteriemia causadas por *S. mitis* y *S. salivarius* luego de punción lumbar, endoscopia digestiva alta y cauterización por hemorragia gástrica.^{156,1085} Asimismo, se informó una meningitis recurrente por *S. sanguinis* en un varón de 15 años con una derivación ventriculoperitoneal.¹⁶ Colville y cols. informaron el primer caso de meningitis causado por *S. oralis* en una niña saludable de 12 años luego de la extracción de un diente canino decíduo como parte de su tratamiento ortodóntico.²²⁹ Se aisló *S. salivarius* como causa de meningitis en una mujer de 73 años antes sana en la que luego se descubrió que tenía un adenocarcinoma colónico asintomático, lo que sugirió una asociación de esta especie “similar a *S. bovis*” con una enfermedad neoplásica oculta.⁶¹⁷ Otras infecciones del SNC, como absceso encefálico pueden ocurrir luego de un traumatismo o cirugía de cráneo, o pueden ser secundarias a un foco primario de infección en otro sitio a través de la extensión directa desde un sitio contiguo o a través de la vía hematogena.^{237,637} Puede ocurrir una extensión directa desde infecciones odontológicas (p. ej., abscesos radiculares, periodontitis), infecciones de los senos paranasales o fuentes óticas.⁶³⁷ En general, los abscesos óticos son únicos, se localizan en los lóbulos frontales o temporales, y pueden ser polimicrobianos. Los trastornos predisponentes para el absceso encefálico por estreptococos viridans son insuficiencia cardíaca congestiva, otitis media crónica, traumatismos de cráneo con rinorrea de LCR, sinusotomía y craneotomía seguida de la colocación de una derivación ventriculoperitoneal.⁹³⁵

También se ha comunicado una neumonía bacteriémica por estreptococos viridans, pero es rara. Marrie informó sobre siete pacientes con neumonía extrahospitalaria por estreptococos viridans.⁶⁵⁷ Todos los pacientes eran de edad más avanzada (49 a 80 años), tenían varios trastornos predisponentes (incluidos alcoholismo, carcinoma de pulmón resecado, hipotiroidismo y diabetes mellitus) y estaban bacteriémicos. Las cepas de estreptococos viridans de tres pacientes fueron *S. mitis*, *S. sanguis* y *S. intermedius*. Sarker y cols. comunicaron tres casos de neumonía extrahospitalaria por estreptococos viridans con hemocultivos positivos simultáneos en adultos antes sanos.⁸⁴³ Se presenta neumonía por estreptococos viridans en pacientes de edad avanzada en el caso de una aspiración orofaríngea.⁹⁵⁴ Las complicaciones de la neumonía, como empiema y abscesos pulmonares asociados con neumonía por estreptococos viridans, son entidades clínicas relativamente raras.^{158,535} Diversas infecciones provocadas por distintas especies de estreptococos viridans han incluido epiglotitis, artritis séptica, osteomielitis vertebral secundaria a bacteriemia/endocarditis, pericarditis, síndrome de Lemierre y queratitis cristalina infecciosa.^{117,309,512,611,676,969,980} En 2003, se comunicó un brote de un síndrome de shock tóxico en pacientes inmunocompetentes que residían en el delta del río YangZi en la provincia de Jiangsu, China.⁶³⁸ Este brote, que ocurrió durante 1990-1991, se debió a un clon de *S. mitis*. Con posterioridad se encontró este mismo clon, según los resultados de los patrones de electroforesis en gel de campo pulsado, en otros pacientes con el síndrome desde 1991 a 1995. Esta cepa producía una proteína de 34 kDa que era pirógena en ratones, mitógena en esplenocitos cultivados y aumentaba la sensibilidad de los conejos a una carga de endotoxina. La secuenciación de esta proteína mostró que no estaba relacionada con exotoxinas pirógenas conocidas producidas por estreptococos β -hemolíticos del grupo A y de otro tipo.

Algunos estreptococos viridans que habitan en la cavidad bucal han surgido como patógenos importantes asociados pre-

dominantemente con la iniciación y la patogenia de las caries dentales. *S. mutans*, *S. sobrinus* y otros miembros del “grupo mutans” de estreptococos bucales son capaces de producir enzimas denominadas **glucosiltransferasas**, que hidrolizan la sacarosa de la dieta (un disacárido de glucosa y fructosa) y conectan las porciones de glucosa entre sí en uniones α 1,6 y α 1,4 glucosídicas para formar glucanos insolubles.¹⁰⁸³ Estos glucanos permiten a los microorganismos adherirse a las superficies lisas de los dientes y forman la matriz de la placa dental. La fijación específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos adherentes e insolubles y la formación ulterior de ácidos conduce a la desmineralización del esmalte dental y a la iniciación de lesiones de caries.⁵⁰ Otros estreptococos bucales, como *S. sanguis*, *S. salivarius* y tal vez *S. gordonii*, también pueden sintetizar estos polisacáridos, pero sólo el “estreptococo mutans” muestra un aumento de la colonización bucal inducido por sacarosa.^{632,983,1009} Además, los estreptococos mutans parecen producir mayor cantidad de ácido a partir de hidratos de carbono que otras bacterias bucales orales porque pueden fermentar una amplia variedad de azúcares y toleran más el ácido que otros estreptococos bucales.^{465,632} Estos microorganismos sintetizan polisacáridos intracelulares que pueden ser metabolizados a ácido en ausencia de hidratos de carbono fermentables exógenos, lo que les permite producir cantidades importantes de ácido incluso “entre las comidas”.⁶³² Los estreptococos mutans integraban al principio una única especie —*S. mutans*— que estaba dividida en ocho serotipos designados “a” a “h” sobre la base de la especificidad serológica de los antígenos de hidratos de carbono de la pared celular. Luego, estos distintos serotipos fueron asignados a un estado de especies separadas.²⁴⁰ *S. mutans* (serotipos c, e y f) y *S. sobrinus* (serotipos d y g) son las especies que predominan en los seres humanos; la otra especie se encuentra en distintos animales.²⁴⁰ Los investigadores que se ocupan de la microbiología dental han implementado métodos moleculares de detección directa de *S. mutans* en muestras de placa y gingivales, y anticuerpos monoclonales contra *S. mutans* que utilizan junto con técnicas de inmunotransferencia de colonias para la identificación y el recuento de estos microorganismos en muestras de saliva y de placa dental.²⁷¹

Antes de la década de 1980, las especies de estreptococos viridans se describían por completo en función de sus características fenotípicas. El análisis mediante técnicas moleculares y genéticas y con series extensas de pruebas fenotípicas ha modificado considerablemente la taxonomía de estos microorganismos. Los principales cambios ocurridos como resultado de estos análisis incluyen descripciones enmendadas de especies bien reconocidas como *S. mitis* y *S. sanguis*, el descubrimiento y la descripción de varias especies bucales nuevas (p. ej., *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis*, *S. oralis*, *S. crista*, *S. sinensis* y *S. oligofermentans*), la división de los serotipos del grupo *S. mutans* en distintas especies y la reasignación taxonómica de “*Streptococcus*” viridans *S. morbillorum* como segunda especie en el género *Gemella*.^{240,456,568,571,958,1049,1052,1071} La frecuencia de algunas de las especies recién descritas en muestras clínicas no se conoce y se esperan otras investigaciones a medida que se disponga de métodos más fiables para su identificación en los laboratorios de microbiología clínica. Aunque se han comunicado en muestras humanas, *S. uberis* y *S. parauberis* se aíslan principalmente en animales; producen mastitis bovina.^{484,532,1059}

En el pasado, los estreptococos viridans eran sensibles a penicilina, ampicilina y a la mayoría de los otros antibióticos. Sin embargo, en las dos últimas décadas los estudios de sensi-

bilidad a los antibióticos han mostrado con claridad que está aumentando la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y otras clases de antibióticos, sobre todo entre las cepas de *S. mitis*. En 1992, Potgieter y cols. informaron la sensibilidad a los antibióticos de 211 estreptococos viridans aislados en hemocultivos.⁷⁸² Aunque todas las cepas fueron sensibles a cefotaxima, ceftriaxona, imipenem y vancomicina, el 38% era resistente a la penicilina (CIM, $\geq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$), el 41% era resistente a eritromicina y el 7% era resistente tanto a la eritromicina como a la tetraciclina. Cinco cepas de *S. mitis* eran resistentes a la penicilina (CIM, 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$) y también mostraban mayor resistencia (CIM, 64 a 128 $\mu\text{g/mL}$) o alto grado de resistencia (CIM ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$) a la gentamicina y la tobramicina. Kaufhold y Potgieter comunicaron sobre cuatro cepas de *S. mitis* aisladas en hemocultivos que eran resistentes a la penicilina (CIM, 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$); dos de éstas eran resistentes a la gentamicina (CIM, 128 $\mu\text{g/mL}$) y las otras dos mostraron alto grado de resistencia a la gentamicina (CIM, $> 1\,000$ $\mu\text{g/mL}$).⁵⁵⁶ En un estudio de 352 aislamientos de estreptococos viridans de 43 centros médicos de los Estados Unidos, el 13% mostró alto grado de resistencia a la penicilina (CIM, ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) y 43% tuvo una resistencia intermedia (CIM, 0,25-2,0 $\mu\text{g/mL}$) a la penicilina y *S. mitis* y *S. salivarius* comprendían las cepas altamente resistentes a la penicilina.²⁹² Asimismo, el 44% de 50 aislamientos hemáticos del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center era resistente a la penicilina.⁹⁷⁴ En 2001, Levy y cols. informaron sobre dos pacientes con endocarditis causada por cepas resistentes a la penicilina de *S. mitis* y *S. sanguinis*, respectivamente.⁶²² Ambas cepas también fueron resistentes a la ceftriaxona y sensibles a la clindamicina y la vancomicina. Un estudio publicado en 2004 de Finlandia observó que *S. mitis* constituía el 82% de los estreptococos viridans aislados en pacientes con neutropenia y que el 5% y el 4% de estas cepas mostraban resistencia a la penicilina (CIM, ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) y la cefotaxima (CIM, ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.⁶⁴⁵ Hasta la fecha, no se han descrito estreptococos viridans resistentes a la vancomicina.

Grupo anginoso: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*

Entre los estreptococos viridans, un grupo de microorganismos que ha tenido revisiones taxonómicas repetidas es el “grupo anginoso”, también conocido como “grupo *Streptococcus milleri*” en la literatura taxonómica británica. El grupo anginoso de estreptococos viridans corresponde a tres especies—*S. intermedius*, *S. constellatus* y *S. anginosus*—que forman colonias diminutas en medios de agar. Estos microorganismos pueden portar o no antígenos de grupo de Lancefield (grupo A, C, F o G) y pueden ser o no hemolíticos en agar sangre de carnero.¹⁰⁴⁶ La mayoría de las cepas de *S. anginosus* son no hemolíticas, mientras que más del 50% de las de *S. constellatus* pueden ser β -hemolíticas; las cepas de *S. intermedius* pocas veces son β -hemolíticas.^{521,1046,1050} Estos microorganismos forman parte de la flora orofaríngea humana y pueden ser cultivados en las fauces, la nasofaringe y las crestas gingivales. También se encuentran normalmente en el tubo digestivo y en la vagina. La virulencia de este grupo puede estar relacionada con la presencia de una cápsula en algunas cepas, la producción de una proteína inmunosupresora parcialmente caracterizada y la producción de distintas enzimas que degradan glucosaminoglucanos (p. ej., neuraminidasa, DNasa, condroitinsulfato polimerasa y hialuronidasa).^{34,74,492,524,834} Algunas cepas que perte-

necen al grupo anginoso también pueden fijar fibronectina y producir una actividad similar a la trombina.¹⁰⁵⁷ Además, algunos estudios in vitro han mostrado que los estreptococos del grupo anginoso inhiben la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares y son ingeridos por las células PMN más rápidamente que *S. aureus*; sin embargo, una vez ingeridos son destruidos más lentamente que éste.¹⁰²⁵ Las cepas de *S. intermedius* también producen una toxina similar a la leucocidina, denominada **intermediolisina**, que puede estar asociada con virulencia, aunque ni la toxina ni sus genes se encuentran en *S. constellatus* o *S. anginosus*.⁶⁴⁷ El estudio de cepas del grupo anginoso provenientes de la faringe humana ha conducido a la descripción de una nueva subespecie de *S. constellatus*—*S. constellatus* subespecie *pharyngys*—que expresa el hidrato de carbono del grupo C y se asocia con faringitis.¹⁰⁵¹ Además, recientemente se delinearon cinco “ribogrupos” rRNA 16S entre las cepas de *S. anginosus* que difieren algo en sus características fenotípicas y su potencial patológico.⁵²²

S. intermedius, *S. constellatus* y *S. anginosus* se reconocen por su tendencia a producir abscesos purulentos en tejidos profundos, bacteriemia, endocarditis e infecciones intraabdominales, pulmonares, del SNC y bucales.^{88,365,520} La bacteriemia por estos microorganismos suele ser atribuible a un foco de infección en otro sitio, y el tubo digestivo y las vías respiratorias altas son las fuentes más frecuentes. Los abscesos metastásicos supurados constituyen una complicación importante de la bacteriemia. Las cepas de *S. intermedius* y *S. constellatus* se asocian más a menudo con formación de abscesos que *S. anginosus*.¹⁹⁹ *S. constellatus* se aísla en infecciones odontógenas, pleuropulmonares e intraabdominales. *S. intermedius* también se aísla en infecciones pulmonares, pero se asocia más a menudo con abscesos de los tejidos blandos profundos, abscesos hepáticos e infecciones del SNC (p. ej., abscesos encefálicos).^{199,1048} *S. anginosus* a menudo participa en infecciones mixtas de origen gastrointestinal o genitourinario.^{411,1048} Además, estas bacterias son los agentes causales en el 8% a más del 30% de todas las infecciones cutáneas y subcutáneas, y pueden ocasionar infecciones graves de los tejidos blandos, sobre todo en pacientes con trastornos subyacentes, como diabetes mal controlada y consumo de drogas intravenosas.^{885,930} Al igual que otros estreptococos viridans, los del grupo anginoso causan bacteriemia en pacientes con neutropenia y enfermedades subyacentes que son tratados con regímenes citotóxicos, aunque también puede ocurrir una bacteriemia fulminante en individuos antes sanos.^{365,521} Los estreptococos del grupo anginoso se aíslan con poca frecuencia en pacientes con endocarditis.⁶¹⁴ Woo y cols. comunicaron seis casos de endocarditis del grupo anginoso entre 377 casos de endocarditis que ocurrieron en Hong Kong en un período de 5 años.¹⁰⁷³ Cinco pacientes tenían enfermedades subyacentes (cardiopatía reumática, cardiopatía isquémica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, taquicardia supraventricular) y uno era adicto a drogas intravenosas. Todas las cepas de estos pacientes fueron identificadas como *S. anginosus*.

En general, las infecciones pleuropulmonares y las infecciones de cabeza y cuello producidas por estreptococos del grupo anginoso ocurren como abscesos de flora mixta, que también sirven como fuentes para la diseminación hematológica. Las infecciones pulmonares a menudo son el resultado de la aspiración del contenido orofaríngeo, que conduce a neumonía. La neumonía puede complicarse por empiema y la formación de abscesos pulmonares.^{780,788} Los microorganismos del grupo anginoso residentes de la cavidad bucal pueden producir abscesos periodontales y periapicales y otras infecciones maxilo-

faciales supuradas.⁵¹ Fisher y Russell aislaron estreptococos del grupo anginoso en el 37% de 45 pacientes con abscesos periapicales dentoalveolares; todos salvo uno fueron *S. anginosus*.³⁶⁴ Los microorganismos de sitios dentales infectados, senos paranasales, tejidos blandos y regiones periamigdalinas pueden propagarse por extensión directa para afectar el cráneo, la órbita y los espacios de los tejidos profundos en el cuello y el SNC.^{455,1030} En consecuencia, se pueden aislar microorganismos del grupo anginoso en cultivo puro o mixto en casos de sinusitis crónica, abscesos encefálicos, abscesos submandibulares, líquido del oído medio o el oído interno, abscesos cervicales, abscesos epidurales y líquido de empiema subdural.^{282,478,504,1082}

Hasta el 40% de las infecciones asociadas con el grupo anginoso son intraabdominales que se desarrollan luego de una apendicectomía u otra cirugía o como resultado de la perforación colónica causada por un traumatismo u otras lesiones gastrointestinales (p. ej., carcinoma de colon). Las infecciones intraabdominales por estreptococos del grupo anginoso se asocian con peritonitis y formación de abscesos apendiculares, hepáticos, subfrénicos y pancreáticos.^{299,463} Al parecer, el traumatismo y la enfermedad de la mucosa intestinal facilitan la invasión del torrente circulatorio por los microorganismos. En general, en los abscesos intraabdominales se aíslan aerobios y anaerobios mixtos en cultivo y la evidencia proveniente de modelos animales sugiere que el potencial patogénico de estos estreptococos aumenta por el crecimiento sinérgico de bacterias anaerobias.⁸⁸⁷ Tresadern y cols. comunicaron sobre infecciones del grupo anginoso en 23 pacientes de cirugía general, muchos de los cuales se sometieron a procedimientos colorrectales, y arribaron a la conclusión de que el uso de antibióticos preoperatorios, como gentamicina y metronidazol, puede promover en realidad el surgimiento de estos microorganismos como patógenos en esta localización anatómica.⁹⁶² En ocasiones, se aíslan estreptococos del grupo anginoso en infecciones ginecológicas, obstétricas, urogenitales y neonatales, que incluyen abscesos pelvianos, carcinoma colorrectal, abscesos tuboováricos, infecciones intrauterinas y lesiones de los genitales externos.^{675,801}

En general, los miembros del grupo anginoso han sido considerados sensibles a distintos antibióticos, pero existen indicaciones de que su resistencia puede estar aumentando. En un examen realizado en 1999 de 180 cepas del grupo anginoso, 94,4%, 92,8%, 87,1%, 97,3% y 97,3% fueron sensibles a penicilina, ampicilina, cefuroxima, cefazolina y cefotaxima, respectivamente.⁶²⁶ En un examen más reciente de 44 cepas caracterizadas genotípicamente no se observó ningún caso de resistencia a la penicilina en 12 cepas de *S. intermedius*, 16 de *S. constellatus* y 16 de *S. anginosus*, aunque 4 mostraron menor sensibilidad a la penicilina y 4 tenían una sensibilidad intermedia a la ampicilina; todas fueron sensibles a la ceftriaxona.⁹⁶⁰ También está surgiendo resistencia a macrólidos-lincosamida-estreptogramina entre estos microorganismos. En el estudio de Limia y cols., el 17,7% al 18,3% de las 180 cepas evaluadas fueron resistentes a la eritromicina y la clindamicina, respectivamente.⁶²⁶ Algunos estudios de vigilancia de la sensibilidad a los antibióticos indican que puede hallarse resistencia a la eritromicina en el 3,2-17,7% de las cepas, según la localización geográfica y sólo se han observado ligeras diferencias en la resistencia a macrólidos-lincosamida-estreptogramina entre estas tres especies del grupo anginoso.^{525,960} El análisis genético de algunas cepas resistentes a macrólidos-lincosamida-estreptogramina ha documentado la presencia de los genes *erm*(B), *erm*(TR) y *mef*(A)-*mef*(E) que conducen a resistencia constitutiva a la eritromicina, resistencia inducible a la eritro-

micina y resistencia mediadas por la salida de macrólidos, respectivamente. Aun cuando la mayoría de las cepas del grupo anginoso son relativamente resistentes a los aminoglucósidos (es decir, gentamicina), habitualmente se puede demostrar sinergia con los β -lactámicos. Los microorganismos del grupo anginoso son sensibles a la vancomicina.⁶²⁶

Estreptococos del grupo D: el "complejo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*" y especies relacionadas

Los estreptococos del grupo D, que son comunes en la flora intestinal de los vertebrados, fueron identificados en un principio por sus características bioquímicas y antigénicas. Estos estreptococos tienen el antígeno ácido lipoteicoico del grupo D en sus paredes celulares. Algunas ex especies del grupo D son habitantes normales predominantes del tubo digestivo humano y fueron denominadas "enterococos", mientras que otras especies que tienen el antígeno D y forman sólo una pequeña parte de la flora entérica normal fueron denominadas "no enterococos". La consideración práctica que subyace en la división de estos microorganismos en dos grupos era que los enterococos suelen ser más resistentes a penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos que los estreptococos del grupo D no enterococos. La aplicación de técnicas de genética molecular durante mediados de la década de 1980 condujo a la división de los estreptococos del grupo D en dos grupos. Las especies de enterococos fueron colocadas en el género *Enterococcus*, mientras que las especies de no estreptococos se mantuvieron en el género *Streptococcus*.

Los estreptococos del grupo D no enterococos fueron designados *S. bovis* o *S. equinus* sobre la base de sus características fenotípicas y su origen. Las cepas de *S. bovis* fueron divididas en dos biotipos sobre la base de la fermentación del manitol: las cepas de *S. bovis* biotipo I siguieron siendo manitol positivas, mientras que las cepas biotipo II (o la variante *S. bovis*) eran manitol negativas. Las cepas biotipo II fueron divididas fenotípicamente sobre la base de la actividad de β -glucuronidasa (β -GUR): *S. bovis* biotipo II.1 eran β -GUR negativas, mientras que *S. bovis* biotipo II.2 eran β -GUR positivas. En 1984, Farrow y cols. delinearon seis grupos diferentes por homología de DNA entre los estreptococos del grupo D.³⁵¹ La cepa tipo *S. equinus* y las cepas *S. bovis* biotipo II.1 (manitol negativas, β -GUR negativas) del ganado pertenecían al grupo genómico 1. El grupo genómico 2 incluyó las cepas identificadas como *S. bovis* biotipo I (manitol positivas) y las aisladas en la sangre humana y en casos de endocarditis; estas cepas fueron reclasificadas luego como la nueva especie *S. gallolyticus*, porque también hidrolizaban el galato.⁷⁵⁰ El grupo 3 estaba formado por cepas manitol variable atípicas de *S. bovis* y *S. equinus*, mientras que el grupo 4 estaba formado por un conjunto heterogéneo de cepas con pruebas de hidrólisis de esculina positivas y negativas. Las cepas con DNA del grupo 4 fueron clasificadas como la nueva especie *Streptococcus infantarius*.¹²⁵ Con posterioridad, el análisis de *S. infantarius* definió dos subespecies dentro de este grupo: *S. infantarius* subespecie *infantarius* y *S. infantarius* subespecie *coli*.⁸⁵³ Los grupos 5 y 6 estaban formados por microorganismos clasificados actualmente como *Enterococcus saccharolyticus* y *Streptococcus alactolyticus*, respectivamente. Al mismo tiempo, se describieron otras dos cepas estreptocócicas nuevas relacionadas con el grupo de *S. bovis*: *S. macedonicus*, una especie α -hemolítica aislada originariamente en el queso griego y *S. waius*, una

especie α -hemolítica aislada en biopelículas de leche desnatada.^{366,970} Más tarde se observó que *S. waius* era idéntico a *S. macedonius*, de modo que se mantuvo el nombre de la especie como *S. macedonius*.⁶⁵¹ Asimismo, se halló que *S. caprinus* era una denominación tardía subjetiva equivalente de *S. gallolyticus*, por lo que se conservó el nombre *S. gallolyticus*.⁹⁰²

En 2001, Clarridge y cols. examinaron 22 cepas clínicas de *S. bovis* y las especies relacionadas descritas antes mediante métodos fenotípicos y genotípicos y sugirieron que las cepas *S. bovis* biotipo II.2 constituían una genespecie separada distinta de *S. bovis*, *S. gallolyticus* y *S. infantarius*.²⁰⁰ Como las secuencias de rRNA 16S de estas especies muestran una identidad del 97,1-99,8% entre ellas, se buscaron secuencias genéticas alternativas para discriminar genotípicamente entre estas especies estrechamente relacionadas. Para este fin, Poyart y cols. amplificaron y secuenciaron una porción interna del gen *sodA*, que codifica una superóxido dismutasa dependiente del manganeso, para crear una base de datos de acuerdo con las secuencias de *sodA* a fin de examinar estos microorganismos.⁷⁸⁴ A partir de estas secuencias, se delinearon cinco grupos correspondientes a cinco especies distintas. Tres de los cinco grupos correspondían a *S. equinus*, *S. gallolyticus* y *S. infantarius*. El cuarto grupo estaba formado por cepas identificadas fenotípicamente como *S. bovis* biotipo II.2 y el quinto grupo correspondía a cepas identificadas como *S. infantarius* subespecie *coli*. Estos investigadores propusieron que las cepas *S. bovis* biotipo II.2 fueran asignadas a la nueva especie, *S. pasteurianus* y que las cepas *S. infantarius* subespecie *coli* fueran renombradas *Streptococcus lutetiensis*.⁷⁸⁴

En 2003, se realizó una reevaluación de la taxonomía del grupo *S. bovis/S. equinus* en un esfuerzo por mejorar la diferenciación fisiológica entre estas especies y aclarar su ubicación filogenética.⁸⁵² Utilizando hibridación de DNA-DNA y análisis de secuencia de rRNA 16S, estos investigadores concluyeron que muchas de estas nuevas "especies" (p. ej., "*S. pasteurianus*", "*S. lutetiensis*") no mostraron suficiente divergencia entre las secuencias como para asignarlas a una especie separada. Como el nombre "*Streptococcus gallolyticus*" tenía un precedente taxonómico, Schlegel y cols. propusieron adoptar los nombres *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* y *S. gallolyticus* subespecie *macedonicus* para *S. bovis* biotipo I, *S. bovis* biotipo II.2 ("*S. pasteurianus*") y *S. macedonicus*, respectivamente. Además, algunos estudios de hibridación no apoyaron esta asignación de cepas de *S. infantarius* subespecie *coli* a la especie propuesta "*S. lutetiensis*", de modo que se propuso retener las dos subespecies *S. infantarius*. Si se aceptan las dos nomenclaturas propuestas, *S. bovis* I, *S. bovis* II.1 y *S. bovis* II.2 corresponden a *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus*, *S. infantarius* subespecie *coli* (*S. lutetiensis*) y *S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus* ("*S. pasteurianus*"), respectivamente.⁸⁵⁴ Estos estudios taxonómicos también establecieron que *S. bovis* y *S. equinus* constituyen la misma especie, lo que sugiere que las cepas de "*S. equinus*" aisladas en muestras clínicas humanas probablemente fueran mal interpretadas.^{325,401,854} Estos estudios confirmaron que *S. alactolyticus* y *S. intestinalis* también son idénticos.

S. bovis causa bacteriemia, meningitis y endocarditis de válvula nativa y de válvula protésica; el aislamiento de este microorganismo en la sangre también se asocia con carcinoma del colon.^{307,464,487,1021} En un estudio de 16 pacientes evaluables con endocarditis por *S. bovis*, 11 (69%) tenían tumores colónicos.³⁰⁷ Se observó *S. bovis* significativamente más en las heces de pacientes con cáncer colorrectal que en las de controles

sanos o en aquellos con pólipos intestinales benignos. Una investigación bacteriológica de pacientes con cáncer de colon y otras enfermedades intestinales mostró que el 56% de los pacientes con cáncer de colon tenían *S. bovis* en sus heces, en comparación con el 10% de los pacientes controles sin trastornos intestinales.⁵⁷⁸ Zarkin y cols. observaron que la bacteriemia por *S. bovis* también se asociaba con enfermedad y disfunción hepáticas.¹⁰⁹¹ En este estudio, el 58% de los pacientes con endocarditis por *S. bovis* y el 46% de aquellos con bacteriemia tenían enfermedad colónica; se observó enfermedad hepática en el 52% de los pacientes con endocarditis y en el 57% de aquellos con bacteriemia. Se observó tanto enfermedad colónica como hepática en el 27% de los pacientes en los que se desarrolló endocarditis. Gonzalez-Quintela y cols. también observaron que el 55% de 22 pacientes con bacteriemia por *S. bovis* tenían una hepatopatía subyacente, que incluía cirrosis e infección por hepatitis C.⁴¹² Wilson y otros también han comunicado una asociación entre endocarditis por *S. bovis* y enfermedades del colon distintas del carcinoma.^{464,1064} Entre 21 pacientes con endocarditis por *S. bovis*, el 62% tenía enfermedad colónica que no estaba limitada al carcinoma; el 24% tenía una enfermedad intestinal inflamatoria, el 14% tenía diverticulitis, el 10% tenía pólipos colónicos, el 10% tenía adenomas vellosos colónicos y el 5% tenía carcinoma colónico.¹⁰⁶⁴ También se ha observado una asociación entre infecciones diseminadas por *S. bovis* y colitis ulcerativa idiopática y enterocolitis crónica por radiación.^{528,700} Osada y cols. comunicaron un caso en el cual se aisló *S. bovis* en el empiema torácico de un paciente que se sometió a un tratamiento por cáncer de colon recurrente.⁷⁴⁹ Se ha postulado un mecanismo de que la enfermedad colónica subyacente o los cambios en la secreción hepática de bilis o inmunoglobulinas en la luz intestinal pueden promover el sobrecrecimiento de *S. bovis* y el movimiento de los microorganismos desde el intestino a la circulación venosa portal. La falla del sistema reticuloendotelial hepático afectado para contener a los microorganismos conduce a bacteriemia y endocarditis. Los pacientes con bacteriemia, endocarditis o meningitis por *S. bovis* se deben realizar una colonoscopia completa para detectar lesiones gastrointestinales ocultas.⁶⁵³

La bacteriemia y la diseminación hematogena de *S. bovis* pueden conducir a otras distintas presentaciones clínicas. A pesar de la asociación frecuente con el carcinoma de colon, se ha comunicado meningitis y bacteriemia por *S. bovis* en pacientes sin neoplasias subyacentes.^{356,389,792} Jain y cols. informaron de un caso habitual de meningitis por *S. bovis* en un paciente infectado por HIV, que también tenía colitis y hemorragia gastrointestinal graves secundarias a infección por *Strongyloides stercoralis*.⁵³⁰ Es posible que las ulceraciones mucosas producidas por la migración de estrongiloides haya permitido el acceso de *S. bovis* al torrente circulatorio. Algunos informes también han establecido *S. bovis* como causa ocasional de peritonitis bacteriana espontánea.^{319,1012} White y cols. comunicaron un caso de infección intraamniótica mortal de un feto de 24 semanas en el cual se aisló *S. bovis* en sangre y tejidos fetales maternos.¹⁰⁵⁴ En 2002, se comunicó el primer caso de bacteriemia por *S. bovis* debida a la colonización de la luz de un catéter venoso permanente en un paciente con enfermedad avanzada por HIV y hepatitis B; el paciente no tenía enfermedad gastrointestinal ni hepática y la bacteriemia se resolvió con la extracción del catéter.²⁸ Otras infecciones asociadas con *S. bovis* son neumonía, espondilodiscitis aguda, artritis séptica, absceso encefálico, peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua, osteomielitis ileal y vertebral e infección de artroplastia secundaria a bacteriemia en asociación con car-

cinoma del colon.^{327,471,618,659,716,773,1014,1067} La penicilina sigue siendo altamente activa contra la mayoría de las cepas de *S. bovis*, aunque se han comunicado cepas ocasionales relativamente resistentes a ella. Asimismo, la clindamicina también es activa contra la mayoría de las cepas, pero parece estar surgiendo resistencia a este agente.⁸⁹⁴

S. bovis también se encuentra en varias especies animales, en las cuales se lo suele considerar un habitante inofensivo del aparato digestivo. De hecho, la cepa tipo de *S. bovis* fue aislada originariamente en excrementos de vacas y difiere de las cepas clínicas humanas en varias pruebas fisiológicas.⁵⁸⁰ Algunas cepas parecen ser causas importantes de septicemia en las palomas.²⁶⁴ También se han aislado cepas similares a *S. bovis* en el tubo digestivo de cerdos y pollos identificadas como *S. alactolyticus*.³⁵¹ Algunos estudios quimiotaxonómicos con cepas de animales y de seres humanos también apoyan la literatura taxonómica más nueva, lo que indica que es más probable que *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus* esté más involucrado en infecciones humanas que *S. bovis sensu stricto*.²⁸¹

Streptococcus suis

Streptococcus suis merece especial atención debido a su valor taxonómico como patógeno importante de los cerdos y ocasional de los seres humanos. Las infecciones causadas por *S. suis* representan problemas sanitarios y económicos serios en países con industrias porcinas intensivas, como España, Australia, Alemania, Bélgica, Holanda y el Reino Unido. *S. suis* causa un amplio espectro de enfermedades graves en cerdos, como neumonía, meningitis, septicemia y artritis purulenta.⁴⁸³ En los lechones, las amígdalas y las vías nasales se colonizan entre las 5 y las 10 semanas de vida; las tasas de portación entre animales sanos pueden ser de hasta un 80%.³⁷ Algunos estudios realizados en Australia mostraron que más del 70% de los cerdos sacrificados para consumo humano en ese país eran portadores de *S. suis*.⁸¹⁶ En los animales infectados, *S. suis* produce inicialmente fiebre, anorexia y otros síntomas generales, y la afectación meníngea se manifiesta por el rápido inicio de convulsiones, parálisis y muerte.⁶⁴² Los microorganismos pueden aislarse fácilmente en los ventrículos cerebrales y en los ganglios linfáticos regionales de las vías respiratorias altas, aunque el aislamiento en tejido esplénico o hepático es infrecuente.⁴⁶⁸ Aunque la enfermedad de los cerdos en los Estados Unidos no es frecuente, se ha aislado *S. suis* en ganado porcino de Minnesota y Nebraska.³²⁹

Los primeros casos humanos de infección por *S. suis* fueron comunicados en 1968 en Dinamarca y, para 1989, se habían publicado 108 casos humanos. Las infecciones humanas aparecieron en Hong Kong, Holanda, Dinamarca, Gran Bretaña, Francia, Bélgica, Alemania y Suecia.^{917,947} El primer informe de infección humana en América del Norte fue de un caso de endocarditis por *S. suis* en un paciente de Canadá.⁹⁶⁵ Las infecciones humanas ocurren principalmente en personas que trabajan directamente con cerdos (p. ej., trabajadores de mataderos, granjeros de cerdos, inspectores de carnes, veterinarios) o en el procesamiento industrial y la elaboración de productos porcinos.^{137,1029} De hecho, algunos casos humanos comunicados en Hong Kong se han atribuido a la popularidad y el consumo de gran cantidad de cerdo en China.¹⁷⁹ Se cree que *S. suis* ingresa en el huésped por vía percutánea a través de cortes y abrasiones en la piel. También se ha propuesto el ingreso a través de la

nasofaringe y el tubo digestivo y la gastroenteritis aguda puede ser una manifestación destacada de la presentación séptica.⁶⁴⁹ Después de la infección, el inicio de la enfermedad es anunciado por un prodromo "similar a la gripe", seguido del rápido desarrollo de bacteriemia y meningitis.^{38,298,643} También puede ocurrir una bacteriemia fulminante sin meningitis.¹³⁷ La secuela más frecuente de la infección meníngea es el compromiso vestibulococlear que conduce a ataxia y mareos.²⁹⁸ A menudo se observa afectación del octavo nervio craneal, con hipoacusia unilateral o bilateral.⁸⁶² Las complicaciones son el resultado de la siembra de sitios distantes durante la bacteriemia y pueden incluir artritis, espondilodiscitis, endoftalmítis, peritonitis y neumonía.^{36,679,1013} También se han comunicado varios casos de endocarditis por *S. suis*.^{485,766,965}

Se han realizado en varios países algunos estudios sobre la sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *S. suis* tipo 2 y otros serotipos obtenidos de animales y seres humanos. En un estudio de 110 cepas de cerdos y 25 cepas de seres humanos llevado a cabo en Francia, casi todas fueron sensibles a penicilina, amoxicilina y gentamicina; los agentes menos activos fueron macrólidos, lincosamidas y doxiciclina.⁶⁵⁴ En una encuesta de 689 cepas porcinas realizada en Japón desde 1987 hasta 1996 se observó que las cepas de *S. suis* tipo 2 eran altamente sensibles a penicilinas, cefazolina, ofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol.⁵⁵³ Casi el 87% de las cepas fueron resistentes a las tetraciclinas y el 71.4% y el 29.5% lo fueron a kanamicina y estreptomina, respectivamente. Algunos estudios efectuados en cepas aisladas en Suecia y Dinamarca desde 1967 hasta 1981 y desde 1992 hasta 1997 comunicaron que todas eran sensibles a penicilina, ampicilina, vancomicina y trimetoprim. Entre las aisladas en Dinamarca desde 1992 hasta 1997, el 20.4% de las cepas de serotipo 2 y el 44.8% de las cepas de serotipo 7 fueron resistentes a los macrólidos (eritromicina, clindamicina).¹ También se observó resistencia a las tetraciclinas en el 43.9% de las cepas serotipo 2 y el 15.5% de las cepas serotipo 7 aisladas durante el mismo período. Menos del 5% de las cepas recogidas desde 1967 hasta 1981 fueron resistentes a estos agentes. De las muestras contemporáneas, el 15.4% de las cepas de serotipo 2 provenientes de Suecia, el 57.1% de las cepas de serotipo 2 provenientes de Dinamarca y el 91.4% de las cepas de serotipo 7 de Suecia fueron resistentes al sulfametoxazol. Se considera que la penicilina es el fármaco de elección para el tratamiento de la infección sistémica por *S. suis*. Sin embargo, se ha informado resistencia a la penicilina no mediada por β -lactamasas entre las cepas de *S. suis* de cerdos en España y en una cepa aislada en un caso de meningitis humana.^{787,862}

S. suis fue reconocido oficialmente como una especie de *Streptococcus* existente en 1987.⁵⁶⁹ Las cepas son agrupables con los antisueros de Lancefield en los grupos R, S, RS y T o son no agrupables.²⁷⁰ Algunas también reaccionan con antisero contra estreptococos del grupo D, lo que sugiere que tienen el antígeno lipoteicoico de ese grupo D. Por esta razón, al principio se creyó que era un *Streptococcus* del grupo D o una especie de *Enterococcus*. Esta observación no fue sustentada con técnicas moleculares y la reactividad con antisueros del grupo D se debe a reacciones cruzadas falsas entre los grupos D y R. Las cepas de *S. suis* también están encapsuladas y se describieron 35 serotipos capsulares diferentes, designados 1 a 35.^{421-423,482,767} *S. suis* de serotipo 1 produce meningitis en lechones menores de 6 semanas de vida. Este serotipo incluye cepas pertenecientes al grupo S de Lancefield. *S. suis* de serotipo capsular 2 también se asocia con enfermedad sistémica en cerdos de 3 a 20 semanas de vida y es el único serotipo del que se ha comunicado que produce enfermedad sistémica en los seres

humanos. En la serie de casos humanos comunicados en 1988 por Arends y Zanen en Holanda, 28 de las 30 cepas aisladas en infecciones humanas eran de serotipo capsular 2, una era de serotipo 4 y una era no tipificable.³⁸ Este serotipo comprende los estreptococos grupo R de Lancefield. Se pueden hallar otros serotipos que tienen los grupos RS de Lancefield (reaccionan con el antisuero R y con el antisuero S) y reactividad T tanto en cerdos asintomáticos como enfermos. Los serotipos pueden determinarse mediante aglutinación en portaobjetos, inmunodifusión o coaglutinación.⁴²⁰ A pesar de que la mayor parte de los casos de la enfermedad es causada por una pequeña cantidad de serotipos diferentes, el serotipo capsular no es predictor de virulencia. Varios métodos para determinar huellas digitales genómicas que incluyen electroforesis en gel de campo pulsado, ribotipificación, análisis de DNA polimorfo con amplificación aleatoria y tipificación de secuencias multilocus han demostrado una heterogeneidad genética considerable entre las cepas de *S. suis* pertenecientes al mismo serotipo capsular o a serotipos capsulares diferentes.^{177,178,576,798,1006} Los métodos de ribotipificación han podido identificar dos grupos principales entre las cepas de *S. suis* tipo 2 porcinas en Dinamarca.⁷⁹⁷ Las cepas de un grupo se asociaron con meningitis, mientras que las del segundo agrupamiento se asociaron con neumonía, sepsis y endocarditis. Las cepas de meningitis en el primer grupo fueron resistentes al sulfametoxazol, mientras que las del segundo fueron resistentes a la tetraciclina.

S. suis de serotipo 2 produce distintos factores que se asocian con virulencia, aunque la patogenia de la infección en los seres humanos y los animales es aún poco clara.⁴²⁵ La cápsula de las cepas serotipo 2 es un factor de virulencia compuesto por glucosa, galactosa, ramnosa, *N*-acetil-glucosamina y ácido siálico.⁹⁰⁶ El locus del gen *cps* de *S. suis* tipo 2 ha sido clonado, caracterizado y manipulado mediante mutagénesis insercional para producir mutantes carentes de cápsula.⁹⁰⁵ Estas cepas no encapsuladas fueron muy sensibles a la ingestión y la destrucción por los macrófagos alveolares del pulmón porcino in vitro y fueron avirulentas en cerdos sin gérmenes luego de una carga intranasal. *S. suis* también produce una citolisina/hemolisina que activa el tiol, forma poros y fija el colesterol denominada suilisina.⁵¹⁸ El gen para suilisina (*sly*) ha sido secuenciado y es estructuralmente similar a la neumolisina producida por *S. pneumoniae*.⁸⁷⁵ Esta hemolisina/citolisina es responsable de los efectos tóxicos directos sobre las células epiteliales.⁵⁹⁵ Los mutantes que carecen de suilisina fueron no hemolíticos, no citotóxicos para macrófagos cultivados y avirulentos en ratones cuando fueron inoculados a través de la vía intraperitoneal, pero sólo estaban ligeramente atenuados en un modelo porcino de infección sistémica.¹⁸ Utilizando técnicas de PCR, se observó el gen *sly* en más del 80% de las cepas asociadas con casos de meningitis, septicemia y artritis, y en más del 90% de las cepas provenientes de las amígdalas de cerdos sanos, pero sólo en el 44% de las cepas asociadas con neumonía porcina.⁵⁷⁵ Las cepas de tipo 2 encapsuladas también producen dos proteínas —proteína liberada por la muramidasa (MRP) y factor proteico extracelular (EF)— que se asocian con virulencia, pero su papel en la patogenia de la enfermedad no está claro, ya que los mutantes isogénicos que carecen de estas proteínas no se comportan en forma diferente de las cepas de tipo silvestre en modelos de infección en el ratón.^{425,918} Se describieron cuatro proteasas asociadas con células y extracelulares distintas en cepas de *S. suis* de tipo 2 virulentas.⁵⁴¹ Estas proteasas pueden funcionar para obtener nutrientes, para neutralizar los mecanismos de defensa del huésped y para ayudar a la invasión y la destrucción tisulares. Las cepas *S. suis* tipo 2 producen una

hemaglutinina adhesina de 18 kDa que se une a las porciones de galactosa y galactosa-*N*-acetilglucosamina, una proteína fijadora de albúmina de 39 kDa y también se ha descrito una proteína fijadora de IgG de 60 kDa. Como se ha observado esta adhesina tanto en cepas virulentas como avirulentas, su papel en la patogenia de esta enfermedad, si es que existe alguno, no está claro.^{77,424,793}

Otros estreptococos viridans aislados en animales

Se describieron otras varias "especies" de estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos en la literatura médica, veterinaria y taxonómica. Estas especies son *S. thoraltensis*, *S. hyovaginalis*, *S. hyointestinalis*, *S. pluranimalium*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. entericus*, *S. ovis*, *S. gallinaceus* y *S. minor*. *S. thoraltensis* y *S. hyovaginalis* son especies de estreptococos α -hemolíticos que se han aislado en el aparato genital de hembras porcinas, mientras que *S. hyointestinalis* se encuentra en el tubo digestivo porcino.^{278,279} *S. pluranimalium*, una nueva especie que se asemeja a las cepas de la ex especie *S. acidominimus* (véase más adelante), es una especie α -hemolítica que se encuentra en el aparato genital y las amígdalas del ganado vacuno, los tejidos amigdalinos de ovejas y felinos, y en el buche y el aparato respiratorio de los canarios.²⁸⁰ Esta especie también ha sido aislada en mastitis subclínica en el ganado vacuno. *S. uberis* y *S. parauberis* son causas de mastitis bovina y no han sido aisladas en seres humanos. Estas dos especies son indistinguibles entre sí utilizando criterios fenotípicos, y se han creado sondas moleculares específicas de especie para ambas. Cepas humanas identificadas fenotípicamente como *S. uberis* se han vuelto a identificar como *Globicatella sanguinis*.⁸⁰ *S. entericus* es un nuevo *Streptococcus* α -hemolítico que habita en el intestino bovino.¹⁰⁰⁵ *S. ovis* y *S. gallinaceus* son especies α -hemolíticas que han sido aisladas en infecciones (incluida la bacteriemia) en ovejas y pollos, respectivamente.^{216a,217} *S. minor* se describió en 2004 y ha sido aislado en las amígdalas, los hisopados anales y las heces de perros, y en las amígdalas de terneros y gatos.⁹⁸⁵

Emerococcus coleocola es un microorganismo similar a *Streptococcus* α -hemolítico que se aísla en el aparato reproductor de caballos.²²² Esta especie se encuentra más estrechamente relacionada con microorganismos similares a *Streptococcus* en los géneros *Abiotrophia*, *Ignavigranum*, *Facklamia* y *Globicatella*, que han sido aislados en muestras clínicas humanas.

Otros estreptococos

Las cepas de *S. acidominimus* han sido mal caracterizadas desde que se describiera la especie original en 1922.⁸⁰ El nuevo examen de las cepas aisladas en seres humanos estableció su verdadera identidad como *Facklamia sourekii*.²¹³ *S. thermophilus* y *S. macedonicus* se encuentran en quesos y otros productos lácteos. *S. thermophilus* está relacionado con *S. salivarius* y puede ser incorporado como subespecie de *S. salivarius* o ser una especie distinta.^{347,856} *S. macedonicus* ha sido reclasificado como *S. gallolyticus* subespecie *macedonicus*, que forma parte del complejo *S. bovis/S. equinus*. *S. caprinus* es un sinónimo subjetivo ulterior de *S. gallolyticus* y *S. intestinalis* es un sinónimo reciente de *S. alactolyticus*.^{902,989} Se observó que *S. difficile*

correspondía a cepas no hemolíticas de estreptococos del grupo B (*S. agalactiae*).⁹⁹⁰

Especies de *Enterococcus*

Taxonomía

El género *Enterococcus* incluye a los miembros enterococos ya clasificados con los estreptococos del grupo D.^{857,858} Estos microorganismos son residentes normales del tubo digestivo y las vías biliares y, en menor cantidad, de la vagina y la uretra masculina. Su importancia como causantes de enfermedades humanas es cada vez mayor, en gran parte debido a su resistencia a los antibióticos a los cuales otros estreptococos suelen ser sensibles. In vitro, los enterococos tienen CIM de penicilina que son 10 a 100 veces más altas que para otros estreptococos. Los enterococos constituyen la segunda causa en frecuencia de infecciones intrahospitalarias urinarias y de heridas y la tercera causa de bacteriemia intrahospitalaria.^{354,690} Debido a su resistencia a las penicilinas y a cefalosporinas de varias generaciones, la adquisición de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, y ahora el surgimiento de resistencia a la vancomicina, estas bacterias a menudo producen sobreinfecciones graves entre los pacientes que reciben tratamientos con antibióticos de amplio espectro.

La taxonomía de las especies de *Enterococcus* ha sufrido un cambio considerable desde mediados de la década de 1980. Antes del advenimiento y el uso amplio de las técnicas genéticas para el análisis taxonómico, los enterococos se distinguían de los estreptococos y de especies relacionadas por su capacidad para crecer a 10 °C y 45 °C, por su crecimiento en presencia de NaCl al 6,5%, por su crecimiento a un pH de 9,6, su capacidad para hidrolizar esculina en presencia de bilis al 40% y la producción de pirrolidónil arilamidasa (PYR). Más del 90% de las cepas también tenían el antígeno lipoteicoico del grupo D de Lancefield en las paredes celulares. Algunos estudios taxonómicos actuales han puesto en evidencia varias especies que son miembros del género *Enterococcus* por criterios genéticos, pero que carecen de muchas de las características fenotípicas típicas del género.¹⁰⁶¹ Por fortuna, la mayoría de estas especies no son comunes en muestras clínicas humanas. *E. faecalis* es la cepa más frecuente y está asociado con el 80-90% de las infecciones por enterococos humanos. *E. faecium* se ubica segundo y se aísla en 10-15% de las infecciones.⁸³³ Otras especies de enterococos, que incluyen *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. dispar*, *E. raffinosus* y *E. mundtii* se aíslan pocas veces en infecciones humanas (véase recuadro 13-4). Las especies restantes se encuentran fundamentalmente en el tubo digestivo de distintos animales y pocas veces, o nunca, se aíslan en infecciones humanas importantes (véase recuadro 13-4). En los últimos años, se han descrito varias especies nuevas de enterococos en fuentes clínicas humanas (*E. gilvus*, *E. pallens*, CDC PNS [por probable new species, probable especie nueva]-E1, CDC PNS-E2, CDC PNS-E3), animales (*E. canis*, *E. villorum* [igual que *E. porcinus*], *E. ratti*, *E. asini*, *E. phoeniculicola*) y el medioambiente (*E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*) (recuadro 13-4). Con ayuda de las técnicas de taxonomía molecular, se han vuelto a clasificar algunas ex especies de *Enterococcus* o se notó que son iguales a las ya reconocidas. Por ejemplo, se observó que *E. seriolicida* era idéntica a *Lactococcus garvieae*, *E. flavescens* era igual a *E. casseliflavus* y *E. solitarius* era idéntica a *Tetragenococcus*

halophilus.^{318,590,951,952,1061} Se verán de vez en cuando en la bibliografía informes de especies inusuales o infrecuentes de *Enterococcus* aisladas en infecciones humanas. En la era del huésped inmunodeprimido, el microbiólogo clínico debe conocer estas otras especies y los métodos para su identificación. En el recuadro 13-4 se describen los miembros del género *Enterococcus*.

Factores de virulencia

A diferencia de varias especies de estreptococos explicadas hasta ahora, no se conocen bien los factores que determinan la virulencia de los enterococos.^{536,703} Algunas cepas de *E. faecalis* producen una **citolisina/hemolisina** que actúa sobre los eritrocitos humanos, de conejos, equinos y bovinos (pero no sobre los eritrocitos de ovejas) y tiene una importante toxicidad demostrada en los modelos de endoftalmis y endocarditis en el conejo.^{188,537} La **sustancia de agregación** es una proteína de unión de superficie por plásmidos que promueve el agrupamiento de los microorganismos para facilitar el intercambio de los plásmidos.^{188,201} Esta sustancia también funciona facilitando la adherencia de los enterococos a células intestinales y epiteliales renales cultivadas y promueve el crecimiento de vegetaciones cardíacas en el modelo de endocarditis en el conejo.^{188,383,587} Otros estudios sugieren que la sustancia de agregación puede participar en la fijación de *E. faecalis* a los neutrófilos y las células epiteliales intestinales cultivadas y en la internalización ulterior y la supervivencia intracelular de estos microorganismos.^{742,795,998} Alrededor del 40% de las cepas de *E. faecalis* aisladas en sangre y en endocarditis producen una proteína de superficie singular denominada **Esp** ("**extracellular surface protein**", proteína de la superficie celular) que ayuda al microorganismo a evadir los anticuerpos por su capacidad para alejarse de la superficie celular.⁸⁸⁰ La mayoría de las cepas de *E. faecalis* y algunas de *E. faecium* en bacteriemias producen gran cantidad de superóxido extracelular que puede aumentar la virulencia de los enterococos en abscesos de flora mixta.⁵⁰⁵ Los ácidos lipoteicoicos constituyen el antígeno del grupo D de los enterococos y también puede funcionar en la virulencia al inducir la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón, lo que conduce a la modulación de la respuesta inmunitaria.⁹⁷¹ Por último, el 50-65% de las cepas de *E. faecalis* producen **cocolisina**, una metaloendopeptidasa extracelular, que puede desempeñar un papel en la virulencia al inactivar a la endotelina, un péptido vasoactivo.⁶⁵⁰

Importancia clínica

Las especies de *Enterococcus* causan infecciones urinarias complicadas, bacteriemia, endocarditis, infecciones intraabdominales y pelvianas, infecciones de heridas y tejidos blandos, sepsis neonatal y, pocas veces, meningitis.⁶⁹⁰ Las infecciones urinarias constituyen la infección enterocócica más frecuente e incluyen cistitis, pielonefritis, prostatitis, absceso perinéfrico e infecciones complicadas con bacteriemia. La mayoría de éstas son de origen intrahospitalario o se asocian con anomalías estructurales e instrumentación de las vías urinarias.^{699,850} En general, las bacteriemias enterocócicas son el resultado de la infección en otros sitios (p. ej., infecciones urinarias, de las vías biliares, gastrointestinales/genitourinarias) y más a menudo son intrahospitalarias. Los factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia son edad avanzada, inmunosupresión, enfermedades y trastornos subyacentes (p. ej., prematuridad, diabetes, neoplasias, insuficiencia cardíaca congestiva, insufi-

Recuadro 13-4 Miembros del género *Enterococcus*

GRUPO/Especie	Comentarios
GRUPO 1	
<i>E. avium</i> ²¹⁸	Aislado en el tubo digestivo de aves, perros y seres humanos; las cepas pueden portar tanto los antígenos hidratos de carbono grupo D como grupo Q de Lancefield; esta especie (y <i>E. malodoratus</i>) son las dos especies de enterococos que producen H ₂ S. <i>E. avium</i> ha sido aislado en casos de bacteriemia y osteomielitis. ^{238,258,435,682,759}
<i>E. gilvus</i> ⁹⁷⁹	Nueva especie descrita en 2002; fue aislada originariamente en una muestra de bilis de un paciente con colecistitis.
<i>E. malodoratus</i> ²¹⁸	Aislada de queso Gouda y productos lácteos no pasteurizados; el nombre significa "de mal olor"; también produce H ₂ S.
<i>E. pallens</i> ⁹⁷⁹	Nueva especie descrita en 2002; aislada en una muestra de líquido de diálisis peritoneal de un paciente en el cual se desarrolló peritonitis a partir del intestino perforado.
<i>E. pseudoavium</i> ²⁰⁷	Los estudios de relación genética y algunas características fenotípicas diferencian esta especie de <i>E. avium</i> ; cepa tipo aislada en un caso de mastitis bovina.
<i>E. raffinosus</i> ²⁰⁷	Originariamente se lo consideró relacionado con <i>E. avium</i> (junto con <i>E. solitarius</i> y <i>E. pseudoavium</i>); se lo denomina así por su capacidad para producir ácido a partir de rafinosa; se aísla en infecciones humanas, que incluyen hemocultivos, orina, abscesos y osteomielitis vertebral. ^{185,842}
<i>E. saccharolyticus</i> ⁸¹⁸	Originariamente se denominó <i>S. saccharolyticus</i> ; describía un grupo de cepas similares a <i>S. bovis</i> aisladas en vacas; el análisis genético mostró que este microorganismo está más estrechamente relacionado con los enterococos que con los estreptococos; tiene ciertas características fenotípicas similares a las especies de <i>Enterococcus</i> (p. ej., crecimiento a 10 °C y 45 °C, crecimiento en NaCl al 6.5%), pero no reacciona con antisueros de grupo D; se propuso pasar esta especie del grupo de <i>Streptococcus viridans</i> al género <i>Enterococcus</i> como <i>E. saccharolyticus</i> .
<i>Enterococcus</i> , especie CDC PNS-E-3 ¹⁶¹	"Nueva especie propuesta" de los CDC, aislada en tejido encefálico obtenido de un paciente de 11 meses en Honolulu, Hawai, en 2001.
GRUPO 2	
<i>E. faecalis</i>	Se aísla más frecuentemente en muestras clínicas humanas y en el tubo digestivo humano; también se encuentra en el tubo digestivo de aves de corral, ganado bovino, cerdos, perros, caballos, ovejas y cabras.
<i>E. faecium</i>	Se encuentra en muestras clínicas humanas; suele ser más resistente a los antibióticos que <i>E. faecalis</i> ; también se encuentra en el tubo digestivo de distintas especies de animales.
<i>E. casseliflavus</i> ²¹⁸	Se aísla en plantas, suelo y, pocas veces, en las heces de pollos; originariamente fue clasificado como una subespecie de <i>E. faecium</i> ; produce un pigmento amarillo y también es móvil. Este microorganismo es un agente oportunista en infecciones humanas y ha sido aislado en pacientes con bacteriemia. ^{754,779,807,832,999}
<i>E. gallinarum</i> ²¹⁸	Aislado en heces de pollos; originariamente fue clasificado como <i>Streptococcus gallinarum</i> "grupo D de pollos"; una de las dos especies móviles de <i>Enterococcus</i> ; también se ha aislado en una infección de un paciente en hemodiálisis, como causa de endocarditis de válvula nativa, y en hemocultivos. ^{254,807}
<i>E. mundtii</i> ²¹¹	Microorganismo inmóvil de pigmento amarillo; aislado en plantas, suelo y tubo digestivo de ganado bovino, cerdos y caballos; llamado así por J. O. Mundt, microbiólogo norteamericano. Esta especie ha sido aislada en un absceso humano en un muslo y en una muestra de mucosa sinusal obtenida quirúrgicamente. ⁵⁵⁴
<i>E. haemoperoxidus</i> ⁹³⁸	Nueva especie ambiental de enterococos descrita en 2001; aislada en aguas superficiales, piscinas y agua potable en la región del norte de Moravia en la República Checa.
<i>Enterococcus</i> , especie CDC PNS-E2 ¹⁶¹	"Nueva especie propuesta" de los CDC, aislada en hemocultivos de un paciente en Los Angeles en 1997.
GRUPO 3	
<i>E. dispar</i> ²²⁶	Especie de la que se creyó originariamente que era una variante bioquímica de <i>E. hirae</i> , pero el análisis de 16S rRNA indicó que es en realidad una especie antes no descrita; aislada en muestras humanas, incluidas heces y líquido sinovial. ²²⁶
<i>E. durans</i> ¹⁸	Esta especie se encuentra principalmente en la leche y en otros productos lácteos y es una cepa clínica rara. En 2004, <i>E. durans</i> fue aislado como causa de endocarditis de válvula nativa. ⁹²³
<i>E. hirae</i> ³⁴⁹	Produce detención del crecimiento en pollos; aislado en el buche y las heces de los pollos, y el tubo digestivo de ganado bovino, cerdos, perros, caballos, ovejas, cabras y conejos; la cepa tipo (<i>E. hirae</i> ATCC 8043) tiene requerimientos nutricionales complejos y es utilizada en la industria alimentaria como microorganismo de bioensayos para aminoácidos y vitaminas. <i>E. hirae</i> fue aislado en la sangre de un paciente de 49 años con enfermedad renal en estadio terminal que se había sometido a hemodiálisis. ³⁹⁹
<i>E. ratti</i> ⁹⁴⁹	Descrita en 2001, esta especie fue aislada originariamente en los intestinos y las heces de ratas con diarrea.
<i>E. villorum</i> ^{263,949,986}	Aislada en el tubo digestivo de perros; fenotípicamente idéntica a <i>E. porcinus</i> , que se considera un sinónimo menor de <i>E. villorum</i> y fue aislada originariamente en los intestinos y las heces de cerdos con diarrea.

ciencia renal, infecciones profundas), instrumentación gastrointestinal, genitourinaria o del aparato respiratorio previa, hospitalización prolongada y el uso de antibióticos de amplio

espectro que tienen poca o ninguna actividad antienterocócica (p. ej., cefalosporinas).^{427,443,1028} En general, los microorganismos acceden al torrente circulatorio a través de las vías urina-

Recuadro 13-4 Miembros del género *Enterococcus* (cont.)

GRUPO/Especie	Comentarios
GRUPO 4	
<i>E. avium</i> ¹⁷⁷	Descrita en 1998, esta especie se encuentra en el ciego de burros; más estrechamente relacionada con <i>E. avium</i> , <i>E. pseudoavium</i> y <i>E. faecium</i> .
<i>E. cecorum</i> ²⁹⁸	Especie de estreptococo recientemente reclasificada hallada en los intestinos de pollos; carece del antígeno grupo D, es PYR-negativa y es incapaz de crecer en caldo de NaCl al 6,5%; similar a <i>E. columbae</i> , puede ser confundido con <i>E. avium</i> y con <i>S. bovis</i> . ^{274,276,1060} <i>E. cecorum</i> ha sido aislado como causa de peritonitis asociada con la diálisis peritoneal, peritonitis bacteriémica recurrente y peritonitis bacteriana espontánea con empiema, y ha sido aislado en hemocultivos de un paciente con desnutrición grave. ^{260,437,499,1071}
<i>E. sulfureus</i> ⁶⁶³	Especie de pigmento amarillo recién descrita; aislada en plantas; no ha sido aislada aún en seres humanos.
<i>E. phoeniculicola</i> ⁶⁴¹	Descrita en 2003, esta especie se encuentra en las glándulas del plumaje de la abubilla arbórea silvestre de pico rojo; no crece en agar BE ni en caldo de NaCl al 6,5%.
<i>Enterococcus</i> especie CDC PNS-E1	"Nueva especie propuesta" de los CDC aislada en la sangre de un paciente en Evanston, Illinois, en 1991.
GRUPO 5	
<i>E. columbae</i> ²⁷⁵	Especie de estreptococos recién clasificada aislada en tubo digestivo de palomas; estrechamente relacionada con <i>E. cecorum</i> y <i>E. avium</i> ; caracterizada por ser PYR negativa e incapaz de crecer en caldo de NaCl al 6,5%.
<i>E. canis</i> ²⁶³	Aislada originariamente de un perro con otitis externa crónica; probablemente residente del intestino canino; crece en agar BE, crece en caldo de NaCl al 6,5% y es PYR positiva.
<i>E. moraviensis</i> ⁹³⁸	Nueva especie enterocócica ambiental descrita en 2001; aislada en aguas superficiales y fuentes de agua potable del norte de Moravia en la República Checa.

rias, abscesos intraabdominales o pelvianos, heridas, úlceras por decúbito o dispositivos de acceso intravenoso. Los enterococos también causan el 5-20% de los casos de endocarditis y constituyen una causa frecuente de endocarditis de válvula protésica.⁶⁸⁰ En general, la endocarditis afecta a pacientes de edad avanzada que tienen una valvulopatía subyacente o válvulas protésicas y tiene casi siempre una presentación subaguda.^{25,811}

En las infecciones intraabdominales y pelvianas, los enterococos suelen hallarse mezclados con otros microorganismos aerobios y anaerobios endógenos; también se ha comunicado una peritonitis espontánea pura por enterococos y la peritonitis enterocócica asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{300,722} Aunque muchas infecciones invasoras por enterococos se originan en sitios intraabdominales, existe una controversia relacionada con el papel de los microorganismos en la patogenia de las infecciones intraabdominales y la peritonitis.⁷²² Algunos estudios han mostrado que la cobertura antibiótica antienterocócica empírica es beneficiosa para los pacientes inmunodeprimidos que tienen una peritonitis posoperatoria intrahospitalaria, los enfermos con sepsis intraabdominal que han recibido antibióticos que no cubren al enterococo, y los pacientes con peritonitis y cardiopatía coexistente o prótesis que se encuentran en riesgo de sufrir una endocarditis por enterococos.⁴⁶⁰ A menudo se encuentran enterococos en infecciones de heridas y tejidos blandos (p. ej., quemaduras, úlceras por decúbito) por otras bacterias facultativas y anaerobias, y las complicaciones asociadas con estas infecciones (p. ej., osteomielitis enterocócica) pocas veces se deben a enterococos a menos que se presenten como agentes sobreinfectantes. La sepsis neonatal por enterococos tiene una presentación aguda de inicio temprano, caracterizada por fiebre, somnolencia y dificultad respiratoria acompañada por bacteriemia y meningitis.²⁹⁰ Los recién nacidos prematuros corren mayor riesgo de sufrir infecciones intrahospitalarias por enterococos, sobre todo cuando tienen dispositivos de acceso periféricos o sondas

de alimentación.⁶⁴¹ La meningitis por enterococos es una infección enterocócica rara que puede observarse tanto en adultos como en niños.^{634,777,929} Esta meningitis se puede desarrollar en forma espontánea o como una complicación posoperatoria. Los individuos con meningitis espontánea por enterococos suelen tener una infección enterocócica en otros sitios, presentan una enfermedad subyacente grave y tienen una bacteriemia enterocócica simultánea más a menudo que aquellos que tienen infecciones posoperatorias. La enfermedad subyacente en los pacientes con meningitis espontánea incluye neoplasias, diabetes, insuficiencia renal y tratamiento con agentes inmunosupresores. Los pacientes con meningitis posquirúrgica por enterococos suelen tener un antecedente de traumatismo del SNC (p. ej., accidentes, colocación de una derivación).⁶³⁴ En una revisión reciente de meningitis por enterococos, *E. faecalis* representó el 76% de las cepas y 15 de los 25 casos que se debieron a *E. faecium* fueron causados por cepas resistentes a la vancomicina.⁷⁷⁷ Las infecciones respiratorias causadas por enterococos son raras y sólo se observan en pacientes muy debilitados.⁸⁴

La resistencia de los enterococos a distintos antibióticos contribuye realmente a su patogenicidad. Estos microorganismos muestran poca resistencia intrínseca a los aminoglucósidos y las lincosamidas, tienen CIM relativamente altas para penicilinas y cefalosporinas, y son resistentes a la acción de las sulfamidas in vitro. Las CIM más altas para los β -lactámicos se deben a la menor afinidad de las proteínas de unión a penicilina (PBP) de la pared celular por estos agentes. La baja resistencia a los aminoglucósidos se debe a la menor penetrabilidad de la pared celular del enterococo.³²¹ Aunque los enterococos parecen sensibles a las sulfamidas in vitro, pueden superar el bloqueo de la síntesis de folato in vitro. En general, las infecciones graves asociadas con enterococos se tratan con una combinación de penicilina o ampicilina y un aminoglucósido. El surgimiento de resistencia elevada a los aminoglucósidos (CIM de estreptomina > 2 000 $\mu\text{g/mL}$); CIM de pentamicina

> 500 µg/mL en los enterococos, sobre todo *E. faecalis* y *E. faecium*, afectó gravemente el enfoque terapéutico y la respuesta clínica de los pacientes con bacteriemia, endocarditis y otras infecciones graves.^{30,142} La resistencia elevada a los aminoglucósidos se ha diseminado entre varias especies de enterococos y ha sido documentada en cepas de *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. mundtii*.⁸³⁷ Las cepas que muestran resistencia elevada a los aminoglucósidos no son destruidas por la actividad sinérgica del agente β-lactámico junto con un aminoglucósido. Esta gran resistencia está mediada por transposones y puede ser transferida a otros microorganismos.³²¹ El sinergismo bactericida entre penicilina y aminoglucósidos requiere que el microorganismo no sólo tenga CIM para los aminoglucósidos por debajo de los valores citados antes, sino que la concentración en suero de penicilina esté cerca de la CIM o la exceda, la resistencia creciente a los β-lactámicos junto con CIM elevadas de aminoglucósidos anula también el sinergismo. A causa de la falta de sinergismo confiable entre penicilina y aminoglucósidos contra los enterococos, resistencia alta de éstos a los aminoglucósidos y surgimiento de *S. aureus* resistente a la meticilina, la vancomicina se convirtió en un agente de primera línea eficaz tanto contra estafilococos como contra enterococos.

Hasta comienzos de la década de 1980, la sensibilidad de los enterococos a la ampicilina y la vancomicina seguía siendo bastante previsible. Desde ese momento, se han comunicado especies de *Enterococcus* resistentes a la ampicilina y la vancomicina con una frecuencia creciente. Se demostró que la resistencia a la ampicilina en algunas cepas de *E. faecalis* se debía a la producción de enzimas β-lactamasas.⁷⁶² Con posterioridad, se informó resistencia a la penicilina en cepas de *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. raffinosus*; con estos microorganismos, la resistencia se debió a la menor afinidad de las proteínas de unión a penicilina de la pared celular.^{185,321,673} La aparición de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a la vancomicina anunció un cambio importante en los enterococos.

La resistencia adquirida a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) en las especies de *Enterococcus* corresponde a cinco fenotipos diferentes, designados VanA, VanB, VanD, VanE y VanG, donde VanA y VanB son los fenotipos prevalentes y de mayor importancia clínica.^{396,405,1077} Estos fenotipos corresponden a genotipos designados *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*, respectivamente. En general, estos fenotipos describen grupos de genes que codifican enzimas que crean los componentes estructurales que conducen a la resistencia fenotípica. Esta resistencia a los glucopéptidos es el resultado de la síntesis de diferentes precursores de peptidoglucanos que quedan incorporados en la pared celular y tienen menor afinidad de unión a vancomicina, teicoplanina o ambas. Normalmente, las cepas sensibles a la vancomicina tienen cadenas laterales de peptidoglucanos que terminan con el depsipéptido "D-alanil-D-alanina" y el antibiótico glucopéptido se une a este depsipéptido. En las cepas resistentes a los glucopéptidos, el depsipéptido es reemplazado por "D-alanil-D-lactato" (fenotipos VanA, VanB y VanD) o por "D-alanil-D-serina" (fenotipos VanE y VanG). Las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* que tienen el genotipo *vanA* muestran una resistencia inducible característica alta, mediada por transposones, tanto a la vancomicina (CIM, 64-1 000 µg/mL) como a la teicoplanina (CIM, 16-512 µg/mL), ambos antibióticos de la clase de los glucopéptidos.¹⁰⁷⁷ Las cepas con el genotipo *vanB* tienen una resistencia inducible adquirida a distintas concentraciones de vancomicina (CIM, 4-1 000 µg/mL), pero siguen siendo sensibles a la teicoplanina (CIM, 0.5-1 µg/mL), aunque raras cepas *vanB* también pueden

ser resistentes a este último antibiótico.^{396,1077} Las cepas que expresan el genotipo *vanB* también incluyen las de *E. faecalis* y *E. faecium*. Algunas cepas de *E. faecium* expresan el genotipo *vanD*; estas cepas son constitutivamente resistentes tanto a la vancomicina (CIM, 64-28 µg/mL) como a la teicoplanina (CIM, 4-64 µg/mL) y la resistencia no es transferible a otros enterococos.⁷⁶⁸ Raras cepas de *E. faecalis* que expresan el genotipo *vanE* expresan una resistencia inducible baja a la vancomicina (CIM, 16 µg/mL), aunque siguen siendo sensibles a la teicoplanina (CIM, 0.5 µg/mL).³⁶¹ El fenotipo VanG se asocia con resistencia baja a la vancomicina (CIM, 16 µg/mL), pero con sensibilidad a la teicoplanina (CIM, 0.5 µg/mL) e inicialmente se observó en cepas de *E. faecalis* provenientes de Australia.⁶⁷⁷ Las cepas que tienen el genotipo *vanC* muestran una resistencia constitutiva e intrínseca baja a la vancomicina (CIM, 2-32 µg/mL) y son sensibles a la teicoplanina (CIM, 0.5-1 µg/mL). El genotipo *vanC* corresponde a la resistencia intrínseca a los glucopéptidos observada en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*. Este grupo del gen *vanC* no es transferido mediante conjugación a otros microorganismos, suele expresarse en forma constitutiva y tiene origen cromosómico.^{610,719} El genotipo *vanF* se refiere al grupo de genes de resistencia a glucopéptido hallado en la ex especie *Bacillus*, *Paenibacillus popillae*.⁷⁶⁰ Los enterococos del fenotipo VanA son los más problemáticos porque estas cepas pueden transferir marcadores de resistencia *vanA* por un mecanismo conjugativo a otros enterococos y otros microorganismos grampositivos, que incluyen *Staphylococcus aureus*.⁷²⁶ Sin embargo, en 1994, se mostró que las cepas con el genotipo de clase *vanB* podían transferir también sus genes de resistencia a la vancomicina.¹²⁷ El desarrollo de sondas de DNA para la detección directa de locus de resistencia ayudó en algunas investigaciones epidemiológicas de brotes hospitalarios causados por enterococos resistentes a la vancomicina.¹⁰⁷⁸

Otro fenómeno de los enterococos es el de la dependencia de la vancomicina. Esto se refiere a las cepas de enterococos que crecen sólo en presencia de este agente. Los enterococos dependientes de la vancomicina fueron descritos por primera vez en 1994, cuando estos microorganismos fueron cultivados en la orina de un paciente que recibía un tratamiento prolongado con vancomicina.^{372,373} Desde ese momento, se han comunicado otros aislamientos de enterococos dependientes de la vancomicina.²⁷³ Los pacientes expuestos a la vancomicina y a otros agentes (p. ej., cefalosporinas de espectro ampliado) corren riesgo de colonización por enterococos resistentes a la vancomicina y esta exposición también los coloca en riesgo de ser colonizados por enterococos dependientes de la vancomicina. Los enterococos resistentes y dependientes de la vancomicina pueden utilizar las ligasas de la pared celular para elaborar un depsipéptido alternativo de la pared celular (D-alanina-D-lactato), que reemplaza a la D-alanina-D-alanina hallada normalmente. En la ausencia de vancomicina, los enterococos resistentes a la vancomicina conservan su capacidad para elaborar el depsipéptido D-alanina-D-alanina y siguen creciendo en forma normal. Debido a mutaciones en los genes de la ligasa que conducen a delecciones/sustituciones de aminoácidos en la enzima ligasa, las cepas de enterococos dependientes de vancomicina no pueden elaborar el depsipéptido D-alanina-D-alanina original como componente de la pared celular, de modo que en realidad el crecimiento es dependiente de la vancomicina. Estas cepas de enterococos son relativamente poco frecuentes. Se describieron cepas dependientes de la vancomicina derivadas tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium*.^{273,373}

Se explica más adelante en este capítulo la identificación de las especies de *Enterococcus*. En el capítulo 17 se proporciona más información sobre la resistencia a los antibióticos y los métodos para evaluar las pruebas de sensibilidad.

Género *Melissococcus*

El género *Melissococcus* contiene una única especie, *M. pluton*. Este microorganismo causa una enfermedad de las abejas denominada "loque europea". En 1994, utilizando datos de secuencia de rRNA 16S, Cai y Collins demostraron que *M. pluton* estaba más estrechamente relacionado con el género *Enterococcus*.¹⁴⁵ Como la denominación de este microorganismo en el género *Melissococcus* precedió a la descripción del género *Enterococcus*, la incorporación de *M. pluton* entre los enterococos, según las reglas de la nomenclatura, hubiera requerido transferir todas las especies de enterococos al género *Melissococcus*. Debido a la familiaridad de los enterococos tanto para los médicos como para los microbiólogos, esos autores recomendaron mantener a *M. pluton* como la única especie del género *Melissococcus*.¹⁴⁵

Bacterias "similares a *Streptococcus*"

Especies de *Abiotrophia* y de *Granulicatella*

En un principio se pensaba que los "estreptococos con variante nutricional" eran estreptococos viridans que requerían compuestos del tiol (p. ej., cisteína) o la forma activa de vitamina B₆ (piridoxal o piridoxamina) para el crecimiento en medios bacteriológicos.¹⁵⁵ Estos microorganismos también han sido denominados estreptococos con deficiencias nutricionales, estreptococos que requieren tiol, estreptococos que requieren piridoxal y estreptococos "satélites". Los estudios de relación de DNA que compararon las variantes nutricionales de estreptococos y otros estreptococos viridans identificaron dos grupos de hibridación de DNA que correspondían a dos especies, denominadas *Streptococcus defectivus* y *Streptococcus adiacens*.¹²⁶ En 1995, Kawamura y cols. en Japón realizaron análisis de secuencia de rRNA 16S de estas dos especies y observaron que no estaban relacionadas con ninguna especie perteneciente al género *Streptococcus*. Se propuso el nuevo género *Abiotrophia* para acomodar estos "estreptococos", y los nombres de las nuevas especies fueron *Abiotrophia adiacens* y *Abiotrophia defectiva*.⁵⁵⁷ En 1998 y 1999, se caracterizaron otros dos miembros del género: *Abiotrophia elegans*, de un paciente con endocarditis y *Abiotrophia balaenopterae*, aislado en un roca aliblanco (ballena minke, *Balaenoptera acutorostrata*).^{609,820} En 2000, Kanamoto y cols. utilizando criterios genéticos y fenotípicos identificaron y caracterizaron otra nueva especie de *Abiotrophia* estrechamente relacionada con *A. adiacens* y propusieron el nombre *Abiotrophia para-adiacens* para esta nueva especie.⁵⁴⁸ Más tarde, se demostró que estas nuevas especies tienen una afinidad filogenética más estrecha con *A. adiacens* que con *A. defectiva*. La última especie se encuentra más relacionada desde el punto de vista filogenético con varias especies "similares a *Streptococcus*" no *Abiotrophia*, que incluyen *Globicatella sanguinis*, especies de *Facklamia*, especies de *Eremococcus* y especies de *Ignavi-granum*. En la actualidad, varios estudios han demostrado la naturaleza polifilética del género *Abiotrophia* y la estrecha afinidad entre *A. adiacens*, *A. elegans*, *A. para-adiacens* y *A. balaenopterae*. Sobre la base de estos estudios, estos tres microorganismos han sido reclasificados en el nuevo género

Granulicatella como *Granulicatella adiacens*, *Granulicatella paraadiacens*, *Granulicatella elegans* y *Granulicatella balaenopterae*.²²³ *A. defectiva* se conserva como la única especie del género *Abiotrophia*.

A. defectiva, *G. adiacens* y *G. elegans* forman parte de la flora normal de las vías respiratorias altas, el aparato urogenital y el tubo digestivo.^{687,845} Las especies de *Abiotrophia* y *Granulicatella* causan sepsis y bacteriemia, y constituyen la causa del 5-6% de los casos de endocarditis infecciosa y complicaciones bacteriémicas asociadas con endocarditis.^{123,173,189,190,710,820,823} Desde 1999 se ha documentado que *A. defectiva* y *G. adiacens* producen infecciones del SNC, como meningitis y abscesos encefálicos y epidurales.^{94,171,685,855} En casi todos los casos, la infección se asoció con procedimientos neuroquirúrgicos previos, que incluyen craneotomía, colocación de una derivación ventriculoperitoneal, mielografía guiada por tomografía computarizada y resección tumoral. Estos microorganismos también han sido aislados en infecciones oculares importantes, entre ellas conjuntivitis, endoftalmitis luego de cirugía de cataratas y queratitis asociada con lentes de contacto de hidrogel de uso prolongado.^{58,561,715,748} Otras infecciones que las especies de *Abiotrophia* y *Granulicatella* producen neumonía, absceso escrotal, sinusitis, artritis séptica, osteomielitis vertebral, infección de artroplastia e infección de médula ósea.^{189,470,479,510,823} Estos microorganismos producen distintos factores extracelulares in vitro, que incluyen neuraminidasa y varias aminopeptidasas, que pueden contribuir a su virulencia; también pueden unirse a fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular.^{72,740} Por su importancia clínica y sus requerimientos exigentes en el cultivo, es esencial que el microbiólogo clínico esté familiarizado con las circunstancias clínicas en las cuales ocurren y con los métodos de laboratorio que son necesarios para su aislamiento en muestras de pacientes.

Las especies de *Abiotrophia* y *Granulicatella* son más resistentes a los antibióticos que los estreptococos viridans. Aunque la mayoría de las cepas son sensibles a clindamicina, eritromicina, rifampicina y vancomicina, algunos estudios han demostrado menor sensibilidad a la penicilina y sensibilidad variable a cefalosporinas y aminoglucósidos.⁷¹⁰ En un estudio de Tuhoy y cols., el 41% de 27 cepas de *G. adiacens* y 12 de *A. defectiva* fueron sensibles a la penicilina (CIM, $\leq 0,12$ µg/mL), el 51% tenía una sensibilidad intermedia (CIM, 0,25-2 µg/mL) y el 8% eran resistentes a la penicilina (CIM, ≥ 4 µg/mL).⁹⁷⁵ Las cepas de *G. adiacens* fueron más sensibles a la penicilina y la cefazolina (55% de sensibilidad a la penicilina, 52% de sensibilidad a la cefazolina) que las cepas de *A. defectiva* (8% de sensibilidad a la penicilina, 0% de sensibilidad a la cefazolina). Para ceftriaxona, el 83% de las cepas de *A. defectiva* y el 63% de *G. adiacens* eran sensibles en el punto de corte del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). En este estudio, todas las cepas fueron sensibles a clindamicina, rifampicina, ofloxacina, levofloxacina, quinupristina-dalfopristina y vancomicina y no se detectó resistencia elevada a los aminoglucósidos. Como estos microorganismos necesitan piridoxal para su crecimiento, los medios de prueba de sensibilidad a los antibióticos deben ser complementados con clorhidrato de piridoxal (concentración final del 0,001%) para su realización.⁹⁵⁶

Especies de *Aerococcus* y de *Helcococcus*

Los aerococos son microorganismos similares a *Streptococcus* que se encuentran en el medioambiente, casi siempre en asociación con agua y pueden aislarse en aire, polvo, suelo,

vegetación, productos cárneos y el medioambiente hospitalario.⁵⁶⁴ *Aerococcus viridans*, la especie más vieja del género, causa una enfermedad mortal de las langostas denominada gafkemia, pero en los seres humanos son fundamentalmente oportunistas.^{63,756} Los aerococos han sido aislados en pacientes con algunos trastornos clínicos, como endocarditis, bacteriemia, meningitis, artritis séptica, osteomielitis e infecciones de heridas.^{565,717,775,939,948} En ocasiones, los aerococos son incluidos en estudios de eficiencia y pueden confundirse fácilmente con estreptococos viridans y enterococos. Los aerococos tienen una tendencia característica a formar tétradas cuando crecen en caldos de cultivo. Los microorganismos son microaerófilos y se observa escaso o ningún crecimiento en condiciones anaerobias. Se ha demostrado que las cepas antes asignadas al género *Pediococcus* como *P. urinae-equi* están estrechamente relacionadas desde el punto de vista fenotípico con *A. viridans*.²²⁸ En general, las cepas de *A. viridans* son sensibles a penicilina, macrólidos, sulfamidas y trimetoprim.

En 1989, Christensen y cols. en Copenhague comunicaron sobre un grupo de 29 pacientes con sospecha de infecciones urinarias en los cuales se aislaron "microorganismos similares a *Aerococcus*" en muestras de orina.^{193,194} En 11 de estos pacientes, el microorganismo fue aislado en cultivo puro ($> 10^6$ unidades formadoras de colonias [UFC]/mL). Los pacientes (20 mujeres y 9 hombres) variaron en edad de 49 a 88 años y el 50% de ellos tenían trastornos locales o sistémicos (p. ej., diabetes, neoplasias del aparato urinario o de otros sitios, urolitiasis) que también los pueden haber predispuesto a una infección por microorganismos oportunistas. Los pacientes con septicemia y endocarditis causadas por estos microorganismos eran ancianos, tenían algún tipo de enfermedad subyacente (p. ej., infarto de miocardio, cáncer de próstata, diabetes) y en ellos se habían aislado microorganismos similares a *Aerococcus* en muestras de sangre u orina.^{191,192} La caracterización fenotípica de estas cepas de microorganismos similares a *Aerococcus* demostró que diferían de las cepas de *A. viridans* en varios aspectos.^{8,194} Sobre la base de los criterios fenotípicos de diferenciación y el análisis filogenético de los datos de secuencia de rRNA 16S de cepas de referencia de *A. viridans*, Aguirre y Collins propusieron clasificar a estos microorganismos como la nueva especie *Aerococcus urinae*.⁸ La inclusión de *A. urinae* en el género *Aerococcus* se sustenta en los resultados de secuenciación del rRNA 16S, y estos datos también son el sustento de la inclusión tanto de los biotipos esculina positivos como los esculina negativos dentro de la misma especie.¹⁹⁵ Desde la denominación de esta nueva especie, se ha comunicado *A. urinae* como causa de infecciones urinarias, septicemia, endocarditis, infecciones de tejidos blandos, espondilodiscitis y linfadenitis.^{308,473,868,869,900,1092,1094} Las cepas de *A. urinae* suelen ser sensibles a penicilina, amoxicilina, piperacilina, cefepima, rifampicina y vancomicina.^{193,899} Las quinolonas, las tetraciclinas y la eritromicina muestran una actividad moderada a buena, y la mayoría de las cepas tienen CIM elevadas para algunas cefalosporinas y una menor sensibilidad a los aminoglucósidos. Algunos estudios de muerte bacteriana en función del tiempo sugieren que el tratamiento combinado es el de elección para la endocarditis causada por este microorganismo.⁸⁹⁹

Desde la identificación de *A. urinae* se describieron otras tres especies de *Aerococcus*: *Aerococcus christensenii*, *Aerococcus urinaehominis* y *Aerococcus sanguinicola*.^{221,606,607} *A. christensenii* fue aislado en muestras vaginales en la University of Washington en Seattle y había sido identificado tentativamente como *Streptococcus acidominimus*.²²¹ La des-

cripción de *A. sanguinicola* se basa sobre un único aislamiento en hemocultivos humanos, pero esta especie ha sido aislada tanto en urocultivos como en hemocultivos (incluida la endocarditis) desde su descripción inicial en 2001.^{339,607} Las cepas de *A. sanguinicola* son sensibles a penicilina, amoxicilina, cefotaxima, cefuroxima, eritromicina, vancomicina, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, linezolida y tetraciclinas, y tienen una sensibilidad variable a las quinolonas; algunas cepas son resistentes a clindamicina, meropenem y trimetoprim-sulfametoxazol.³³⁹ Asimismo, la descripción de *A. urinaehominis* se basa sobre un único aislamiento en una muestra de orina humana.⁶⁰⁶ No existe información sobre la sensibilidad a los antibióticos de *A. urinaehominis*.

Durante un examen de varios aislamientos similares a *Streptococcus* provenientes de fuentes clínicas humanas, Collins y cols. encontraron nueve cepas de cocos facultativos, grampositivos y catalasa negativos semejantes a los aerococos pero que producían un crecimiento variable en caldo de NaCl al 6,5%.²⁰⁸ Siete de las nueve cepas fueron aisladas en heridas de los pies o las piernas y dos provenían de cultivos de masas mamarias. La otra característica inusual de estos microorganismos era que fueron lipofílicos; el crecimiento en medios de agar y en caldo fue aumentando por la presencia de suero o Tween 80. Se demostró que estos microorganismos pertenecían a un nuevo género y especie de cocos grampositivos mediante análisis genético y criterios fenotípicos y han sido asignados al nuevo género *Helcococcus* como *Helcococcus kunzii*. Otros estudios sobre la nueva ecología de este nuevo microorganismo sugieren una asociación con la flora bacteriana de las extremidades inferiores y una tendencia a ser aislados en las infecciones de heridas y celulitis junto con microorganismos más virulentos, como *Staphylococcus aureus*.^{147,445} Desde su descripción, *H. kunzii* ha sido aislado en cultivo puro en un quiste sebáceo infectado, un absceso mamario y un absceso quirúrgico del pie.^{172,764,813} En 1999, se describió una segunda especie de *Helcococcus*, *Helcococcus ovis*,²⁰⁹ que se encuentra en las ovejas.

Especies de *Leuconostoc*

Las especies de *Leuconostoc* son cocos facultativos, heterofermentativos, no esporulados, inmóviles y grampositivos que se encuentran en el medioambiente (sobre plantas y en el suelo). Estos microorganismos tienen importancia económica debido a su uso en las industrias láctea y de conservas y en la elaboración de vinos. Han sido aislados en infecciones humanas, la mayoría de las cuales ocurren en huéspedes inmunodeprimidos.^{434,457,513,694} Se han aislado especies de *Leuconostoc* en hemocultivos de pacientes con neoplasias subyacentes y catéteres intravenosos permanentes y también en abscesos hepáticos e intraabdominales, sitios de gastrostomía y traqueostomía, abscesos odontógenos, abscesos mamarios, osteomielitis, empiema pleural, peritonitis bacteriana relacionada con diálisis y espontánea, y fistulas secretantes.^{59,116,400,462,696,701,953,984,1037} Se han aislado especies de *Leuconostoc* como agentes oportunistas que producen bacteriemia e infecciones pulmonares en receptores de trasplantes de médula ósea, de trasplantes de órganos sólidos, pacientes con afecciones gastrointestinales, pacientes quemados y pacientes con SIDA.^{330,357,402,433,540,694} También se aisló una especie de *Leuconostoc* en el LCR de una niña de 16 años que antes estaba sana, en la cual el microorganismo produjo una meningitis purulenta.²³³ Friedland y cols. comunicaron un caso de meningitis purulenta debida a *L. mesenteroides* en una niña de un mes.³⁸⁰ Carapetis y cols. des-

hubieron dos casos de bacteriemia causada por especies de *Leuconostoc* (específicamente, *L. lactis* y *L. pseudomesenteroides*) en niños con enterocolitis necrosante que estaban recibiendo nutrición parenteral prolongada.¹⁵⁴ En uno de estos casos, se aisló la misma cepa de *L. lactis* en el sitio del tubo de gastrostomía del paciente. Se comunicó bacteriemia causada por *L. mesenteroides* y *Enterobacter sakazakii* en asociación con fórmulas para lactantes contaminadas.⁷²⁸ También se informaron especies de *Leuconostoc* como causas de infecciones intrahospitalarias.^{152,849}

Las especies de *Leuconostoc* pueden ser identificadas erróneamente como neumococos, estreptococos viridans o lactobacilos. En forma similar a los pediococos y a ciertos lactobacilos, pero a diferencia de la mayoría de las otras bacterias grampositivas, las especies de *Leuconostoc* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina.⁶⁴⁶ En algunas comunicaciones de casos, los pacientes fueron tratados con vancomicina cuando las infecciones por estos microorganismos se evidenciaron clínicamente. Las características de las especies de *Leuconostoc* que ayudan a diferenciarlas de otras bacterias similares a *Streptococcus* son su resistencia a la vancomicina y la formación de gas a partir de glucosa durante el crecimiento en caldo MRS (se explica más adelante). El tratamiento para las infecciones graves por *Leuconostoc* incluye penicilina y aminoglucósidos; la mayoría de las cepas son sensibles a tetraciclinas, imipenem, clindamicina y gentamicina.

Especies de *Pediococcus* y de *Tetragenococcus*

Las especies de *Pediococcus* son cocos grampositivos que al igual que los estreptococos, producen ácido láctico como único producto de fermentación de la glucosa. Estos microorganismos se encuentran naturalmente en las plantas y son importantes en las industrias cervecera y alimentaria. Se los puede hallar en las cervezas común y de bajas calorías y también se los utiliza en los alimentos para el procesamiento y la preservación. Se agregan a las verduras procesadas y a los productos de soja como reforzadores de sabor y se utilizan en biotecnología como cepas indicadoras para los bioensayos vitamínicos. El género *Pediococcus* incluye siete especies: *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *P. clausenii*.²⁸⁹ Las cepas de *P. urinae-equi*, ex especie de *Pediococcus*, se asemejan fenotípicamente a *A. viridans*, y una sonda de DNA específica para *A. viridans* también reacciona con *P. urinae-equi*, lo que indica que son el mismo microorganismo.^{228,429} Además, algunos estudios genéticos que utilizaron rRNA 16S y hibridación de DNA-DNA señalan que la ex especie *Pediococcus halophilus* representa una línea de descendencia que está separada tanto de pediococos como de aerococos y está más estrechamente relacionada con los enterococos. Debido a estos datos genéticos, las cepas antes denominadas *P. halophilus* han sido ubicadas en el nuevo género *Tetragenococcus* y la especie tipo es *Tetragenococcus halophilus*.²²⁸ También se halló que *T. halophilus* es idéntico a *Enterococcus solitarius*. En 1997, Satomi y cols. describieron otra especie de *Tetragenococcus*, *T. muriaticus*, que fue aislada en la salsa de hígado de calamar, un alimento fermentado japonés tradicional.⁸⁴⁷ Esta especie puede crecer en concentraciones de NaCl de hasta un 25%.

El Bacterial Reference Laboratory of the Respiratory Diseases Brandt (Laboratorio Bacteriano de Referencia de la División de Enfermedades Respiratorias) de los CDC ha recibido cepas de pediococos provenientes de distintas muestras clínicas humanas, que incluyen saliva, heces, orina, heridas,

abscesos y sangre.⁶⁶⁷ En general, los pediococos han sido aislados en pacientes con distintos trastornos subyacentes, como neoplasias hematológicas, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar crónica, gastroquiasis, pancreatitis y diabetes.^{42,61,234,474,844,896} Muchos pacientes con estas infecciones habían tenido una operación abdominal previa o tenían colocados tubos nasogástricos o catéteres venosos centrales para nutrición parenteral total durante períodos prolongados. Los pediococos aislados en hemocultivos suelen ser cultivos positivos únicos entre varios cultivos positivos con otros microorganismos. En un estudio de 26 pacientes que se sometieron a una descontaminación intestinal total con gentamicina-vancomicina-colimicina preparatoria para la terapia de inducción de remisión o el trasplante de médula ósea, Maugein y cols. observaron especies de *Pediococcus* en el 89% de muestras de heces recogidas en estos enfermos.⁶⁷⁰ Al igual que las especies de *Leuconostoc*, estos microorganismos son resistentes a la vancomicina; muchos pacientes manifiestan primero síntomas de infección mientras son tratados con este antibiótico.^{667,941} En una comunicación, *P. acidilactici* fue identificado en múltiples hemocultivos en un hombre de 53 años con leucemia mieloblástica aguda.⁴¹⁰ En el momento del primer hemocultivo positivo, este paciente había estado recibiendo vancomicina durante 14 días, junto con ceftazidima, metronidazol y quimioterapia oncológica. Los pediococos aislados en muestras clínicas se identificaron como *P. acidilactici* o *P. pentosaceus*. En general, los pediococos son sensibles a penicilina G, eritromicina, clindamicina, gentamicina e imipenem.^{941,944}

Especies de *Gemella*

En la actualidad, el género *Gemella* incluye seis especies: *G. haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. bergeriae*, *G. sanguinis*, *G. palaticanis* y *G. cuniculi*.^{215,216,219,496,570} *G. haemolysans*, la especie tipo del género, es un coco grampositivo de fácil decoloración que aparece característicamente como diplococos con las caras adyacentes aplanadas. Debido a estas propiedades, fue incluido con los cocos gramnegativos en el género *Neisseria*. El análisis de la pared celular demostró que el microorganismo tenía una pared celular de tipo grampositivo, aunque es mucho más delgada que la de otros microorganismos grampositivos. Algunos estudios de hibridación de ácidos nucleicos no mostraron ninguna relación con los miembros de la familia *Neisseriaceae*. Estos datos, junto con la reacción de catalasa negativa, relegaron a esta especie a la familia *Streptococcaceae*. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con los estreptococos, el crecimiento es malo en condiciones anaerobias. *G. morbillorum* fue clasificado antes con los estreptococos como *Streptococcus morbillorum* e incluido en un principio en los estreptococos viridans. El análisis genético de cepas de *S. morbillorum* indicó que el microorganismo estaba más estrechamente relacionado con *G. haemolysans* que con los estreptococos y los peptoestreptococos.^{570,640,1055} Algunos estudios de cromatografía gas-líquido mostraron que, además del ácido láctico, algunas cepas también producían ácidos acético, fórmico, succínico y pirúvico, más cantidades pequeñas de etanol, lo que apoyó la transferencia de *S. morbillorum* al género *Gemella* como *Gemella morbillorum*. En 1998, se caracterizaron y describieron dos especies nuevas de *Gemella*: *Gemella bergeriae* y *Gemella sanguinis*.^{215,216} Estas cepas (seis de cada especie) fueron aisladas en sangre y eran distintas de las especies de *Gemella* descritas mediante caracterización bioquímica y molecular. Con posterioridad, se describieron otras dos especies: *Gemella palaticanis* y *Gemella*

cuniculi.^{219,496} *G. palaticanis* fue aislado en una vesícula de la cavidad bucal de un perro Labrador retriever y *G. cuniculi*, en un absceso submandibular de un conejo de orejas caídas. En la actualidad, no se conoce el hábitat de *G. bergeriae* y *G. sanguinis* en los seres humanos y, fuera del aislamiento en los hemocultivos, no se ha asociado ninguna infección específica con esta nueva especie.

Los miembros del género *Gemella* se aíslan pocas veces en muestras clínicas. Sin embargo, su similitud con los estreptococos viridans probablemente ha conducido a que no fuera reconocido y a que fuera mal interpretado. *G. haemolysans* forma parte de la flora de las vías respiratorias altas, mientras que *G. morbillorum* puede hallarse en los aparatos respiratorio y digestivo humanos. Se ha aislado tanto *G. haemolysans* como *G. morbillorum* como causas ocasionales de bacteriemia y endocarditis que afectan válvulas cardíacas nativas y protésicas.^{75,346,379,490,600,698,744} También se han comunicado casos de meningitis, meningoencefalitis, artritis séptica, osteomielitis, espondilodiscitis, queratitis con endoftalmítis, absceso retrofaríngeo, empiema torácico con absceso pulmonar, shock séptico y una artroplastia de rodilla infectada asociada con especies de *Gemella*.^{41,245,261,314,315,671,689,744,785,815,997,1003,1008,1017} Al igual que las infecciones por *S. bovis*, también se ha realizado una asociación entre endocarditis debida a especies de *Gemella* y la presencia de pólipos adenomatosos y carcinoma de colon.^{477,633} En general, las especies de *Gemella* son sensibles a una amplia variedad de agentes antibióticos, que incluyen penicilina, ampicilina, rifampicina y vancomicina, pero se puede observar resistencia de bajo nivel a aminoglucósidos y trimetoprim en algunas cepas.¹⁴⁴ En 1993, se observó que una cepa de *G. haemolysans* que fue aislada en un hemocultivo tenía menor sensibilidad a la penicilina y resistencia franca a vancomicina, teicoplanina, eritromicina y tetraciclina.⁸⁰⁴

Especies de *Vagococcus*

El género *Vagococcus* fue propuesto en 1989 para categorizar un grupo de cocos grampositivos móviles y catalasa negativos que se asemejaban a lactococos.²⁰⁶ Estos microorganismos móviles habían sido aislados en heces de pollos y agua de río. Utilizando datos de secuenciación del rRNA 16S, se mostró que estas cepas "similares a *Lactococcus*" móviles formaban una línea de descendencia distinta dentro de las bacterias productoras de ácido láctico y estaban claramente separadas de los estreptococos, enterococos y especies de *Lactococcus sensu stricto*. Más aún, también se observó que eran fenotípicamente distintas. Collins y cols. colocaron a estos microorganismos en el nuevo género *Vagococcus* ("coco errante").²⁰⁶ Las cepas similares a *Lactococcus* móviles del grupo N en el género *Vagococcus* se denominan ahora *Vagococcus fluvialis* ("propias de un río"). También se han aislado cepas de *V. fluvialis* en lesiones cutáneas y amígdalas en cerdos, vacas, caballos y gatos domésticos.⁷⁸¹ Los CDC han comunicado la recepción de dos cepas de *V. fluvialis*, una de un hemocultivo y la otra del líquido peritoneal de un paciente en diálisis renal.³³⁶ Se han aislado otras cepas de *V. fluvialis* en muestras clínicas humanas (hemocultivos, líquido peritoneal, heridas), en animales (cerdos) y en el medioambiente (agua de pozo).⁹⁵⁰

Durante un estudio genético de lactobacilos atípicos aislados en distintos productos cárneos (miembros del género *Carnobacterium*), se describieron dos cepas en truchas arco iris adultas, distintas de las aisladas en las aves de corral.¹⁰²⁴ Estas dos cepas mostraron el máximo grado de homología de secuencia del rRNA 16S con cepas de *V. fluvialis*, con las que forman

un grupo genético cercano filogenéticamente a carnobacterias, estreptococos, lactococos y enterococos, pero distinto de ellos. Los dos aislamientos provenientes de salmónidos han sido asignados al género *Vagococcus* como *Vagococcus salmoninarum*. Más tarde, se demostró que este microorganismo producía infecciones peritoneales en el salmón y en la trucha marrón.⁸⁶¹ En 1999, se describió una tercera especie de *Vagococcus* aislada en muestras de sangre, hígado, pulmón y bazo de una nutria común (*Lutra lutra*). Esta cepa fue caracterizada genéticamente y denominada *Vagococcus lutrae*.⁶⁰⁸ En 2000, se aisló una cuarta especie de *Vagococcus* durante exámenes post mortem en una foca y una marsopa de puerto. Esta cepa se halló en cultivo puro en los tejidos hepáticos y renales de la foca, y se observó un crecimiento importante en los tejidos peritoneal, esplénico, renal, hepático, pulmonar, encefálico, placentario e intestinal de la marsopa del puerto. Sobre la base de los datos filogenéticos y fenotípicos, la cepa fue denominada *Vagococcus fessus*.⁴⁹⁸ No se ha aislado *V. salmoninarum*, *V. lutrae* y *V. fessus* en muestras clínicas obtenidas de seres humanos.

Especies de *Alloiococcus*

En 1989, Faden y Dryja informaron sobre el aislamiento de un coco grampositivo grande y de lento crecimiento en 10 niños con otitis media crónica con derrame.³⁴³ Los niños tenían 10 meses a casi 3 años de edad, y cada niño tenía antecedentes de dos a cinco episodios de otitis media. Mediante la aspiración del oído medio se extrajeron secreciones serosas, mucoides o francamente purulentas; se observaron células inflamatorias en todas las muestras. En la mayoría de los casos, también se pudieron observar grandes cocos grampositivos en los frotis teñidos con Gram de estos líquidos. Se aisló un nuevo microorganismo en cultivo puro en 11 aspirados óticos y en cultivo mixto con *Haemophilus influenzae* no tipificable, difteroides, micrococos o estafilococos coagulasa negativos en cinco muestras. En uno de los niños examinados en el estudio se aisló el mismo microorganismo en tres muestras separadas de oído medio recogidas en un período de 8 meses. En cultivo, los microorganismos crecieron con extremada lentitud y condujeron a los autores a sugerir que tal vez habían sido omitidos en el pasado porque las placas de cultivo no habían sido incubadas el tiempo suficiente. Debido a la asociación de este grampositivo de lento crecimiento con la otitis media crónica, Faden y Dryja recomendaron que las muestras para cultivo obtenidas por aspiración del oído medio debían ser incubadas por lo menos durante 5 días para facilitar la detección de estas bacterias.³⁴³ Aguirre y Collins caracterizaron luego este coco inusual y lo llamaron *Alloiococcus otitis*.⁶ Una revisión del nombre de este microorganismo de *A. otitis* a *A. otitidis* fue sugerida y aprobada luego de acuerdo con las reglas de la nomenclatura binomial. Además de las cepas aisladas en secreciones del oído medio, los CDC han recibido cepas de *A. otitidis* provenientes de hemocultivos y esputo.³³⁶ Las cepas de *A. otitidis* son sensibles o tienen una resistencia intermedia a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de espectro ampliado (cefixima, ceftriaxona) y son resistentes a eritromicina y trimetoprim-sulfametoxazol.¹¹⁸ Debido a su lento crecimiento, varios investigadores han ideado métodos de amplificación molecular para la detección de este microorganismo en derrames del oído medio.^{7,92,620} Estas técnicas altamente sensibles también han permitido la detección del microorganismo en la nasofaringe y el conducto auditivo externo, lo que sugiere que estos sitios constituyen su hábitat natural.³⁰⁵

Especies de *Globicatella*

En 1992, Collins y cols. describieron nueve aislamientos clínicos humanos únicos (cinco provenientes de hemocultivos, tres de urocultivos y uno de LCR).²⁰⁵ Los rasgos fenotípicos indicaron que estas cepas no eran miembros de los grupos *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* o *Aerococcus*. Además, los investigadores genéticos mostraron claramente una línea de descendencia distinta para estas cepas dentro del "grupo de bacterias productoras de ácido láctico". Estas cepas han sido asignadas al nuevo género *Globicatella* (que significa una cadena corta compuesta por células esféricas). Todas eran fenotípicamente similares y han recibido el nombre de especie *Globicatella sanguinis* (antes *G. sanguis*). Las cepas de *G. sanguinis* remitidas a los CDC provenían de hemocultivos, urocultivos y cultivos de heridas y de una muestra de LCR obtenida durante una necropsia.³³⁶ En 2001, Shewmaker y cols. comunicaron sobre 28 cepas de *G. sanguinis* que habían sido aisladas en urocultivos y hemocultivos de pacientes con diagnóstico de endocarditis, sepsis y bacteriemia.⁸⁸⁴ Vandamme y cols. en Bélgica caracterizaron una segunda especie de *Globicatella* que fue aislada en infecciones del aparato respiratorio y articulares en terneros, ovejas y cerdos.⁹⁹¹ Esta cepa fue denominada *Globicatella sulfidifaciens* por su capacidad para producir H₂S.

Especies de *Facklamia*

En 1997, Collins y cols. caracterizaron cinco cepas humanas de cocos grampositivos catalasa negativos en muestras de orina, vagina, sangre y abscesos.²¹⁰ Algunos estudios comparativos de secuenciación de genes rRNA 16S demostraron que estas cepas desconocidas eran genealógicamente homogéneas y constituían una nueva línea filogenética estrechamente relacionada con el género *Globicatella* pero distinta de él. También diferían de *G. sanguinis* en su estructura del peptidoglucano mureína. Aun cuando estaban muy estrechamente relacionadas con *G. sanguinis* desde el punto de vista filogenético, fenotípicamente eran muy diferentes. *G. sanguinis* producía ácido a partir de varios hidratos de carbono, mientras que las nuevas cepas eran totalmente asacarolíticas. Estas cepas también tenían algunas características que se asemejaban a microorganismos similares a *Gemella* con tolerancia a la sal, como *D. pigrum* (véase más adelante) y fueron colocadas en el nuevo género *Facklamia* como *Facklamia hominis*.²¹⁰

Se describieron otras varias especies de *Facklamia* en la literatura taxonómica y microbiológica de años posteriores. Collins y cols. caracterizaron dos cepas en sangre humana como segunda especie asacarolítica, *Facklamia ignava*.²²⁴ El año siguiente, el mismo grupo describió a *Facklamia sourekii* en su caracterización de otras dos cepas aisladas en hemocultivos humanos.²¹³ Esta nueva especie difería de *F. hominis* y *F. ignava* por ser un fermentador activo. *Facklamia languida* fue propuesto como nueva especie de *Facklamia* para describir tres cepas humanas en muestras de sangre y LCR.⁶⁰⁵ Esta especie es asacarolítica, pero difiere fenotípicamente de la otra especie en varias reacciones enzimáticas. *Facklamia tabacinalis* también se describió en 1999 y fue denominado para describir una cepa aislada como un contaminante del rapé.²¹⁴ Su secuencia genética de rRNA 16S se asemejó muy estrechamente a *F. ignava*. *Facklamia miroungae* fue descrito en 2001 y fue aislado en un hisopado nasal de un elefante marino joven (*Mirounga leonina*).⁴⁹⁷

Las distintas especies de *Facklamia* parecen tener perfiles de sensibilidad a los antibióticos ligeramente diferentes. LaClaire

y Facklam determinaron la sensibilidad de *F. hominis* (cuatro cepas), *F. ignava* (cinco cepas), *F. languida* (seis cepas), *F. sourekii* (tres cepas) y *F. tabacinalis* (una cepa) y observaron que una cepa de *F. hominis* y dos cepas de *F. ignava* tenían CIM de penicilina que caían en el rango intermedio, mientras que todas las otras cepas eran sensibles a la penicilina.⁵⁹³ Una cepa de *F. ignava*, una de *F. sourekii* y las seis cepas de *F. languida* fueron resistentes a la cefotaxima; cinco de las seis últimas cepas también eran resistentes a la cefuroxima. Aunque la mayoría fueron sensibles a la eritromicina, tres cepas de *F. ignava* y dos de *F. languida* eran resistentes. Cinco de las seis cepas de *F. languida* y una de las cinco de *F. ignava* eran resistentes a la clindamicina. Todas tenían una sensibilidad intermedia o eran resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y ninguna fue resistente a la levofloxacina o la vancomicina.

Especies de *Dolosigranulum*, *Ignavigranum* y *Dolosicoccus*

Los géneros *Dolosigranulum* e *Ignavigranum* describen bacterias similares a *Gemella* que pueden crecer en NaCl al 6,5%. *Dolosigranulum pigrum*, la única especie del género, fue descrita en 1993, y el Laboratorio de Estreptococos de los CDC ha caracterizado varias cepas en hemocultivos, muestras oculares, hisopados nasofaríngeos, esputo, orina, aspirados gástricos y de senos paranasales, y muestras medulares de necropsia.¹¹ *D. pigrum* también ha sido aislado en los hemocultivos de un hombre de 64 años con sinovitis.⁴⁵¹ LaClaire y Facklam realizaron pruebas de sensibilidad en 27 cepas clínicas de *D. pigrum* y observaron que todas eran sensibles a penicilina, amoxicilina, cefalosporinas (cefotaxima, cefuroxima), clindamicina, levofloxacina, meropenem, rifampicina, tetraciclina y vancomicina; 15 eran resistentes a la eritromicina.⁵⁹²

Ignavigranum ruoffiae es el nombre dado a dos cepas de cocos grampositivos catalasa negativos que fueron aislados en una herida y un absceso ótico.²²⁵ Estas cepas tolerantes a la sal estaban relacionadas filogenéticamente con especies de *Globicatella* y *Facklamia* y fenotípicamente se asemejan a las especies de *Facklamia* asacarolíticas. No existen datos de su sensibilidad a los antibióticos.

El género *Dolosicoccus* fue creado para clasificar a otro coco grampositivo catalasa negativo único que fue aislado en un hemocultivo.²²⁰ Esta cepa estaba filogenéticamente relacionada con *G. sanguinis* y el grupo de especies de *Facklamia* y fenotípicamente se asemeja a *F. hominis* y *F. ignava*. La única especie en el género es *Dolosicoccus paucivorans*.

Especies de *Eremococcus*

El género *Eremococcus* fue creado para clasificar cocos filogenéticos y fenotípicamente iguales aislados en el aparato genital de yeguas de pura sangre.²²² La secuenciación comparativa del rRNA 16S demostró que estaban relacionados con *A. defectiva* y *G. sanguinis* y más lejanamente relacionados con especies de *Facklamia* e *I. ruoffiae*. La única especie en el género es *Eremococcus coleocola*.

Género *Lactococcus*

El género *Lactococcus* consiste en "estreptococos productores de ácido láctico" o "estreptococos lácteos". Desde el punto de vista histórico, estos microorganismos portan el antígeno de grupo N de Lancefield, aunque sólo alrededor del 80% de las cepas de lactococos portan el antígeno extraíble en sus paredes celulares. Los lactococos son microorganismos infrecuentes en

muestras clínicas que han sido aislados en sangre, orina y heridas.^{322,652,859,1075} Los lactococos deben ser considerados patógenos oportunistas de baja virulencia.¹⁰ Los miembros del género *Lactococcus* son *L. lactis* subespecie *lactis*, *L. lactis* subespecie *cremoris*, *L. lactis* subespecie *hordniae*, *L. garveiae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* y *L. xylosus*. *L. lactis* subespecie *lactis* y *L. garveiae* son las especies de lactococos aisladas más a menudo en muestras clínicas humanas.

Aislamiento e identificación de estreptococos y bacterias “similares a *Streptococcus*”

Frotis directos con tinción de Gram

Por lo general, en las muestras clínicas la tinción de Gram de los frotis pondrá en evidencia cocos grampositivos o gramvariables dispuestos en pares o cadenas cuando en los cultivos crecen estreptococos (véase lámina en color 13-1B). Tanto en las muestras como en los cultivos en caldo, las cadenas de células tienden a aparecer como cadenas de pares de células más que como cadenas de células individuales. Las formas de las células individuales varían desde las que se asemejan a diplococos hasta las que parecen cocobacilares o corineformes. Esta morfología a menudo se observa en frotis de cultivos en caldo y también de medios sólidos. Los estreptococos viridans, en particular, tienden a tener células que parecen más alargadas. *S. pneumoniae* suele presentarse como pares de células lanceoladas (véase lámina en color 13-1C). En frotis de muestras que dan cepas mucoides y muy encapsuladas, la cápsula puede aparecer como un halo rosado o como un área sin tinción que rodea a las células en relieve contra un fondo rosado que rodea al microorganismo.

Se puede hacer un diagnóstico rápido de meningitis por estreptococos del grupo B y por neumococos por el examen de un frotis de LCR teñido con Gram. Si se remite el LCR suficiente (más de 1-2 mL), debe centrifugarse la muestra para obtener un gránulo para examen y cultivo. La citocentrifugación de muestras de LCR aumenta la detección de pequeñas cantidades de microorganismos e incrementa la sensibilidad de la tinción de Gram en comparación con las muestras con centrifugación convencional o sin centrifugar.¹⁷⁵ El uso de citocentrifugación evita la realización de pruebas del látex o coaglutinación para la detección de antígenos capsulares de estreptococos del grupo B o de neumococos (véase sección sobre “Detección directa”, más adelante).

Medios de cultivo

Cuando se sospechan estreptococos, las muestras para cultivo deben sembrarse en un medio apropiado que contenga sangre con una base de peptona lo suficientemente rica como para favorecer el desarrollo de estos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. El medio base de agar debe ser un medio de infusión en peptona (p. ej., tripticasa soja, proteosa peptona, Todd-Hewitt) sin hidratos de carbono agregados. Aunque las colonias serán más grandes en medios que contengan glucosa (p. ej., medio base de Columbia) después de 24 horas, el ácido producido a partir de glucosa inactiva la estreptolisina S de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A y puede interferir en la interpretación de las cualidades hemolíticas del microorganismo. Se agrega sangre de carnero al medio basal en una concentración del 5% como células indicadoras de hemólisis. Las concentraciones más bajas de sangre en los medios hacen más dificultoso el reconocimiento de la

reacción hemolítica, mientras que las concentraciones más altas pueden ocultar por completo la hemólisis. En agar sangre de carnero, los estreptococos pertenecientes a los grupos A, B, C, F y G son β -hemolíticos (se describirán más adelante), mientras que la mayoría de las especies de *Enterococcus* y los estreptococos del grupo D son α -hemolíticos o no hemolíticos. Excepto para las cepas del grupo D y algunas cepas del grupo B, los estreptococos agrupables no hemolíticos son raros. El agar sangre de carnero no favorece el crecimiento de *Haemophilus haemolyticus* o *Haemophilus parahaemolyticus*; de ahí que pequeñas colonias β -hemolíticas aisladas en muestras en agar sangre de carnero suelen ser estreptococos. La bibliografía creciente sobre *Arcanobacterium haemolyticum* como causa de faringitis puede requerir cambios en los métodos de laboratorio utilizados para los cultivos de faringe, porque este microorganismo es β -hemolítico y catalasa negativo pero es un bacilo grampositivo (cap. 14).

El agar selectivo también puede aumentar el aislamiento de estreptococos del grupo A de cultivos de faringe. Las fórmulas que más se utilizan y que se comercializan utilizan una base de agar tripticasa soja que contiene sangre de carnero al 5% y sulfametoxazol (23,75 $\mu\text{g/mL}$)-trimetoprim (1,25 $\mu\text{g/mL}$).¹⁰³⁶ Gran parte de la flora orofaríngea normal (p. ej., estreptococos viridans, micrococos, estafilococos y neisserias) será inhibida en este medio. El empleo de este medio selectivo aumenta el aislamiento de estreptococos de los grupos A y B y permite la visualización de β -hemólisis sin el “trasfondo” del crecimiento de otros microorganismos. Los medios selectivos comerciales incluyen Group A Selective Strep A® con sangre de carnero al 5% (ssA; BD Diagnostics Systems, Sparks, MD) y Strep A Isolation Agar® (Remel Laboratories, Lenexa KS). En una evaluación comparativa, Pacífico y cols. cotejaron la recuperación de estreptococos del grupo A en medios selectivos para estreptococos (ssA) y en agar sangre de carnero regular incubado en diferentes condiciones (en aire, en CO_2 y en atmósfera anaerobia).⁷⁵¹ El máximo rendimiento de cultivo positivo en este estudio se obtuvo utilizando el medio selectivo para *Streptococcus* incubado en condiciones anaerobias durante 48 horas. La mayoría de los laboratorios incuban medios para el aislamiento de estreptococos β -hemolíticos del grupo A durante 48 horas en un medioambiente enriquecido con CO_2 , suponiendo que sólo los cultivos de pacientes con pequeñas cantidades de microorganismos o de aquellos que son portadores de estreptococos del grupo A crecen en condiciones anaerobias.²⁹ Sin embargo, aun los pacientes con pequeñas cantidades de microorganismos pueden tener una respuesta inmunitaria, lo que sugiere que están infectados y no son simplemente portadores del microorganismo.⁷⁵¹ Las pequeñas cantidades de microorganismos en una placa de cultivo en un paciente con faringitis estreptocócica clínica también pueden reflejar la recolección insuficiente de las muestras.

Los estreptococos aislados en muestras clínicas humanas se identifican sobre la base de sus cualidades hemolíticas, las pruebas serológicas para la detección de antígenos de la pared celular o capsulares, y pruebas fisiológicas y bioquímicas. Algunas de las pruebas realizadas en el laboratorio para la identificación de estos microorganismos proporcionan resultados presuntivos, mientras que otras brindan resultados definitivos. Sin embargo, antes de proseguir con las pruebas de identificación, es necesario verificar que los cocos grampositivos en consideración son **catalasa negativos** utilizando H_2O_2 al 3%, lo que los ubica en *Streptococcus* y grupos bacterianos similares a *Streptococcus*. La prueba de la catalasa se explica en detalle en el capítulo 12.

Recuadro 13-5 Identificación de hemólisis

Tipo de hemólisis	Comentarios
α-hemólisis	Lisis parcial de los eritrocitos que rodea a una colonia, que produce un cambio de color gris verdoso o pardusco en el medio (lámina en color 13-1E).
β-hemólisis	Lisis completa de eritrocitos, que produce una eliminación de la sangre del medio debajo de las colonias y a su alrededor (lámina en color 13-1D y F).
γ-hemólisis	Sin hemólisis y, en consecuencia, sin cambio en el medio debajo de las colonias y a su alrededor. Se dice que los microorganismos que no muestran hemólisis son γ-hemolíticos o no hemolíticos.
Cebado α o "zona ancha" α-hemólisis	Una zona pequeña de eritrocitos intactos inmediatamente adyacente a la colonia, con una zona de hemólisis completa de los eritrocitos que rodea a la zona de eritrocitos intactos. Este tipo de hemólisis puede ser confundida con β-hemólisis.

Hemólisis en agar sangre

Los estreptococos en agar sangre de camero pueden producir cuatro tipos de hemólisis (recuadro 13-5). La observación y la interpretación correcta de las propiedades hemolíticas de los estreptococos son muy importantes porque la realización de pruebas ulteriores se basa sobre esta evaluación inicial. Es mejor observar la hemólisis examinando las colonias que crecen en condiciones anaerobias o inspeccionando las subsuperficies en cuatro placas o en placas con siembra en estría y punción porque, para los estreptococos del grupo A, la máxima actividad de las hemolisinas lábiles al oxígeno (OLS) y estables al oxígeno (SLS) se observa sólo en condiciones anaerobias. Las hemolisinas lábiles al oxígeno también son producidas por las cepas del grupo C y algunas cepas del grupo G, de modo que la detección de hemolisinas por estos microorganismos también aumenta por incubación anaerobia. Aunque no se recomienda la incubación anaerobia sistemática de muestras en las que se sospechan estreptococos, se pueden adoptar pasos para aumentar al máximo la detección de hemolisinas bajo incubación aerobia o capnofílica. Ésta es la finalidad de la técnica de "estría y punción" que se utiliza para sembrar muestras de hisopados de faringe en agar sangre para el diagnóstico de faringitis estreptocócica (fig. 13-2; véase lámina en color 13-1D y F). Esta técnica introduce parte del inóculo debajo del agar, creando así un medioambiente relativamente anaerobio. También se deben punzar las áreas de la placa no inoculadas con la muestra. Las placas deben ser incubadas a 35 °C en aire o en CO₂ al 5-7%. Aunque algunos laboratorios recomiendan un medioambiente de incubación sobre los otros para los cultivos faríngeos, en general el aislamiento de estreptococos β-hemolíticos de pacientes con faringitis estreptocócica no se compromete en ninguna condición ambiental.¹⁰³⁶

Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β-hemolíticos del grupo A en muestras faríngeas

Las técnicas sin cultivo para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados faríngeos han tenido un uso amplio en los laboratorios clínicos desde comienzos de la década de 1980. En estos sistemas, el antígeno estreptocócico de grupo se extrae del material hisopado utilizando óxido nítrico o mediante un paso de extracción enzimática, seguido de la detección del antígeno extraído. En los primeros equipos comerciales, los formatos de aglutinación del látex o de inmunoanálisis (EIA) eran los métodos utilizados para la detección de antígenos (véase lámina en color 13-1G). La sensibilidad de estos ensayos para detectar antígenos de estreptococos

del grupo A variaba entre el 62% y el 96%; la especificidad en la mayoría de los casos excedía el 97%.^{150,288,333,393,489,871,1087} También se introdujeron las técnicas de inmunoanálisis liposómico como el sistema de Q Test Strep (BD Diagnostic Systems) en las cuales, en lugar de utilizar anticuerpos antiestreptococos del grupo A conjugados a una enzima, los anticuerpos eran conjugados a un liposoma (una "esfera" artificial de fosfolípidos) que contenía el colorante sulfato de rodamina. La reacción del antígeno con los anticuerpos lisaba el liposoma y liberaba el colorante sulfato de rodamina. Se ha evaluado el método del liposoma; la sensibilidad y la especificidad fueron del 91% y del 83%, respectivamente.^{394,501}

El "Strep A OIA" (para inmunoanálisis óptico) (Biostar, Boulder CO) es una prueba que se realiza sobre un portaobjetos. El resultado se determina por un cambio físico en el espesor de delgadas películas formadas por las reacciones de unión entre el antígeno del grupo A y los anticuerpos antigro A (véase lámina en color 13-1H). El antígeno se extrae del hisopo con ácido acético (0,3 M) y se agregan anticuerpos de conejos contra estreptococos del grupo A marcados con peroxidasa de rábano picante. Esta mezcla se deposita sobre el portaobjetos OIA, donde el antígeno se une a los anticuerpos antiestreptococos del grupo A fijados sobre el portaobjetos. Se lava el

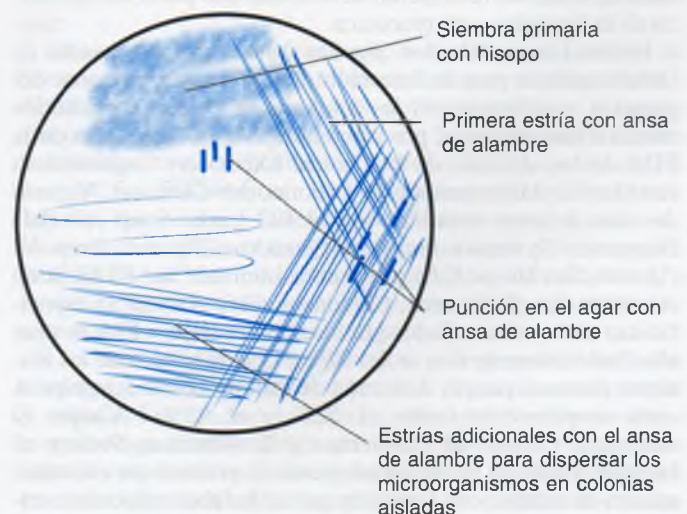


Figura 13-2 Técnica de estría y punción para el aislamiento de estreptococos β-hemolíticos.

portaobjetos y se aplica un sustrato enzimático (tetrametil benzidina que contiene peróxido de hidrógeno) que se deja reaccionar durante 4 minutos. Después del lavado, la reacción se lee examinando el matiz de luz reflejado desde el punto de reacción sobre el portaobjetos; si se presenta antígeno de estreptococos del grupo A en la muestra del hisopado original, el área de reacción sobre el portaobjetos aparece como una mancha violácea. Si el antígeno no está presente, la superficie del portaobjetos retiene su color oro. La sensibilidad y la especificidad de Strep OIA varía del 81% al 98,9% y del 95% al 100%, respectivamente.^{174,252,268,461,476}

También se han utilizado técnicas de sondas y de sondas amplificadas de DNA para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopado faríngeo. La prueba Gen-Probe Group A Strep Direct (Prueba Directa para Estreptococos del grupo A, Gen-Probe, San Diego, CA) es un método quimioluminescente no isotópico que utiliza una sonda de DNA para detectar las secuencias complementarias de rRNA de los estreptococos del grupo A directamente en un extracto de un hisopado faríngeo. Esta prueba ha sido evaluada por varios grupos; se han comunicado sensibilidades del 88,6% al 94,8% y especificidades del 98% al 99,7%.^{174,472,475,778} Un inconveniente de la prueba Gen-Probe Group A Strep Direct es que el hisopo utilizado para recoger la muestra debe estar compuesto por rayón o fibras de dacrón que son esterilizadas con óxido de etileno o hisopos de dacrón esterilizados mediante rayos gamma. Los hisopos compuestos por fibras de rayón que se esterilizan mediante rayos gamma producen una quimioluminiscencia de fondo elevada. Por esta razón, no se deben utilizar hisopos CulturettePlus® (rayón irradiado) (BD Biosciences) con esta prueba. Hace poco, se ha comercializado el ensayo LightCycler Strep-A® (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), una prueba de sonda amplificada que utiliza PCR en tiempo real, para su uso en laboratorios clínicos. Este método utiliza el equipo LightCycler y puede evaluar hasta 32 muestras en un tiempo de ejecución de 1,5 horas. Uhl y cols., en la Mayo Clinic, evaluaron este ensayo y observaron una sensibilidad y una especificidad del 93% y el 98%, respectivamente.⁹⁸¹ Es probable que la sensibilidad de este ensayo sea mayor del 93%, dado que las siete muestras evaluadas eran positivas con el ensayo LightCycler y los cultivos negativos. Es probable que otro estudio de este nuevo ensayo aclare las características de realización de este enfoque para el diagnóstico de la faringitis estreptocócica.

En los Estados Unidos, muchas de las pruebas basadas en inmunoanálisis para la detección directa de estreptococos del grupo A y utilizadas en los laboratorios de los consultorios médicos han obtenido, por su complejidad, la eximición de la FDA de los alcances de la Clinical Laboratory Improvement Act (Ley de Mejoramiento de Laboratorios Clínicos). Algunas de estas pruebas eximidas son el BD Link2 Strep A® (BD Diagnostic Systems), la prueba QuickVue Dipstick Strep A® (Quidel, San Diego, CA) y la prueba ImmunoCard STAT Strep A® (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH). Aunque la especificidad de los sistemas de aglutinación del látex y EIA es muy alta (habitualmente mayor del 97%), la sensibilidad de los distintos sistemas para la detección de estreptococos del grupo A varía ampliamente (entre el 62% y el 95%). Aunque el American College of Physicians y la American Society of Internal Medicine propusieron pautas de práctica para el tratamiento de adultos con faringitis que se basaban sólo sobre criterios clínicos (incluso sin utilizar las pruebas de antígenos rápidos) para el diagnóstico, este enfoque es considerado controversial por otras sociedades médicas, como la Infectious

Diseases Society of America, la American Heart Association y la American Academy of Pediatrics.^{98,232,398,910} La American Heart Association, los prospectos de los envases de muchos de los sistemas de prueba rápida para antígeno y la mayoría de los microbiólogos clínicos recomiendan que todas las muestras que dan resultados negativos de antígenos rápidos sean confirmadas por cultivo. Independientemente del método de ensayo de los sistemas de prueba o de las afirmaciones del fabricante para un sistema de prueba o una técnica dados, se recomienda obtener dos hisopados faríngeos. Se debe realizar un cultivo faríngeo estándar con el segundo hisopo para las muestras que dan resultados negativos en la detección rápida de antígeno con el primer hisopo. Algunos laboratorios han sustituido el cultivo por la prueba Gen-Probe Group A Strep Direct para la confirmación de los resultados negativos del antígeno directo.⁴⁷⁵

Técnicas de detección directa diferentes del cultivo para estreptococos β-hemolíticos del grupo B y *Streptococcus pneumoniae*

El diagnóstico de la enfermedad sistémica por estreptococos del grupo B se logra mejor cultivando el microorganismo de muestras correctamente recogidas. También existen métodos para la detección directa de antígeno capsular de estreptococos del grupo B en LCR, suero y orina. Las pruebas de aglutinación del látex (LA) y coaglutinación (COA) han sido utilizadas en muchos laboratorios para el diagnóstico rápido de las infecciones sistémicas por estreptococos del grupo B, sobre todo meningitis durante el período neonatal. Las pruebas LA actualmente disponibles incluyen el sistema Directogen Meningitis Combo Test® (BD Biosciences Microbiology Products, Sparks, MD) y el sistema Wellcogen Bacterial Antigen® (Murex Diagnostics, Dartford, Reino Unido). El sistema de prueba comercial COA es la prueba de LCR Phadebact (Boule Diagnostics, Huddinge, Suecia). La sensibilidad de los productos de aglutinación del látex para la detección de antígenos de estreptococos del grupo B varía entre alrededor del 85% al 100%, aunque algunos estudios han comunicado sensibilidades de tan sólo 27% a 54%.^{48,68,381,446,454,511} Las especificidades correspondientes de las pruebas de aglutinación del látex varían entre el 80% y el 100%.^{48,381,446,511} A pesar de la realización de estas pruebas en ensayos clínicos que condujeron a la aprobación para su uso, muchos laboratorios han dejado de ofrecerlas de rutina. Además del costo relativamente alto, no se ha confirmado su utilidad diagnóstica y pronóstica después de años de experiencia. Pueden ser muy útiles en casos de sospecha de meningitis en los cuales la tinción de Gram es negativa, cuando los cultivos de LCR son negativos después de 48 horas o ambos.³⁶² En la actualidad, el método recomendado para la detección directa óptima de estreptococos del grupo B en LCR depende de la inspección cuidadosa de un frotis teñido con Gram de una muestra citocentrífuga.¹⁷⁵

Los métodos de detección directa para estreptococos del grupo B en muestras rectovaginales son relativamente poco sensibles en comparación con el método de amplificación en caldo recomendado por los CDC (recuadro 13-3). Los ensayos rápidos en formato de aglutinación del látex o EIA no deben utilizarse para el cribado de muestras de hisopados rectovaginales para estreptococos β-hemolíticos del grupo B (véase la sección sobre "Importancia clínica" en "Estreptococos β-hemolíticos del grupo B", para una explicación de los métodos de cribado).³⁶⁷

Como adyuvante del diagnóstico por cultivos en infecciones respiratorias por *S. pneumoniae*, existen métodos para la detección de antígeno neumocócico en orina en pacientes con neu-

monía neumocócica. La prueba de antígeno urinario de *Streptococcus pneumoniae* Binax NOW® (Binax, Portland, ME) es un ensayo inmunocromatográfico rápido que permite realizar un diagnóstico presuntivo de neumonía neumocócica mediante la detección de antígenos capsulares solubles específicos en muestras de orina. Los antígenos neumocócicos detectados por esta prueba representan más del 90% de la enfermedad invasora que se presenta en los Estados Unidos y en todo el mundo. En un estudio llevado a cabo en el Reino Unido, el ensayo NOW fue positivo en el 82% de 107 muestras de orina de pacientes con neumonía neumocócica bacteriémica; 3 de 106 pacientes con neumonía y bacteriemia debida a otros microorganismos también eran prueba NOW positivos, lo que dio una especificidad del 97%.⁹⁰⁸ En un estudio poblacional prospectivo de adultos con neumonía en España, la prueba fue positiva en el 70,4% de 27 pacientes con neumonía neumocócica documentada por cultivo; la especificidad correspondiente de la prueba en este estudio fue del 89,7%.⁴⁴⁴ En otro estudio, se detectó antígeno urinario en el 80% de 20 pacientes con bacteriemia neumocócica y en el 52% de 54 pacientes con *S. pneumoniae* aislado en el esputo.⁷⁰⁷ Samra y cols. evaluaron la prueba NOW tanto con muestras de LCR como de orina de 22 pacientes con meningitis neumocócica documentada por cultivo.⁴⁴¹ Para las muestras de LCR, 21 de 22 fueron positivas (sensibilidad del 95,4%) con la prueba rápida; sólo 12 de 21 muestras de orina fueron positivas (sensibilidad del 57,1%). El examen de todas las muestras de LCR que eran negativas por cultivo para *S. pneumoniae* o positivas para otros microorganismos fueron negativas, para una especificidad del 100% para muestras de LCR. Sin embargo, 5 (18,5%) de 27 muestras de orina de pacientes con cultivo de LCR positivos para otras bacterias y 63 (13,4%) de 470 muestras de orina de pacientes con cultivo de LCR negativos fueron positivas con la prueba NOW. Un inconveniente potencial de la prueba NOW de orina es que los portadores nasofaríngeos sanos de *S. pneumoniae* también pueden tener pruebas positivas. Un estudio llevado a cabo en Gambia, donde la tasa de portación entre los niños evaluados fue del 87%, comunicó que el 55% de las muestras de orina de niños sanos que eran portadores neumocócicos eran prueba Binax NOW positiva.⁴ En otro estudio realizado en Ecuador se observó que el 21,7% de los niños que eran portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* eran prueba NOW positivos y el 4,2% de los no portadores tenían pruebas falsas positivas de antígeno urinario.⁴⁵² Estos investigadores postularon que el ensayo Binax NOW en orina puede ser más útil para el diagnóstico de neumonía neumocócica y bacteriemia en poblaciones con bajas tasas de portación nasofaríngea de neumococos.

Además de la detección de antígeno en orina, se han creado varios métodos moleculares basados en la PCR para la detección directa, identificación y tipificación de *S. pneumoniae*.^{467,613,831,1015} También se describieron técnicas de PCR en tiempo real que utilizan LighCycler y que comprenden la amplificación de genes de neumolisina o autolisina para la detección directa de neumococos de muestras clínicas, como sangre y LCR.^{672,883,1000}

Morfología de las colonias y prueba de la catalasa

Después de 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias de estreptococos β -hemolíticos del grupo A tienen aproximadamente 0,5 mm de diámetro, son translúcidas o transparentes y tienen una superficie lisa o mate. En general, la zona de β -hemólisis tiene dos a tres veces el diámetro de la colonia. Las colonias tienen cúpula y presentan un borde conti-

nua. Algunas cepas de estreptococos del grupo A serán mucoides debido a la presencia de gran cantidad de material capsular. Los grupos C y G también tienen un aspecto similar, aunque las colonias de algunas cepas del grupo G pueden tener un tinte dorado a la inspección cuidadosa y las zonas hemolíticas suelen ser muy grandes. Los estreptococos β -hemolíticos del grupo B forman colonias más grandes en agar, el margen de hemólisis alrededor de la colonia es comparativamente más pequeño para los estreptococos del grupo B que para los otros estreptococos β -hemolíticos y en general la hemólisis es "más tenue" y menos evidente. Una proporción importante de estreptococos del grupo B (hasta el 11%) puede ser no hemolítica. Las colonias de estreptococos del grupo D tienden a ser más grandes que aquellas del grupo A, de 0,5 a 1 mm después de la incubación durante toda la noche. Las cepas del grupo D son α -hemolíticas o no hemolíticas en agar sangre de carnero (véase lámina en color 13-4C). En general, las colonias son grises, lisas y tienen un borde liso o continuo. Los estreptococos del grupo F forman colonias muy pequeñas y puntiformes con una zona grande de β -hemólisis. Estas colonias extremadamente pequeñas se denominan "colonias diminutas" y son características del grupo anginoso de estreptococos: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*. En general, las colonias β -hemolíticas diminutas son puntiformes luego de 24 horas de incubación, aunque tienen una zona algo grande y manifiesta de β -hemólisis. Los microorganismos del grupo anginoso que crecen en medios sólidos también tienen un olor característico dulce, acaramelado o a madreselva debido a la producción de diacetilo.¹⁸⁴ Esta característica se puede observar con los miembros α -hemolíticos, β -hemolíticos y no hemolíticos de este grupo.

S. pneumoniae muestra un espectro de tipos de colonias, cuyo aspecto depende del grado de encapsulación. En general, estas colonias están rodeadas por una amplia zona verde intensa de α -hemólisis. Las colonias de las cepas muy encapsuladas pueden tener varios milímetros de diámetro, son muy mucoides, parecen grises y pueden asemejarse a gotas de aceite en la superficie del agar. Las colonias de cepas menos encapsuladas son más pequeñas (véase lámina en color 13-2H). Con la incubación prolongada, la porción central de la colonia puede colapsar y toma un aspecto característico en "pieza de damas". Algunas colonias pueden colapsar todas juntas, lo que da el aspecto de la cabeza plana de un clavo sobre la superficie del agar.

Otras especies de estreptococos viridans forman colonias de diversos tamaños y texturas (véase lámina en color 13-1E). Algunas pueden ser lisas y tienen un borde continuo, mientras que otras pueden parecer rugosas, con la formación de bordes festoneados con la incubación prolongada. Las colonias de *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Facklamia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Ignavigranum* y las especies facultativas de *Lactobacillus* se asemejan estrechamente a estreptococos viridans o estreptococos del grupo D en su aspecto y son α -hemolíticas o no hemolíticas.

Los miembros de los estreptococos y de grupos de bacterias similares a *Streptococcus* son catalasa negativos, excepto por *A. otitidis*. Este microorganismo es similar a *Streptococcus* en la morfología de sus colonias pero es catalasa positivo. Algunas cepas de enterococos (sobre todo las de *E. faecalis*) producen una "seudocatalasa" que es responsable de la reacción de catalasa positiva débil que se observa con algunas cepas, sobre todo en los aislamientos primarios. La fuerza de esta reacción puede disminuir después de algunos subcultivos seriados.

Reconocimiento y caracterización preliminar de los estreptococos y las bacterias "similares a *Streptococcus*"

La determinación de hemólisis y la realización de una prueba de catalasa eran en otra época los únicos requerimientos para caracterizar preliminarmente a los estreptococos. Sin embargo, con el reconocimiento de varios grupos de bacterias similares a *Streptococcus* en infecciones humanas, también son necesarias otras pruebas, sobre todo para cepas aisladas en líquidos corporales estériles. Algunos de estos microorganismos (especies de *Leuconostoc* y *Pediococcus*) son intrínsecamente resistentes a la vancomicina y a los antibióticos glucopéptidos cíclicos relacionados (p. ej., ristocetina, aricidina y teicoplanina). El aumento aparente en el reconocimiento y el aislamiento de estos microorganismos puede estar parcialmente relacionado con el surgimiento de *S. aureus* resistente a la meticilina y el uso consiguiente de vancomicina como un antibiótico de primera línea, sobre todo en huéspedes muy debilitados. Estos microorganismos y otros "de aspecto similar" pueden ser diferenciados preliminarmente de especies de *Streptococcus* y *Enterococcus* y entre ellos con las pruebas que se muestran en el cuadro 13-1.

En agar sangre de carnero, estos microorganismos se asemejan a estreptococos viridans o enterococos; todos ellos son α -hemolíticos o no hemolíticos. Se observa una morfología estreptocócica característica—cadenas de cocos—con los estreptococos, enterococos, lactococos, especies de *Leuconostoc*/*Weissella*, especies de *Vagococcus*, especies de *Abiotrophia*/*Granulicatella*, especies de *Dolosicoccus*, especies de *Ignavigranum*, especies de *Globicatella* y especies de *Lactococcus* en los frotis teñidos con Gram de cultivos de caldo de tioglicolato. Los cocos grampositivos dispuestos predominantemente en pares, tétradas o en cúmulos son más característicos de los aerococos, especies de *Alloiococcus*, especies de *Gemella*, especies de *Pediococcus*, especies de *Helococcus* y especies de *Tetragenococcus*. Algunas de las bacterias similares a *Streptococcus* descritas hace poco (p. ej., especies de *Facklamia*, especies de *Tetragenococcus*) a menudo forman pares o cadenas cortas. En general, los lactobacilos facultativos muestran la morfología bacilar típica, mientras que otras especies se asemejan a cocos. La observación de cocos grampositivos en cadenas cortas en medios de cultivos de sangre y el crecimiento de microorganismos en subcultivo de agar chocolate sin crecimiento en el subcultivo de SBA correspondiente sugieren especies de *Abiotrophia*/*Granulicatella*. En medios que contienen sangre, algunas cepas pueden producir una reacción de catalasa débil con H_2O_2 al 3%; por lo tanto, las cepas que muestran esta reacción deben ser subcultivadas en medio sin sangre y reevaluadas para actividad de catalasa. Cabe señalar que la única especie entre las bacterias similares a *Streptococcus* que es verdaderamente catalasa positiva es *Alloiococcus otitidis*.

La investigación de la sensibilidad a la vancomicina de los estreptococos viridans o no hemolíticos aislados en líquidos corporales mediante procedimientos asepticos pueden evaluarse utilizando el disco común de 30 μ g en una placa de agar sangre de carnero incubada a 35 °C durante 18 a 24 horas. Algunas cepas pueden requerir una incubación prolongada (hasta 72 horas) para interpretar la prueba. Los microorganismos resistentes a la vancomicina (especies de *Pediococcus*, especies de *Leuconostoc*) suelen tener CIM mayores de 250 μ g/mL y crecen hasta el borde del disco. La presencia de cualquier zona alrededor del disco indica sensibilidad a la vancomicina. La producción de gas a partir de glucosa, una prueba útil para la diferenciación de las especies de *Leuconostoc* de los otros microorganismos, se determina mejor en caldo de Mann,

Rogosa y Sharpe (MRS) para *Lactobacillus* (Difco Laboratories, Detroit MI) cubierto con vaselina.²⁶⁹ La formación de burbujas bajo el sello de vaselina indica producción de gas y la naturaleza heterofermentativa de su metabolismo. El caldo MRS se incuba hasta durante 7 días. Otras pruebas útiles para la caracterización preliminar de los microorganismos similares a *Streptococcus* son pirrolidonil arilamidasa (PYR), leucina aminopeptidasa (LAP) y pruebas de tolerancia a la sal. Esta última se realiza en caldo con infusión de corazón que contiene NaCl al 6,5% y se incuba hasta 14 días antes de llamarla negativa. El parámetro es la presencia de crecimiento, como en la prueba de tolerancia a la sal para la identificación de enterococos. Las pruebas PYR y LAP están disponibles como pruebas rápidas en disco de varios fabricantes (p. ej., Remel; Carr-Scarborough, Decatur, GA) y también en algunos de los sistemas comerciales (p. ej., API Rapid STREP). La prueba para *Streptococcus* BactiCard (Remel) incluye PYR, LAP y una prueba de hidrólisis de esculina. Esta tarjeta, cuando se utiliza con resultados de sensibilidad a la vancomicina, puede proporcionar una caracterización preliminar de especies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Globicatella*.

En ocasiones, pruebas menos frecuentes son útiles para aumentar las pruebas tradicionales o confirmar las identificaciones obtenidas con sistemas comerciales. Para las pruebas de temperatura de crecimiento, se recomienda utilizar un baño de agua regulado a 45 °C y un refrigerador a 10 °C. Si existe algún crecimiento, se observa después de 24 a 48 horas de incubación. La motilidad se determina en un medio de agar semisólido común para motilidad, con el agregado de tetrazolio o sin él. Esta prueba debe ser incubada hasta 48 horas a temperatura ambiente. La prueba de Voges-Proskauer (VP) para acetilmetilcarbinol que se utiliza para los estreptococos se realiza en caldo VP con un inóculo importante incubado durante toda la noche. Después del agregado de α -naftol y reactivos de hidróxido de sodio, se agita o se sacude el tubo y se lo incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. En este momento, las reacciones rojas, rosadas e incoloras corresponden a reacciones positivas, débilmente positivas y negativas, respectivamente.

Identificación presuntiva de estreptococos

Los estreptococos β -hemolíticos, los neumococos, los estreptococos del grupo D y los enterococos son identificados definitivamente utilizando procedimientos serológicos (que se explican más adelante) que detectan los antígenos de grupos de Lancefield (grupos A, B, C, D, F y G) o los antígenos de polisacáridos capsulares (*S. pneumoniae*) de los microorganismos. La identificación de especie de los estreptococos del grupo D, especies de *Enterococcus* y los estreptococos viridans se logra fundamentalmente mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y enzimáticas. Sin embargo, muchos laboratorios utilizan algunas pruebas presuntivas que se correlacionan altamente con los métodos serológicos, aunque son menos costosas. En el cuadro 13-2 se resumen los resultados de las pruebas presuntivas para los principales grupos de estreptococos. En los protocolos 1-2, 1-6, 8-1 y 13-1 a 13-4 se describen los procedimientos detallados para la realización y la interpretación de las pruebas presuntivas más frecuentes.

SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

La prueba de sensibilidad a la bacitracina se utiliza para la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos

Cuadro 13-1 Características fenotípicas para la identificación presuntiva de cocos grampositivos catalasa negativos

GÉNERO	CRECIMIENTO, 35-37 °C, CA	CRECIMIENTO, 35-37 °C, SBA	MORFOLOGÍA DE LA TINCIÓN DE GRAM	HEMÓLISIS, SBA	CAT	LAP	PYR	SENSIBILIDAD A LA VANCO- MICINA	GAS, CALDO MRS	MOT	CRECIMIENTO, CALDO DE NaCl AL 6,5%	CRECIMIENTO, 10 °C	CRECIMIENTO, 45 °C
<i>Streptococcus</i>	+	+	Cadenas	α , β , γ	-	+	-	S	-	-	V	-	V
<i>Enterococcus</i>	+	+	Cadenas	α , γ	-	+	+	S/R	-	V	+	+	+
<i>Abiotrophia</i>	+	-	Cadenas	α , γ	-	+	+	S	-	-	-	-	V
<i>Granulicatella</i>	+	-	Cadenas	α , γ	-	+	+	S	-	-	-	-	V
<i>Aerococcus</i>	+	+	Tétradas, grupos	α	-	V	V	S	-	-	+	-	-
<i>Helcococcus</i>	+	+	Tétradas, grupos	γ	-	-	+	S	-	-	+	-	-
<i>Leuconostoc</i>	+	+	Cadenas	α , γ	-	-	-	R	+	-	V	+	+
<i>Weissella</i>	+	+	Cadenas	α , γ	-	-	-	R	+	-	+	V	V
<i>Pediococcus</i>	+	+	Tétradas, grupos	α	-	+	-	R	-	-	V	-	+
<i>Tetragenococcus</i>	+	+	Tétradas, grupos	α	-	+	-	S	-	-	+	-	+
<i>Gemella</i>	+	+	Tétradas, grupos, cadenas	α , γ	-	V	+	S	-	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	+	+	Cadenas	α , γ	-	+	+	S	-	+	+	+	-
<i>Alloiococcus</i>	+	+	Grupos, tétradas	α	+	+	+	S	-	-	+	-	-
<i>Globicatella</i>	+	+	Cadenas	α	-	-	+	S	-	-	+	-	-
<i>Facklamia</i>	+	+	Grupos, cadenas	α	-	+	+	S	-	-	+	-	-
<i>Dolosigranulum</i>	+	+	Grupos, tétradas	α	-	+	+	S	-	-	+	-	-
<i>Ignavigranum</i>	+	+	Grupos, cadenas	α	-	+	+	S	-	-	+	-	-
<i>Dolosicoccus</i>	+	+	Cadenas	α	-	-	+	S	-	-	-	-	-
<i>Eremococcus</i>	+	+	Cadenas	α	-	-	ND	S	-	-	+ ^d	-	+
<i>Lactococcus</i>	+	+	Cadenas	α , γ	-	+	+	S	-	-	V	+	V

+: reacción positiva; -: reacción negativa; V: reacción variable; ND: datos no disponibles; +^d: reacción positiva débil; CA: agar chocolate; Hemólisis SBO: hemólisis en agar sangre de carnero; CAT: catalasa; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidonil arilamidasa; MOT: motilidad.

del grupo A. La prueba se realiza en un medio de agar sangre con un disco diferencial de bacitracina (p. ej., disco de bacitracina TAXO A, 0,04 unidades, BD Microbiology Systems, Cockeysville, MD; discos Bacitracin Differentiation, 0,04 unidades, Remel). El procedimiento se describe en detalle en el protocolo 13-1. Cualquier zona de inhibición alrededor del disco se considera una prueba positiva (véase lámina en color 13-2B y C). Aunque es una prueba simple, económica y bastante precisa para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo A, no es altamente específica. Más del 10% de las cepas de estreptococos de los grupos C y G también son sensibles a la bacitracina, como lo son alrededor del 5% de las cepas del grupo B. En consecuencia, esta prueba se realiza a menudo junto con la prueba de sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol porque los estreptococos de los grupos C y G suelen ser sensibles a este antibiótico, mientras que los estreptococos de los grupos A y B son resistentes. Algunos investigadores han recomendado el uso de discos de bacitracina directamente sobre el agar sangre primario no selectivo para la rápida detección e identificación de estreptococos del grupo A en cultivos faríngeos. Sin embargo, este método sólo identifica el 50-60% de las cepas. La colocación de discos de bacitracina en placas primarias que contienen medios selectivos es mucho más sensible. El informe de laboratorio debe reflejar el uso de un método presuntivo: "estreptococos β -hemolíticos, presuntivamente no grupo A por bacitracina".

SENSIBILIDAD A TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

La prueba de sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol presuntivamente distingue los estreptococos de los grupos A y B de otros estreptococos β -hemolíticos. Cuando se la utiliza junto con la prueba de la bacitracina, ayuda a separar los estreptococos no A, no B que pueden ser sensibles a la bacitracina, porque tanto las cepas A como B son resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que los grupos C, F y G son sensibles (véase lámina en color 13-2C). La prueba se efectúa de la misma forma que la de la bacitracina, salvo en que se utiliza un disco comercial que contiene 1,25 μ g de trimetoprim y 23,75 μ g de sulfametoxazol. Cualquier zona de inhibición indica sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol (véase protocolo 13-1).

PRUEBA DE CAMP Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO

La prueba de CAMP (denominada así por Christie, Atkins y Munch-Petersen) se utiliza para identificar presuntivamente estreptococos del grupo B (véase protocolo 8-1) y se realiza utilizando una cepa de *S. aureus* productora de β -hemolisina (ATCC [American Type Culture Collection] 25923).¹⁹⁶ Los estreptococos del grupo B secretan una proteína llamada "factor CAMP" que interactúa con la β -hemolisina producida y secretada por *S. aureus* para producir una hemólisis mayor o sinérgica. Ésta aparece como un área con forma de punta de flecha de mayor hemólisis en el lugar donde las dos líneas de crecimiento están más próximas (véase lámina en color 13-2D).²⁵⁵ Esta prueba es altamente sensible, e incluso cepas del grupo B no hemolíticas serán CAMP positivas. Un pequeño porcentaje de estreptococos del grupo A también serán CAMP positivos, al igual que algunas cepas de *Listeria monocytogenes*. Esta prueba se utiliza a menudo junto con las pruebas de bacitracina y trimetoprim-sulfametoxazol en la misma placa de agar sangre para la identificación presuntiva de estos microorganismos (cuadro 13-2). Los informes deben declarar "estreptococos β -hemolíticos del grupo B presuntivos por prueba de CAMP".

La prueba de CAMP sigue siendo ampliamente utilizada para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo B, pero se han explotado otras características fisiológicas del microorganismo como posibles métodos de identificación. Los estreptococos del grupo B producen un pigmento carotenoides naranja rojizo en ciertos tipos de medios de cultivo. Esta propiedad ha sido explotada para su identificación presuntiva y varios investigadores han publicado fórmulas en los medios para este objetivo.^{266,945} De la Rosa y cols. comunicaron en España sobre un medio denominado NGM (nuevo medio Granada).²⁶⁵ Este medio contiene peptona proteosa, almidón soluble, glucosa, piruvato y agar como medio basal, con metotrexato de sodio como reforzador de pigmento y colistina como agente selectivo. Cuando se sembraron muestras del aparato genital femenino en NGM y se las incubó en condiciones anaerobias, se detectaron el 95% de los estreptococos del grupo B por el crecimiento de colonias naranja-rojizas después de 18 horas de incubación. La colocación de NGM en tubos profundos de agar detectó el 98% de los estreptococos del grupo B dentro de las 12 horas. La pigmentación fue menos evidente o intensa cuando las placas fueron incubadas en condiciones aerobias, pero esta diferencia no se observó con NGM en tubo. Se han utilizado medios de agar y de Granada en caldo para la búsqueda de estreptococos del grupo B en la vagina en mujeres preparto y se han obtenido resultados similares a los logrados con el caldo LIM selectivo.^{103,1020} Los medios de Granada se utilizan principalmente en centros europeos y no se comercializan en los Estados Unidos.

Recientemente se ha comercializado una adaptación del medio de Granada para la detección de estreptococos del grupo B en muestras rectovaginales. El sistema Strep B Carrot Broth (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) consiste en un tubo de medio líquido que contiene proteosa peptona, almidón y sistemas amortiguadores (buffers). Los enriquecimientos suplementarios para el crecimiento de estreptococos del grupo B son proporcionados en un disco de papel de filtro que se deja gotear en forma aséptica en el medio de caldo antes de la inoculación. Se coloca un hisopado rectovaginal de la paciente en el medio después de la recolección y se sella bien el tubo con la tapa a rosca. Se incuba luego el caldo durante 6 a 24 horas a 35°C. Los estreptococos β -hemolíticos del grupo B viran el naranja del caldo Strep B Carrot a rojo en 6 a 24 horas, confirmando así su presencia en la muestra. Las pruebas de caldo que viran el rojo a naranja no necesitan ser subcultivadas para confirmar la presencia de estreptococos del grupo B; los tubos que no viran el naranja a rojo luego de la incubación deben ser subcultivados en agar sangre. Sólo los estreptococos del grupo B β -hemolíticos viran el naranja del caldo de Carrot a rojo; un cambio de color no ocurre fiablemente con las cepas no hemolíticas. En la actualidad, se evalúa esta prueba nueva para determinar si el sistema Strep B Carrot Broth es equivalente al método que utiliza caldo LIM con subcultivos en placas de agar sangre.

HIDRÓLISIS DE HIPURATO DE SODIO

Los estreptococos del grupo B también pueden hidrolizar el hipurato en sus componentes glicina y ácido benzoico. Para la prueba se inocula el microorganismo en caldo con hipurato de sodio y se incuba durante la noche a 35°C. Las células se centrifugan y se extrae el sobrenadante. Se agrega un reactivo con cloruro férrico (0,2 mL; $\text{FeCl}_3 \cdot \text{g H}_2\text{O}$, 12 g en 100 mL de solución acuosa de HCl al 2%) en el sobrenadante (0,8 mL), con formación de un precipitado pesado. Si el precipitado se man-

Cuadro 13-2 Criterios fenotípicos para la identificación presuntiva de estreptococos y enterococos de importancia clínica

MICROORGANISMO	HEMÓLISIS	BACITRACINA	SXT	PRUEBA DE CAMP	HIDRÓLISIS DE HIPURATO	LAP	PYR	ESCULINA DE BILIS	CRECIMIENTO, CALDO CON NaCl AL 6,5%	OPTOQUINA	SOLUBILIDAD DE BILIS
Estreptococos del grupo A	β	S	R	—	—	+	+	—	—	R	—
Estreptococos del grupo B	β , ninguna	R	R	+	+	+	—	—	V	R	—
Estreptococos de los grupos C, F y G	β	V	S	—	—	+	—	—	—	R	—
Enterococos del grupo D	α , β , ninguna	R	R	—	V	+	+	+	+	R	—
Estreptococos del grupo D, no enterococos	α , ninguna	R	S	—	—	+	—	+	—	R	—
Estreptococos viridans	α , ninguna	V	S	—	V	+	—	V	—	R	—
Neumococos	α	V	S	—	—	+	—	—	—	S	+

+: reacción positiva; —: reacción negativa; S: sensible; R: resistente; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidonil arilamidasa.

tiene luego de 10 minutos, hay ácido benzoico y la prueba de hidrólisis del hipurato es positiva. Como alternativa, puede agregarse reactivo de ninhidrina al sobrenadante para detectar glicina libre.⁵⁰⁶ Con este método, la aparición de un color azul intenso es positiva. Los estreptococos β -hemolíticos hipurato-positivos se informan como "presuntos estreptococos del grupo B por hidrólisis del hipurato".

PRUEBA DE BILIS ESCULINA

Esta prueba se utiliza para la identificación presuntiva de especies de *Enterococcus* y estreptococos del grupo D. En general, se realiza en agar inclinado o en una placa (protocolo 13-2). Los microorganismos que son bilis esculina positivos pueden crecer en presencia de bilis al 40% e hidrolizar la esculina. La mayoría de las especies de *Enterococcus* y los estreptococos del grupo D ennegrecen el medio de bilis-esculina dentro de las 24 horas (véase lámina en color 13-2F); algunas raras cepas pueden requerir una incubación de 48 horas antes de que se aprecie hidrólisis.¹⁹⁷ Se deben tomar precauciones en utilizar fórmulas de agar bilis esculina que contengan el requisito de bilis al 40%; los productos de algunos fabricantes contienen menos bilis que esta cantidad, lo que conduce a la identificación equivocada de algunos estreptococos viridans como estreptococos del grupo D o enterococos.

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL (CALDO DE NaCl AL 6,5%)

La prueba de tolerancia a la sal (caldo de NaCl al 6,5%) separa las especies de *Enterococcus* de los estreptococos no enterococos grupo D *S. bovis* y *S. equinus* (véase protocolo 13-4). Se inocula el microorganismo por identificar en un agar o caldo con base de infusión que contiene NaCl al 6,5%. Después de una incubación durante toda la noche, se observa el medio para detectar la presencia de crecimiento, lo que indica tolerancia a la sal al 6,5%. Las especies de *Enterococcus* serán tolerantes a la sal (véase lámina en color 13-2D); *S. bovis* no crece.

PRUEBA DE LA LEUCINA AMINOPEPTIDASA (LAP)

La producción de leucina aminopeptidasa (LAP), junto con PYR, es útil para identificar estreptococos, enterococos y algunos microorganismos similares a *Streptococcus*. Esta prueba se encuentra disponible como un ensayo de manchas en disco (Remel; Carr-Scarborough), como parte de un sistema de identificación presuntivo de tres pruebas (Remel BactiCard Strep) o en paneles de 4 horas o de toda la noche para la identificación de estreptococos (API Rapid Strep).³⁴¹ Se humedecen los discos y se coloca un inóculo importante del material de las colonias de una placa de agar (esto puede requerir que las placas con aislamientos de crecimiento muy lento se incuben 2 a 3 días antes de contar con un inóculo suficiente para la prueba). Después de 10 minutos, se agrega al disco una gota de reactivo para la detección. La aparición de color rojo en el disco después de 3 minutos señala una reacción LAP positiva; un color amarillo indica una prueba negativa y un color rosado se codifica como una prueba débilmente positiva. La prueba LAP es positiva para todos los estreptococos y enterococos, y estos últimos son PYR positivos.

PRUEBA DE LA PIRROLIDONIL ARILAMIDASA (PYR)

La prueba de hidrólisis de PYR (protocolo 1-6) es una prueba presuntiva tanto para estreptococos del grupo A como del

grupo D.³⁴² Reemplaza a la prueba de la bacitracina y a la prueba de tolerancia a la sal para estreptococos del grupo A y especies de *Enterococcus*, respectivamente. La enzima detectada se denomina pirrolidonil arilamidasa. Se inocula caldo que contiene PYR L-pirrolidonil- β -naftilamida) con el microorganismo y se incuba a 35 °C durante 4 horas. Durante este tiempo se hidroliza PYR. Luego se detecta β -naftilamida libre mediante el agregado del acoplador de colorante diazo, *N,N*-dimetilaminocinnamaldehído. Se desarrolla color rojo si PYR ha sido hidrolizado (véase lámina en color 13-2G). Esta prueba es altamente sensible y específica para los estreptococos del grupo A y la mayoría de las especies de *Enterococcus*. Existen varias adaptaciones de la prueba de hidrólisis de PYR en el comercio y proporcionan resultados rápidos (15 minutos o menos). Otros microorganismos (p. ej., la mayoría de los lactococos, *A. viridans*, *G. haemolysans*, los estreptococos con variantes nutricionales y algunos estafilococos) también son PYR positivos. Esta prueba está incluida con la hidrólisis de esculina y la leucina aminopeptidasa en el sistema BactiCard Strep® (Remel).

SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA

Se utiliza la sensibilidad a la optoquina (clorhidrato de etil-hidrocupreína) para diferenciar *S. pneumoniae* de los otros estreptococos viridans (véase protocolo 13-3). Como sucede con las pruebas de bacitracina y trimetoprim-sulfametoxazol, la prueba de sensibilidad a la optoquina se realiza en medios de agar sangre. Sin embargo, a diferencia de las otras dos pruebas, se deben medir las zonas de inhibición antes de la interpretación. Una zona de 14 mm o más ancha alrededor del disco de 6 mm indica sensibilidad a la optoquina e identifica al microorganismo como neumococo (véase lámina en color 13-2E). Si la zona es menor de 14 mm, se debe realizar una prueba de identificación alternativa (p. ej., serología o solubilidad en bilis) porque algunos estreptococos viridans no neumococos y aerococos pueden mostrar pequeñas zonas de inhibición. En general, los estreptococos viridans y los estreptococos del grupo D son resistentes a la optoquina. Una evaluación reciente de la prueba con 99 cepas clínicas de *S. pneumoniae* y 101 estreptococos viridans comunicó una sensibilidad y una especificidad del 99% y el 98%, respectivamente.⁵⁶³ Se han informado cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina, pero pocas veces se encuentran.^{355,706} Borek y cols. también comunicaron aislamiento de *Streptococcus viridans* con una zona de 18 mm de inhibición alrededor del disco de optoquina.¹¹⁵ La caracterización de cepas de *S. mitis* sensibles a la optoquina puso en evidencia la adquisición de genes de *S. pneumoniae* que codifican subunidades de H + ATPasa, que es la diana de la optoquina.⁶⁶⁴ Las cepas de *S. pneumoniae* que son resistentes a la optoquina tienen mutaciones puntuales en la subunidad a o c de la H + ATPasa y presentan CIM de optoquina que son 4 a 30 veces más altas que las de las cepas sensibles.⁷⁷⁶

PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS

La prueba de solubilidad en bilis es otra prueba para la identificación de *S. pneumoniae*. Puede realizarse en una suspensión del microorganismo en caldo o en solución fisiológica o directamente en una placa. Ambos procedimientos se describen en el protocolo 1-2. El desoxicolato, el reactivo de "bilis" utilizado en estos procedimientos, activa las enzimas autolíticas del microorganismo.

Pruebas comerciales de identificación presuntiva

Existen placas comerciales triples para la identificación presuntiva de estreptococos β -hemolíticos de los grupos A y B, estreptococos del grupo D y especies de *Enterococcus*. La Strep-ID Tri-Plate® (Remel) contiene tres compartimentos: un sector con agar sangre de carnero para la evaluación de hemólisis y la realización de las pruebas CAMP y de trimetoprim-sulfametoxazol, un sector con agar bilis esculina y un sector con medio PYR. Después de la inoculación y la incubación durante toda la noche, las pruebas se interpretan como se muestra en el cuadro 13-2 y en la lámina en color 13-2H.

Identificación serológica de estreptococos β -hemolíticos

El trabajo pionero de Rebecca Lancefield estableció las bases de la clasificación serológica de los estreptococos aislados en humanos. Esta clasificación se basa sobre la detección de antígenos de hidratos de carbono específicos de grupo de la pared celular del microorganismo. Los estreptococos agrupables que producen enfermedad en los seres humanos pertenecen a los grupos de Lancefield A, B, C, D, F y G. Con este esquema sólo se pueden clasificar los estreptococos β -hemolíticos y los microorganismos α -hemolíticos y no hemolíticos grupo D. Para detectar los antígenos de la pared celular de estos microorganismos, el antígeno de la pared celular debe ser extraído primero y luego solubilizado. Esto se puede lograr mediante la extracción con ácido (p. ej., ácido nítrico), la extracción en autoclave (método de Rantz-Randall) o por extracción enzimática. Una vez extraído, el antígeno puede detectarse mediante distintos métodos.

PRUEBA DE LA PRECIPITINA CAPILAR

En este método utilizado por Lancefield, se deposita en capas el antígeno extraído sobre los antisueros específicos de grupo en un tubo capilar.⁵⁹⁶ La formación de una reacción de precipitina en la interfaz extracto-antisuero proporciona la designación de grupo del microorganismo.

COAGLUTINACIÓN

En esta técnica, se hace reaccionar el extracto de antígeno con *S. aureus* sensibilizados con anticuerpos específicos de grupo. La aglutinación visible de los estafilococos cubiertos por el antisuero específico identifica el grupo de los microorganismos. Existen sistemas comerciales de coaglutinación (Phadebact Streptococcus®, Boule Diagnostics, Huddinge, Suecia; Meritec Strep®, Meridian Diagnostics, Cincinnati OH).

AGLUTINACIÓN DEL LÁTEX

Las pruebas de aglutinación del látex utilizan cuentas de látex de poliestireno como transportadores de antisueros específicos de grupo que se hacen reaccionar con el extracto del microorganismo. Se utilizan también ampliamente sistemas comerciales para este método (Patho-Dx Strep Grouping Kit®, Diagnostics Products, Los Angeles CA; Slidex Strep®, BioMérieux, Hazelwood MO; Meritec-Strep®, Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH).⁴⁵³ Los procedimientos de aglutinación del látex han reemplazado esencialmente a la técnica de extracción-precipitina capilar como método de referencia para el seroagrupamiento de los estreptococos β -hemolíticos (véase

lámina en color 13-3A). La evaluación correcta de la hemólisis es esencial para la fiabilidad de la prueba y se han comunicado reacciones cruzadas con otros microorganismos. Por ejemplo, Lee y Wetherall demostraron que algunas cepas de *S. pneumoniae* pueden dar reacciones cruzadas con el reactivo de látex de los estreptococos C.⁶¹² Este error puede ocurrir cuando los microorganismos se evalúan directamente en los frascos de hemocultivo sin determinar primero el carácter hemolítico de la cepa. Algunos de los reactivos comerciales también pueden tener dificultad para detectar el antígeno grupo D en especies de *Enterococcus*.⁹⁶⁶ Thompson y Facklam también comunicaron que el reactivo grupo B en los sistemas de reactivos de aglutinación del látex de varios fabricantes daban reacciones cruzadas con cepas de *S. porcinus*, que pueden aislarse en seres humanos y cerdos.^{337,955} En la University of Illinois, hemos aislado *S. porcinus* en varias muestras de hisopado rectovaginal remitidas para cribado de estreptococos del grupo B. Aunque estas cepas reaccionan con los reactivos de látex del grupo B, los microorganismos forman colonias pequeñas con zonas claras muy grandes de β -hemólisis, lo cual es muy diferente de la β -hemólisis marginal blanda asociada con los estreptococos del grupo B.

Identificación serológica de *Streptococcus pneumoniae*

La identificación definitiva de *S. pneumoniae* comprende la detección serológica de polisacáridos capsulares neumocócicos utilizando antisueros específicos. Esto es complicado porque existen más de 83 serotipos capsulares diferentes. El omnisuero, un producto escandinavo, es capaz de detectar todos los serotipos neumocócicos. Este conjunto de antisueros se ha utilizado para crear pruebas comerciales de coaglutinación (Phadebact Pneumococcus®, Boule Diagnostics) y de aglutinación del látex (Pneumoslide®, BD Microbiology Systems; Slidex Pneumo®, BioMérieux) para una rápida identificación serológica de *S. pneumoniae* (véase lámina en color 13-3C). En una reevaluación reciente de ambos sistemas de prueba, la sensibilidad y la especificidad fueron del 99-100% y del 85,1-98%, respectivamente.⁵⁶³ La identificación específica y la asignación a un serotipo capsular individual se logra con la prueba de hinchazón capsular de Neufeld (Quellung).

La prueba de hinchazón capsular puede utilizar un conjunto de sueros y antisueros específicos de tipo (Pneumotest®, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca). Se prepara una suspensión diluida del microorganismo en solución salina fisiológica y se mezcla un ansa de la suspensión con un ansa de azul de metileno sobre un portaobjetos de vidrio. Se aplica un cubreobjetos de vidrio y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se examina el portaobjetos con el objetivo seco de gran aumento y con el de inmersión en aceite, con luz reducida. Debido a una reacción de microprecipitinas que ocurre sobre la superficie del microorganismo, cambia el índice refractario de la cápsula y adopta un aspecto "tumefacto" más visible, como un halo alrededor de las células bacterianas teñidas de azul (véase lámina en color 13-3B). También se puede observar una aglutinación microscópica de microorganismos, sobre todo con cepas muy encapsuladas. Se deben comparar los resultados de la prueba de hinchazón capsular microscópicamente con un preparado similar elaborado con solución salina fisiológica en lugar de antisueros.

También se puede utilizar Denka Seiken (Tokyo, Japón) una prueba comercial de aglutinación en portaobjetos para serotipificación neumocócica. Esta prueba cuenta con ocho reactivos polivalentes, cada uno de los cuales contiene antisueros para

cuatro a siete serotipos diferentes y se realiza sobre una suspensión de microorganismos preparada en una solución salina con buffer de fosfato. Si se observa aglutinación con uno de los reactivos polivalentes, se evalúan los serotipos de los individuos dentro del grupo para determinar el serotipo del microorganismo aislado. En una comparación reciente de la prueba Denka Seiken con la técnica Pneumotest Quellung, hubo una concordancia del 95,7% entre los dos métodos; los autores también observaron que esta prueba de aglutinación en portaobjetos era más fácil de realizar e interpretar.⁸⁹¹

Características bioquímicas para la identificación de estreptococos agrupables

La identificación de especies de estreptococos agrupables puede establecerse sobre la base de las características fisiológicas. Se utilizan varias de estas reacciones en los distintos sistemas comerciales para la identificación de estreptococos β -hemolíticos. Los métodos de identificación bioquímica también pueden permitir la detección de cepas aberrantes. Por ejemplo, Brand y cols. aislaron tres cepas de estreptococos β -hemolíticos en hemocultivos que tenían el antígeno grupo A, pero fueron identificadas como *S. dysgalactiae* subespecie *equisimilis* mediante pruebas de fenotipificación y secuenciación de rDNA 16S.¹²⁹ Estas cepas eran acetoina negativas y PYR negativas, al contrario de los estreptococos del grupo A. Aunque la mayoría de los laboratorios clínicos que manejan muestras provenientes de seres humanos utilizan métodos serológicos para la identificación de estos microorganismos, los microbiólogos veterinarios pueden hallar útiles estas pruebas porque no se consiguen fácilmente antiseros de Lancefield para grupos distintos de A, B, C, F y G. En el cuadro 13-3 se presentan las características fenotípicas para la identificación de estreptococos agrupables.

Identificación de estreptococos viridans

Los estreptococos viridans distintos de *S. pneumoniae* comprenden varias especies de microorganismos α -hemolíticos y no hemolíticos (véanse cuadro 13-4 y lámina en color 13-4F). Al contrario de los estreptococos β -hemolíticos humanos, estos microorganismos, con excepción de los miembros del grupo bovis, carecen de antígenos de grupo serológico de Lancefield específicos, aunque algunos pueden transportar antígenos que reaccionan en forma cruzada con estos antiseros. A diferencia de los neumococos, son resistentes a la optoquina e insolubles en bilis. En ciertas circunstancias, como en los casos de endocarditis y bacteriemia en pacientes con neutropenia, puede ser clínicamente útil identificar a estos microorganismos. Los individuos con daño valvular previo pueden tener episodios recurrentes de endocarditis y sufrir recaídas después de un tratamiento insuficiente. El conocimiento del microorganismo aislado y de su sensibilidad a los antibióticos puede ayudar a evitar problemas como fracasos terapéuticos, reinfecciones y tolerancia a los antibióticos.

La aplicación de técnicas moleculares y quimiotaxonómicas ha conducido a modificaciones importantes en la taxonomía de los estreptococos viridans y los enfoques de la identificación. Debido a la gran cantidad de estreptococos viridans reconocidos, los métodos de identificación fenotípica comprenden la realización de algunas pruebas bioquímicas y enzimáticas.¹⁰⁴⁷ La mayoría de los laboratorios que intentan identificar a este microorganismo utilizan uno o más sistemas comerciales para este objetivo (véase lámina en color 13-4F, G y H). Lamen-

tablemente, las bases de datos de los distintos sistemas comerciales no se actualizan con la suficiente frecuencia como para identificar en forma fiable especies más nuevas y a menudo se requieren otras pruebas. Estos sistemas utilizan pruebas convencionales modificadas y sustratos cromogénicos y fluorogénicos novedosos para la detección de actividades enzimáticas preformadas, y estos enfoques se han convertido en una parte estándar de las series de pruebas utilizadas para la identificación de estas bacterias.^{378,566,1047} Los métodos no fenotípicos de caracterización de estos microorganismos, como la pirólisis-cromatografía de gases y la espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier, se han mostrado promisorios como métodos auxiliares de la identificación.^{377,993} Otros métodos moleculares y quimiotaxonómicos son la amplificación por PCR y la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas de especie, el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de genes rRNA 16S, el análisis de patrones electroforéticos de proteínas de células enteras y la espectrometría de masas.^{15,60,262,508,560,623,829,830,846,967,993} Sin embargo, ninguno de estos métodos se presta para su uso habitual en los laboratorios hospitalarios que tienen mucho trabajo. Por lo tanto, la identificación de estos microorganismos en laboratorios clínicos se basa aún sobre el uso de características fenotípicas claves.

Por conveniencia, los estreptococos viridans pueden ser ubicados en grupos sobre la base de características bioquímicas comunes. Estos grupos incluyen el **grupo sanguis**, el **grupo mitis**, el **grupo mutans**, el **grupo salivarius**, el **grupo anginosus** y el **grupo bovis**. Los microorganismos pueden ser asignados a estos grupos sobre la base de arginina dihidrolasa, hidrólisis de esculina, producción de acetoina (prueba VP), producción de ácido a partir de manitol y sorbitol, y presencia de ureasa (cuadro 13-4).

En 1991 y 1998, Beighton y cols., del Departamento de Microbiología Bucal del London Hospital Medical College publicaron esquemas amplios para la identificación fenotípica de los miembros reconocidos de estreptococos viridans.^{71,1047} Este esquema emplea pruebas convencionales de utilización de hidratos de carbono de 24 horas más una serie de sustratos ligados a 4-metilumbeliferilo para la determinación rápida (3 horas) de enzimas glucosídicas. El cuadro 13-5 se basa sobre las descripciones taxonómicas de especies viridans presentadas por Beighton y otros.^{71,376,1047} La clave dicotómica de la figura 13-3 incorpora las pruebas de "agrupamiento" del cuadro 13-4 y otras pruebas del cuadro 13-5 para la identificación de especies individuales "típicas" dentro de un grupo. Hasta que se actualicen las bases de datos de los sistemas comerciales individuales para incluir las especies y las pruebas más nuevas, los microbiólogos deberán utilizar un enfoque de "el que mejor se ajusta" para la identificación de especie de los estreptococos viridans.

GRUPO SANGUIS

El grupo de los estreptococos viridans incluye tres especies que se encuentran en la cavidad bucal humana: *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. gordonii* y *S. sinensis*. Aunque algunos investigadores consideran que estas especies forman parte del grupo mitis sobre la base de los estudios de secuencia rRNA 16S, pueden diferenciarse fácilmente desde el punto de vista fenotípico de ese grupo por sus reacciones positivas para arginina dihidrolasa e hidrólisis de esculina.⁵⁵⁸ *S. parasanguis* se describió en 1990 y ha sido aislado en muestras de cultivos faríngeos humanos, sangre y orina.¹⁰⁴⁹ *S. sanguis* puede ser

Cuadro 13-3 Características fenotípicas para la identificación de los estreptococos β -hemolíticos

ESPECIES	GRUPO DE LANCEFIELD	BAC	SXT	PRUEBA DE CAMP	LAP	PYR	ADH	ESC	HIDRÓLISIS DE HIPURATO	ACETOÍNA	HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	PAL	α -GAL	β -GUR	ÁCIDO PRODUCIDO A PARTIR DE							
															GLU	LAC	MNTL	RAF	RIB	SAL	SORB	TRE
<i>S. pyogenes</i>	A	S	R	—	+	+	+	V	—	—	—	+	—	V	+	+	—	—	—	+	—	+
<i>S. agalactiae</i>	B	R	R/S	+	+	—	+	—	+	—	—	+	V	V	+	V	—	—	+	V	—	+
<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>dysgalactiae</i>	C	R	S	—	+	—	+	V	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—	+	V	V	+
<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	A, C, G, L	R	S	—	+	—	+	+	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—	+	V	—	+
<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	C	R	S	—	+	—	+	V	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—
<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	C	R	S	—	+	—	+	V	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	V
<i>S. canis</i>	G	R	S	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	ND	—	+
<i>S. phocae</i>	C, F	S	S	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, ninguno	R	S	+	+	+	+	+	V	+	—	+	—	+	+	V	+	—	+	+	+	+
<i>S. iniae</i>	Ninguno	R	S	+	+	+	—	+	—	—	+	ND	—	ND	+	+	+	—	+	+	—	+
<i>S. didelphis</i>	Ninguno	R	S	—	+	—	+	—	+	—	—	+	V	+	+	V	—	V	+	—	—	+
<i>S. urinalis</i>	Ninguno	R	S	—	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	+	+	ND	ND	+	ND	—	+

+: reacción positiva; -: reacción negativa; ND: datos no disponibles; V: reacción variable; BAC: bacitracina, disco de 0,04 unidades; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidonil arilamidasa; ADH: arginina dihidrolasa; ESC: hidrólisis de esculina; PAL: fosfatasa alcalina; α -GAL: α -galactosidasa; β -GUR: β -glucuronidasa; Glu: glucosa; Lac: lactosa; Mnt: manitol; Raf: rafinosa; Rib: ribosa; Sal: salicina; Sorb: sorbitol; Tre: trehalosa; R: resistente; S: sensible.

Cuadro 13-4 Diferenciación fenotípica de los grupos de estreptococos viridans hallados en seres humanos							
GRUPO VIRIDANS	ADH	HIDRÓLISIS DE ESCULINA	ACETOÍNA (VP)	MANITOL	SORBITOL	UREASA	MIEMBROS DEL GRUPO
Grupo Sanguis	+	+	–	–	–	–	<i>S. sanguis</i> (<i>S. sanguinis</i>), <i>S. parasanguis</i> (<i>S. parasanguinis</i>), <i>S. gordonii</i> , <i>S. sinensis</i> (VP+)
Grupo Mitis	–	–	–	–	–	–	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. crista</i> (<i>S. cristatus</i>), <i>S. peroris</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. australis</i> , <i>S. oligofermentans</i>
Grupo Mutans	–	+	+	+	+	–	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. ratti</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. ferus</i> y <i>S. hyovaginalis</i>
Grupo Salivarius	–	V	V	–	–	V	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. infantarius</i> , <i>S. alactolyticus</i> , <i>S. hyointestinalis</i> y <i>S. thermophilus</i>
Grupo Anginosus	+	+	+	–	–	–	<i>S. intermedius</i> , subespecies de <i>S. constellatus</i> , <i>S. anginosus</i>
Grupo Bovis	–	+	+	V	–	–	<i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i> , subespecies de <i>S. gallolyticus</i> , subespecies de <i>S. infantarius</i> , <i>S. alactolyticus</i>
+, reacción positiva; –, reacción negativa; V, reacción variable.							

dividido en tres biotipos sobre la base de las pruebas fenotípicas (cuadro 13-5). *S. sinensis* es un nuevo *Streptococcus* α -hemolítico que fue aislado en la sangre de un paciente con endocarditis en 2002.¹⁰⁷¹ Este microorganismo está más estrechamente relacionado con *S. gordonii*.

GRUPO MITIS

Estos estreptococos α -hemolíticos se encuentran en la cavidad bucal. *S. mitis* es una de las especies aisladas con mayor frecuencia en los hemocultivos y tiene cierta importancia debido a su resistencia emergente a la penicilina y a otros β -lactámicos. El análisis de varios investigadores de cepas similares a *S. sanguis* condujo a la descripción de *S. gordonii* y *S. oralis*.⁵⁶⁸ Aunque relacionado genotípicamente con otros microorganismos del grupo mitis, *S. gordonii* se asemeja fenotípicamente a los microorganismos del grupo sanguis (arginina dihidrolasa positivos y a menudo hidrólisis de esculina positivos). *S. crista*, una especie bastante nueva que ha sido aislada en la cavidad bucal humana,⁴⁵⁶ es inusual porque tiene penachos laterales de fibrillas cortas sobre la superficie celular que ayudan al microorganismo a congregarse con otros en la placa dental. *S. peroris*, *S. australis*, *S. infantis* y *S. oligofermentans* son miembros nuevos del grupo mitis y se encuentran en los dientes y en la nasofaringe.^{559,1058} *S. orisratti* se encuentra en la cavidad bucal de ratas Sprague-Dawley debido a su similitud bioquímica con otros miembros del grupo mitis. Esta especie es atípica porque tiene el antígeno carbohidrato del grupo A de Lancefield.¹⁰⁹⁵

GRUPO MUTANS

El grupo mutans incluye estreptococos bucales que se encuentran en seres humanos y en distintas especies animales (recuadro 13-2). Como ya se mencionó, las especies del grupo mutans eran originariamente serotipos de *S. mutans* que luego fueron elevados a la condición de especie. *S. mutans* y *S. sobrinus* son las especies aisladas con mayor frecuencia en seres humanos.⁷³ *S. hyovaginalis* también está incluido en el grupo mutans debido a su senejanza bioquímica con otros estreptoco-

cos del grupo mutans, pero esta especie forma parte de la flora normal del aparato genital de los cerdos.²⁷⁹

GRUPO SALIVARIUS

Entre las especies en el grupo salivarius, sólo *S. salivarius*, *S. vestibularis* y *S. infantarius* han sido aislados en muestras clínicas humanas. *S. salivarius* y *S. vestibularis* se encuentran en la cavidad bucal humana, mientras que *S. infantarius* ha sido aislado en seres humanos y productos alimenticios.^{853,1052} Las cepas de *S. infantarius* también están incluidas en el grupo bovis porque algunas son bilis esculina positivas e hidrólisis de esculina positivas. *S. alactolyticus* también está estrechamente relacionada con microorganismos del grupo bovis y se encuentra en distintas especies de aves y en cerdos. *S. hyointestinalis* es una especie del grupo salivarius que se encuentra en el intestino de cerdos y *S. thermophilus* se aísla en productos lácteos.²⁷⁸ En el grupo salivarius, todas las cepas de *S. vestibularis* y algunas cepas de *S. salivarius* producen ureasa.

GRUPO ANGINOSUS

Las tres especies que componen el grupo anginoso de estreptococos –*S. anginosus*, subespecies de *S. constellatus* y *S. intermedius*– producen colonias “puntiformes” en agar sangre y pueden ser β -hemolíticas, α -hemolíticas o no hemolíticas. Una proporción mayor de cepas de *S. intermedius* son no hemolíticas, y las cepas de *S. constellatus* a menudo son β -hemolíticas. En las cepas β -hemolíticas, el tamaño de la zona hemolítica es varias veces el diámetro de la colonia. Además del tamaño de la colonia, otro indicio de que una cepa puede ser miembro de este grupo es la presencia de un olor dulce que ha sido descrito como “acaramelado” o a “madreselvas”. Este olor se debe a la producción del metabolito diacetilo.¹⁸⁴ Las cepas pueden portar los antígenos A, C, F o G o pueden ser no agrupables. El crecimiento de estos microorganismos aumenta por la incubación en un medio enriquecido con CO₂ y algunas cepas pueden requerir incubación en condiciones anaerobias para un crecimiento óptimo. Como sucede con todos los estreptococos, estos microor-

Cuadro 13-5 Características fenotípicas para la identificación de las especies de grupo Mitis, grupo Mutans y grupo Salivarius de los estreptococos viridans aislados en seres humanos

GRUPO/ESPECIES	HEM SBO	ESC	ADH	VP	URE	ÁCIDO PRODUCIDO A PARTIR DE:																	
						GLU	MAL	SUC	LAC	MNTL	MANN	SORB	ARAB	INU	MEL	RAF	RIB	SAL	TRE	STA	GLYC	GLYG	AMGD
Grupo Sanguis																							
<i>S. sanguis</i> biotipo 1	α	+	+	-	-	+	+	ND	+	-	ND	V-	ND	V-	+	+	-	+	+	ND	-	ND	-
<i>S. sanguis</i> biotipo 2	α	+	+	-	-	+	+	ND	+	-	ND	V+	ND	-	V+	+	-	+	+	ND	-	ND	+
<i>S. sanguis</i> biotipo 3	α	-	+	-	-	+	+	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	V-	-	+	+	ND	-	ND	-
<i>S. parasanguis</i>	α	V-	+	-	-	+	+	ND	+	-	ND	V-	ND	-	V+	V+	ND	V+	V+	ND	ND	ND	V-
<i>S. gordonii</i>	α	+	+	-	-	+	+	ND	+	-	ND	-	ND	+	V-	V-	-	+	+	-	-	ND	+
<i>S. sinensis</i>	α	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ND	-	ND
Grupo Mitis																							
<i>S. mitis</i>	α	-	-	-	-	+	+	ND	V+	-	ND	V-	ND	V-	V+	V+	V-	V-	V-	ND	ND	+	-
<i>S. oralis</i>	α	V-	-	-	-	+	+	ND	+	-	ND	-	ND	-	V+	V+	V+	-	V-	ND	-	ND	-
<i>S. crista</i>	α	-	V+	-	-	+	+	ND	V+	-	ND	-	-	-	-	-	-	ND	+	ND	ND	ND	-
<i>S. peroris</i>	α	-	-	-	-	+	+	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	-
<i>S. infantis</i>	α	-	-	-	-	+	+	+	V+	-	ND	-	-	V-	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	-
<i>S. australis</i>	α	ND	+	-	-	+	+	+	+	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	ND
<i>S. oligofermentans</i>	α	-	-	-	-	+	+	+	V	-	+	-	-	-	-	V	-	-	V	-	ND	-	-
Grupo Mutans																							
<i>S. mutans</i>	α, γ	+	-	+	-	+	+	+	+	+	ND	+	ND	+	V+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>S. sobrinus</i>	γ, α	-	-	+	-	+	+	+	V+	V+	ND	V-	ND	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Grupo Salivarius																							
<i>S. salivarius</i>	γ, α	+	-	V+	V+	+	ND	ND	+	-	ND	-	-	V+	V-	V+	ND	+	V	ND	-	ND	V
<i>S. vestibularis</i>	α	V+	-	+	+	+	+	ND	V+	-	ND	-	ND	-	-	-	-	+	V	ND	ND	ND	V+

(Continúa)

Cuadro 13-5 Características fenotípicas para la identificación de las especies de grupo Mitis, grupo Mutans y grupo Salivarius de los estreptococos viridans aislados en seres humanos (cont.)

GRUPO/ESPECIES	PRODUCCIÓN DE:										
	α -GAL	β -GAL	α -GLU	β -GLU	β -GUR	NAGA	α -ARAB	α -FUC	β -FUC	NAGALA	PAL
Grupo Sanguis											
<i>S. sanguis</i> biotipo 1	V+	—	—	V	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. sanguis</i> biotipo 2	+	V—	—	+	—	V—	—	—	+	—	—
<i>S. sanguis</i> biotipo 3	—	+	—	V	—	+	—	—	V+	—	—
<i>S. parasanguis</i>	+	+	+	V—	—	+	V—	V—	V—	+	+
<i>S. gordonii</i>	V—	V—	V—	+	—	+	—	+	—	V+	+
<i>S. sinensis</i>	—	—	ND	+	—	ND	ND	ND	ND	ND	—
Grupo Mitis											
<i>S. mitis</i>	V+	V—	V+	V+	—	—	—	—	V+	—	V+
<i>S. oralis</i>	V—	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+
<i>S. crista</i>	—	V—	—	—	ND	+	—	+	—	+	—
<i>S. peroris</i>	—	—	ND	—	—	—	ND	—	—	ND	V
<i>S. infantis</i>	—	+	ND	—	—	V+	ND	V	V	ND	—
<i>S. australis</i>	—	—	ND	—	—	—	ND	ND	ND	ND	+
<i>S. oligofermentans</i>	V—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—
Grupo Mutans											
<i>S. mutans</i>	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. sobrinus</i>	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Grupo Salivarius											
<i>S. salivarius</i>	V—	+	V+	V+	ND	—	+	V+	V+	—	V+
<i>S. vestibularis</i>	—	+	V+	—	ND	—	+	—	—	—	—

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; V+: reacción variable, la mayoría de cepas positivas; V—: reacción variable, mayoría de cepas negativas; ND: datos no disponibles; Hem SBA: hemólisis en agar sangre de carnero; ESC: hidrólisis de esculina; ADH: arginina dihidrolasa; VP: producción de acetoina; URE: ureasa; GLU: glucosa; MAL: maltosa; SUC: sacarosa; LAC: lactosa; MNTL: manitol; MANN: mannososa; SORB: sorbitol; ARAB: arabinosa; INU: inulina; MEL: melibiosa; RAF: rafinosa; RIB: ribosa; SAL: salicina; TRE: trehalosa; STA: almidón; GLY: glicerol; GLYC: glucógeno; AMGD: amigdalina; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; α -GLU: α -glucosidasa; β -GLU: β -glucosidasa; β -GUR: β -glucuronidasa; NAGA: N-acetil- β -D-glucosaminidasa; α -ARAB: α -arabinosidasa; α -FUC: α -fucosidasa; β -FUC: β -fucosidasa; NAGALA: N-acetil- β -D-galactosaminidasa; PAL: fosfatasa alcalina.

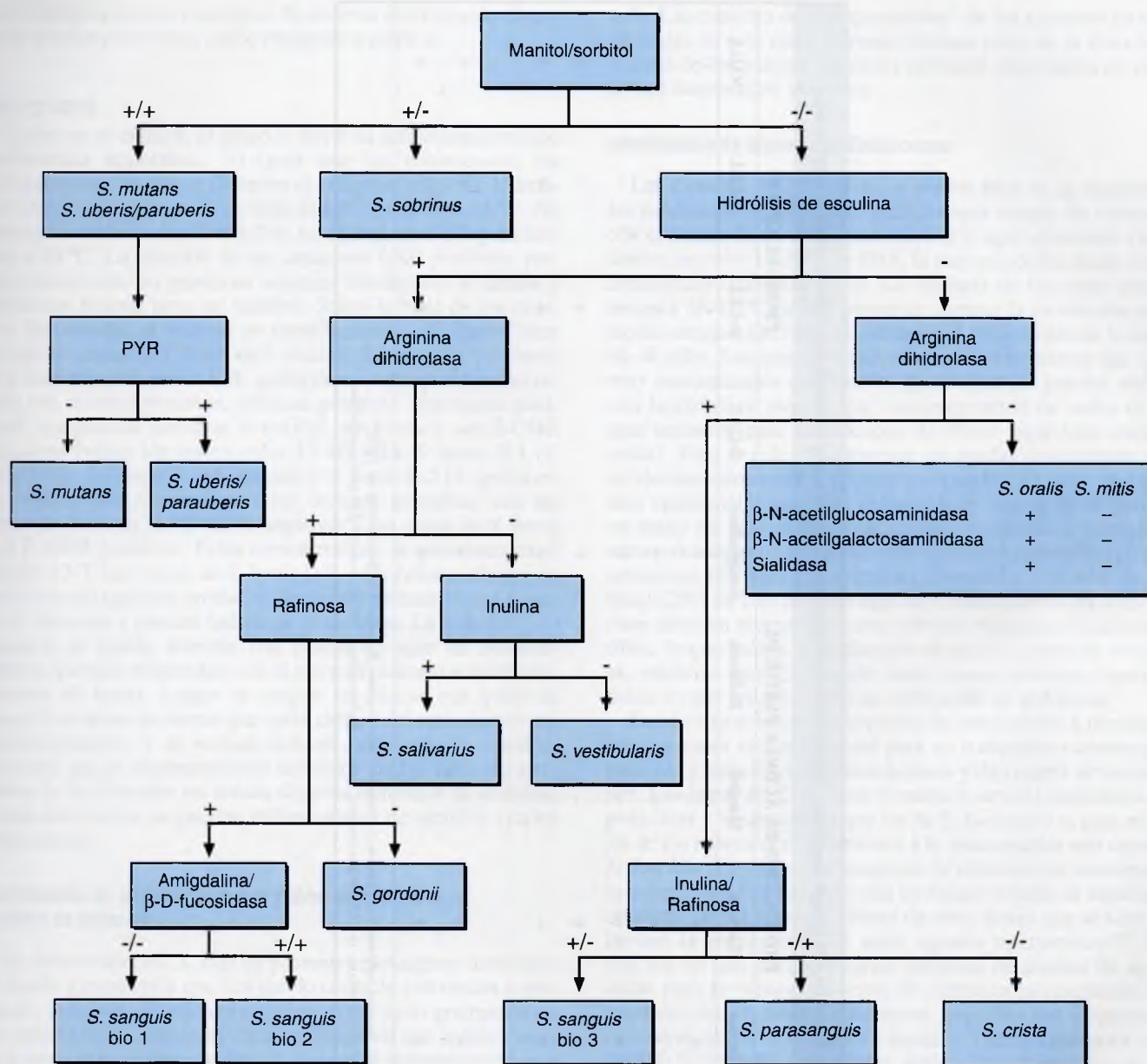


Figura 13-3 Organigrama para la identificación de estreptococos viridans.

ganismos son LAP positivos. Todas las especies en el grupo anginoso dan pruebas positivas de hidrólisis de esculina, arginina dihidrolasa y producción de acetoina y fosfatasa alcalina y son negativas las pruebas de hidrólisis de hipurato, ureasa y PYR. La especie individual puede ser diferenciada por las pruebas bioquímicas y enzimáticas que se muestran en el cuadro 13-6,^{1046,1050,1053} muchas de las cuales se encuentran en sistemas comerciales. Estos microorganismos están incluidos en las bases de datos de los sistemas comerciales (p. ej., API Rapid Strep, Rapid STR y los sistemas API ID32), aunque puede ser necesario realizar otras pruebas junto con el serogrupo de cepas β-hemolíticas. Hace poco, *S. constellatus* ha sido dividido en dos subespecies: *S. constellatus* subespecie *constellatus* y *S. constellatus* subespecie *pharyngis*.¹⁰⁵¹ Además de la identificación fenotípica, se han desarrollado ensayos con base molecular para la identificación de estos microorganismos.^{419,943}

Se demostró que las cepas de *S. anginosus* se encuadran en cinco ribogrupos estrechamente relacionados por su rRNA 16S y tienen una similitud mayor del 97% entre ellos.⁵²² Estos cinco grupos han sido designados cepas "similares a ATCC", cepas móviles y ribogrupos I, II y III. Las cepas similares a ATCC hibridaron con sondas de oligonucleótidos preparados a partir de *S. anginosus* ATCC 33397. El grupo móvil representó el 37,8% de las cepas de *S. anginosus* examinadas y el 83% de éstas fueron aisladas en el aparato urogenital como parte de la flora normal. Estas cepas de *S. anginosus* móviles fermentaron el manitol y la rafinosa, mientras que las de los otros grupos no lo hicieron. A menudo, *S. anginosus* ribogrupos I portaba el antígeno grupo C de Lancefield. Las cepas ribogrupos II se asociaron con infecciones abdominales y las ribogrupos III fueron aisladas en infecciones abdominales de tejidos blandos, de cabeza y cuello e infecciones urinarias. En la actualidad, no

Cuadro 13-6 Características fenotípicas para la identificación del grupo anginoso: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*

ESPECIE	HEMÓLISIS	GRUPOS DE LANCEFIELD	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE:					PRODUCCIÓN DE:			
			Glucosa	Lactosa	Manitol	Rafinosa	Amigdalina	β-GAL	α-GLU	β-GLU	NAGA
<i>S. anginosus</i>	β	A,C,F,G, ninguno	+	+	–	–	+	+	–	+	V
	no β	C,F,G, ninguno ^a	+	+	–	–	+	–	V	+	–
<i>S. constellatus</i> subespecie <i>constellatus</i>	β	F, ninguno	+	V	–	–	V	–	+	–	–
	no β	F, ninguno	+	V	–	–	V	–	+	–	–
<i>S. constellatus</i> subespecie <i>pharyngis</i>	β	C	+	+	–	–	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	β	Ninguno	+	+	–	–	+	+	+	V	+
	no β	Ninguno	+	+	–	–	+	+	+	V	+

^a Una variante móvil no hemolítica de *S. anginosus* que fermentaba lactosa, manitol, rafinosa y amigdalina y producía tanto α- como β-glucosidasa fue descrita en 1995.⁸³

+: reacción positiva; –: reacción negativa; V: reacción variable; β-GAL: β-galactosidasa; α-GLU: α-glucosidasa; β-GLU: β-glucosidasa; NAGA: N-acetil β-D-glucosaminidasa.

existe ningún criterio fenotípico fácilmente determinado disponible para separar estos cinco ribogrupos entre sí.

GRUPO BOVIS

Como ya se explicó, el grupo *S. bovis* ha sufrido una revisión taxonómica importante. Al igual que los enterococos, los estreptococos del grupo D tienen el antígeno grupo D, hidrolizan esculina en presencia de bilis al 40% y crecen a 45 °C. No crecen en caldo de NaCl al 6,5%, no hidrolizan PYR y no crecen a 10 °C. La mayoría de las cepas son LAP positivas, producen acetoina, no producen arginina dihidrolasa ni ureasa y acidifican lactosa pero no sorbitol. Sobre la base de los criterios fenotípicos, el sistema de identificación API Rapid Strep divide las cepas de *S. bovis* en *S. bovis* I, *S. bovis* II.1 y *S. bovis* II.2. Las cepas *S. bovis* I (*S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus*) son manitol positivas, rafinosa positivas, glucógeno positivas, amigdalina positivas y α -GAL positivas y son β -GUR negativas (véase lámina en color 13-4D y E). *S. bovis* II.1 (*S. infantarius* subespecie *infantarius*) y *S. bovis* II.2 (*S. gallolyticus* subespecie *pasteurianus*) son manitol negativas, con las cepas de *S. bovis* II.1 β -GUR negativas y las cepas de *S. bovis* II.2 β -GUR positivas. Estas características se presentan en el cuadro 13-7. Las cepas de *S. bovis* I (*S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus*) también producen dextranos extracelulares a partir de sacarosa y pueden hidrolizar el almidón. La hidrólisis del almidón se puede detectar con placas de agar de Mueller-Hinton que son sembradas con el microorganismo e incubadas durante 48 horas. Luego se irrigan las placas con yodo de Gram. Las áreas incoloras que están debajo del crecimiento del microorganismo y lo rodean indican hidrólisis de almidón, mientras que el mantenimiento del color azul o violáceo alrededor de las colonias no señala ninguna hidrólisis de almidón. Como alternativa, se pueden utilizar placas de almidón (varios fabricantes).

Identificación de *Streptococcus suis* y otros estreptococos aislados en animales

Se debe sospechar *S. suis* en pacientes con signos sistémicos de sepsis y meningitis que han tenido contacto con cerdos o productos porcinos. El microorganismo es un coco grampositivo, de aspecto típico, catalasa negativo e inmóvil que aparece solo, de a pares o en cadenas cortas. *S. suis* es α -hemolítico en agar sangre de carnero (β -hemolítico en agar sangre de caballo), resistente a la optoquina y no crece en caldo de NaCl al 6,5%. Algunas cepas crecen en presencia de bilis al 40% y todas pueden hidrolizar la esculina. *S. suis* se asemeja fenotípicamente a ciertos estreptococos viridans, sobre todo a *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *S. parasanguinis*. Las cepas humanas suelen ser del serotipo capsular 2 que reaccionan con anticuerpos contra el grupo R de Lancefield (Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca). También se puede lograr la tipificación capsular utilizando métodos moleculares mediante análisis de secuencia de genes *cps* capsulares.⁹⁰⁷ Otras características útiles para la identificación de *S. suis* se presentan en el cuadro 13-8.⁹⁴⁶ Este importante patógeno animal está incluido en la base de datos del sistema API Rapid Strep (véase explicación más adelante).

En el cuadro 13-8 también se presentan las características fenotípicas de los estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos y cepas relacionadas de distintas especies halladas en animales. Estas especies son *S. entericus*, *S. pluranimalium*, *S. uberis/parauberis*, *S. thoralensis*, *S. hyovaginalis*, *S. hyointestinalis*, *S. ovis*, *S. minor*, *S. gallinaceus* y *Eremococcus coleo-*

cola. Las especies del "grupo mutans" de los animales no están incluidas en este cuadro porque forman parte de la flora bucal normal de los animales y no es probable observarlas en infecciones humanas ni animales.

Identificación de especies de *Enterococcus*

Las especies de *Enterococcus* crecen bien en la mayoría de los medios bacteriológicos, incluido agar sangre de carnero al 5% colistina ácido nalidíxico (CNA) y agar chocolate (véase lámina en color 13-3E). En SBA, la mayoría de las cepas son no hemolíticas o α -hemolíticas. La mayoría de las cepas pueden crecer a 35-37 °C en aire ambiente, aunque la incubación en un medio enriquecido con CO₂ estimula el crecimiento de la mayoría de ellas. Las muestras que contienen enterococos que están muy contaminados con bacilos gramnegativos pueden aislarse con facilidad en medios que contienen azida de sodio (p. ej., agar selectivo para enterococos de Pfizer, agar bilis esculina azida). Ford y cols. describieron un medio denominado agar cefalexina-aztreonam-arabinosa que puede utilizarse para estudios epidemiológicos para detectar la presencia de *E. faecium* en heces de pacientes hospitalizados expuestos a infecciones enterocócicas graves.³⁶⁸ Este medio contiene arabinosa (10 g/L), aztreonam (75 mg/L), cefalexina (50 mg/L) e indicador de rojo fenol (2%) en una base de agar de Columbia (40 g/L). *E. faecium* crece en este medio como colonias blancas con halos amarillos, lo que indica la producción de ácido a partir de arabinosa, mientras que *E. faecalis* crece como colonias claras sin halos, lo que señala la falta de utilización de arabinosa.

La identificación de las especies de enterococos a menudo es útil y a veces es fundamental para un tratamiento correcto del paciente y para fines epidemiológicos y de control de infecciones. Las cepas de *E. faecium* tienden a ser más resistentes a la penicilina y la ampicilina que las de *E. faecalis* y la gran mayoría de los enterococos resistentes a la vancomicina son cepas de *E. faecium*. La detección temprana de enterococos resistentes a la vancomicina en los pacientes en riesgo permite la institución oportuna de prácticas de control de infecciones que se sabe que limitan la propagación de estos agentes oportunistas.⁴⁹⁵ Para este fin, se han utilizado varias fórmulas de medios de agar y caldo para la rápida detección de enterococos resistentes a la vancomicina en sitios anatómicos que albergan enterococos (muestras de heces, hisopados rectales) (véase lámina en color 13-3H).^{507,598,838} El caldo para enriquecer el crecimiento de enterococos resistentes a la vancomicina se torna semiselectivo mediante el agregado de vancomicina a los medios, por lo general en una concentración de 6 μ g/mL; también se pueden agregar otros agentes selectivos (p. ej., clindamicina, aztreonam). Como algunas cepas de enterococos resistentes a la vancomicina pueden ser inhibidas por estas combinaciones de antibióticos, se sugiere el subcultivo del medio de caldo selectivo en medios de agar selectivo y no selectivo para optimizar el aislamiento de los resistentes.

La identificación de especies de *Enterococcus* se logra mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas (cuadro 13-9). La mayoría (80%) de las especies de *Enterococcus* reaccionan con antisuero contra el grupo D de Lancefield por precipitina capilar o aglutinación del látex; no se puede demostrar el antígeno grupo D en cepas de *E. pseudoavium*, *E. dispar*, *E. cecorum*, *E. sulfureus*, *E. columbae* y *E. saccharolyticus*. La mayoría de las especies de enterococos pueden crecer dentro de las 48 horas en caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), tanto a 10 °C como a 45 °C; sin embargo, *E. cecorum* y *E. columbae* no crecen a 10 °C y *E. sulfureus*, *E. malodoratus* y *E. dispar* no crecen a

Cuadro 13-7 Características fenotípicas para la identificación de los miembros del grupo “*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*”

[illegible]

Cuadro 13-8 Características bioquímicas para la identificación de *Streptococcus suis*, *Eremococcus coleocola* y otros estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos aislados en animales

CARACTERÍSTICA	<i>S. SUI</i> S	<i>S. ENTE- RICUS</i>	<i>S. PLURA- NIMALIUM</i>	<i>S. UBERIS/ PARAUBERIS</i>	<i>S. THORA- LENSIS</i>	<i>S. HYO- VAGINALIS</i>	<i>S. HYOIN- TESTINALIS</i>	<i>S. OVIS</i>	<i>S. MINOR</i>	<i>S. GALLI- NACEUS</i>	<i>E. COLEO- COLA</i>
Hemólisis, SBA	α	α	α	α , ninguno	α	α	α	α	α	α	α
Crecimiento a 10 °C	–	–	–	ND	–	–	ND	ND	ND	ND	–
Crecimiento a 45 °C	–	–	+	ND	–	–	ND	ND	ND	ND	+
LAP	+	+	+	+	+	+ ^d	+	+	+	ND	–
PYR	ND	ND	–	+	–	–	–	ND	–	ND	ND
Crecimiento en agar BE	V	–	+	–/+ ^d	+	–	–	ND	+	ND	–
Crecimiento con NaCl al 6,5%	–	–	V	+	+	–	–	ND	ND	ND	+ ^d
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	–
ADH	+	–	–	+	+	–	–	V+	+	+	+
Hidrólisis de hipurato	–	–	+	+	V	+	–	–	–	–	+
Ureasa	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	V
Acetoína	–	–	–	V	+	+	+	–	ND	–	–
Motilidad	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Producción de ácido a partir de:											
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	–
Sacarosa	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	–
Lactosa	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	–
Manitol	–	–	V+	+	+	+	–	+	+ ^d	+	–
Melibiosa	V	–	ND	ND	V	–	ND	–	–	+	ND
Inulina	+	–	–	V	+	–	–	ND	V	ND	ND
Arabinosa	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Sorbitol	–	–	–	+	V	+	–	+	V	–	–
Almidón	ND	+	–	ND	+	–	+	ND	V	ND	ND
Rafinosa	V	–	ND	–	V	–	ND	+	V	+	ND
Ribosa	–	–	V	+	+	V	–	–	–	+	ND
Trehalosa	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Glucógeno	ND	+	–	ND	–	–	–	+	+	–	–

(Continúa)

45 °C. La mayoría de las especies de *Enterococcus* hidrolizan la esculina en presencia de bilis al 40% (prueba BE), crecen en caldo que contiene NaCl al 6,5% y son PYR positivas, aunque algunas especies también son negativas en estas pruebas (cuadro 13-9). Aunque *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies aisladas más comúnmente en muestras clínicas, la incidencia de las otras especies y su participación en procesos patológicos específicos se desconocen. Facklam y Collins han propuesto un método escalonado para la identificación de especies de *Enterococcus*.³³⁵ Las cepas que se ajustan a los criterios mencionados antes son inoculadas en varios medios de prueba y divididos en cinco grupos sobre la base de esas reacciones. Las especies individuales dentro de cada grupo se diferencian a su vez en especies separadas sobre la base de otras pruebas o características. En 1992, Knudtson y Hartman, de la Iowa State University, examinaron 59 cepas de 13 especies de *Enterococcus* con métodos convencionales y dos sistemas comerciales (el sistema API Rapid Strep y el panel MicroScan Pos ID) (véase lámina en color 13-3F y G).⁵⁸¹ Estos investigadores encontraron varias discrepancias entre las reacciones publicadas para las pruebas individuales, las reacciones en sus propias pruebas convencionales y los resultados de las pruebas individuales obtenidos con los dos sistemas comerciales. Utilizando combinaciones de distintas pruebas convencionales y de sistemas, estos investigadores también publicaron claves dicotómicas multifásicas para la identificación de los microorganismos. En la figura 13-4 se presenta un organigrama para identificar las especies de *Enterococcus* de importancia clínica.

Para la identificación de enterococos mediante procedimientos convencionales, se determinan las pruebas de fermentación de hidratos de carbono y de utilización de piruvato en medios con base de caldo de infusión de corazón que contienen violeta de bromocresol e hidratos de carbono esterilizados con filtro al 1% o piruvato al 1%. La desaminación de arginina se determina utilizando caldo con descarboxilasa de Moeller y la motilidad se determina en medios semisólidos para motilidad (véase lámina en color 13-4B). La detección del pigmento amarillo producido por *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y *E. mundtii* se logra recogiendo algo del crecimiento en un hisopo de Dacrón blanco y observando el material de las colonias en el hisopo para detectar un color amarillo o naranja-amarillo (véase lámina en color 13-4B). Cartwright y cols. observaron que el uso tanto de la prueba de motilidad como de detección de pigmento junto con un sistema de prueba comercial mejoraba mucho la fiabilidad y la exactitud de la identificación de los enterococos en el laboratorio clínico.¹⁶⁰

Muchos laboratorios se basan sobre los sistemas comerciales para la identificación de los enterococos. La mayoría de los sistemas comerciales descritos más adelante en este capítulo tienen muy buen rendimiento para la identificación de las especies más frecuentes. También se puede identificar con precisión el género de los enterococos mediante la prueba para *Enterococcus* AccuProbe (Gen-Probe), que utiliza una sonda de DNA oligomérica quimioluminescente marcada con éster de acridinio para detectar el rRNA del microorganismo diana.^{251,257} Esta prueba se puede realizar en cepas que crecen en agar o en el sedimento celular obtenido por centrifugación de un caldo de hemocultivo.²⁵⁷ También se han creado métodos genéticos y moleculares para la identificación de especies de *Enterococcus* y para la caracterización genotípica de sensibilidades de antibióticos derivados fenotípicamente e incluyen métodos de hibridación del DNA, electroforesis de campo eléctrico homogéneo de contorno limitado, ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado y PCR.^{296,306,413}

Identificación de especies de *Abiotrophia* y de *Granulicatella*

Se debe sospechar *A. defectiva* y las especies de *Granulicatella* cuando las tinciones directas de Gram de muestras o los hemocultivos positivos evidencian microorganismos estreptocócicos que no crecen en cultivo o subcultivo posterior. Los medios de hemocultivo comerciales contienen piridoxal y favorecen el crecimiento de estos microorganismos. El subcultivo en agar sangre y la colocación de una estría de estafilococos como se hace en la prueba satélite para especies de *Haemophilus* asegura el crecimiento de las variantes nutricionales de estreptococos en las adyacencias de la estría de estafilococos (véase lámina en color 13-3D). Como alternativa, se pueden colocar discos impregnados con piridoxal en la placa de subcultivo, con crecimiento ulterior de los microorganismos que aparecen como colonias satélites que rodean el disco. El agar chocolate comercial contiene piridoxal, de modo que estos microorganismos crecen en agar chocolate.

Cuando crecen en medios con suplemento de piridoxal (clorhidrato de piridoxal 10 mg por litro) o cisteína (100 mg de L-cisteína por litro), estos microorganismos pueden ser identificados con las pruebas bioquímicas que se muestran en el cuadro 13-10. Muchas de estas pruebas se encuentran en sistemas comerciales (p. ej., API Rapid Strep). Al igual que los estreptococos, estas dos especies son LAP positivas, pero al contrario de ellos, *A. defectiva* y las especies de *Granulicatella* son PYR positivas. Estos microorganismos son homofermentativos, con ácido láctico como único producto terminal de la fermentación de la glucosa. También son resistentes a la optoquina y sensibles a la vancomicina. Es necesario tener en cuenta que algunas cepas de estreptococos viridans (p. ej., *S. mitis*) también pueden mostrar variantes nutricionales.⁸⁸² Se describieron métodos moleculares de la identificación de estas especies con variantes nutricionales.^{738,821}

Identificación de especies de *Aerococcus* y de *Helcococcus*

El género *Aerococcus* contiene cinco especies: *A. viridans*, *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii* y *A. urinaehominis*, todas son α -hemolíticas en SBA y en cultivos en caldo crecen en pares, tétradas y en cúmulos pequeños. En los casos característicos, las cepas de *A. viridans* aparecen principalmente como tétradas en los frotis teñidos con Gram, mientras que las de *A. urinae* se presentan principalmente en cúmulos. En agar, las cepas de *A. viridans* forman grandes colonias semejantes a las de los enterococos. Todas las especies excepto *A. christensenii* crecen en NaCl al 6,5%; *A. sanguinicola* y algunos *A. viridans* crecen como colonias negras en agar BE. Las cepas de *A. viridans* son PYR positivas y LAP negativas, pero las de *A. urinae* y *A. christensenii* son PYR negativas y LAP positivas. *A. sanguinicola* es positiva para LAP y PYR, mientras que *A. urinaehominis* es negativa para ambas pruebas. En el cuadro 13-11 se proporcionan otras características fenotípicas de estas especies. Se han desarrollado ensayos basados sobre PCR y sonda de DNA para la identificación de *A. viridans* y *A. urinae*.^{9,429}

Otra especie similar a *Aerococcus* descrita recientemente es *Helcococcus kunzii*. A diferencia de la mayoría de los aerococos, el crecimiento de esta especie es variable en NaCl al 6,5% mientras que el suero o el Tween 80 lo estimulan. En el sistema API Rapid Strep, *H. kunzii* produce un perfil que se corresponde a una identificación "dudosa" de *A. viridans* (API perfil 4100413). Las cepas de *H. kunzii* son no hemolíticas y no crecen a 10 °C ni a 45 °C. El microorganismo es esculina positivo

Cuadro 13-9 Características fenotípicas para la identificación de *Enterococcus* y especies relacionadas

GRUPO/ESPECIES	ANTÍGENO GRUPO D	CRECI- MIENTO, AGAR BE	CRECI- MIENTO CON NaCl al 6,5%	CRECI- MIENTO A 10 °C	CRECI- MIENTO A 45 °C	LAP	PYR	MOT	PIGMENTO AMARILLO	ADH	HIP	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE:								
												GLU	MNTL	SORB	ARAB	SBTL	RAF	SAC	PYRV	MGP
Grupo I																				
<i>E. avium</i>	+	+	+	ND	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	+	ND	-	+	+	-	-	-	V	+	+	+	-	+	+	+	+	V
<i>E. pallens</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. pseudoavium</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. saccharolyticus</i>	-	ND	+	ND	ND	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterococcus</i> , especie CDC PNS-E3	-	-	+	+	-	+ ^d	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Grupo II																				
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	V	V	+	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	+	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	V	+	+	-	-
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+ ^d	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Enterococcus</i> , especie CDC PNS-E2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Especies de <i>Lactococcus</i>	-	-	V	+	-	V	V	-	V	V+	V	+	+	-	-	-	-	V	-	-
Grupo III																				
<i>E. dispar</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	V	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. durans</i>	+	+	+	ND	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. ratti</i>	+ ^d	+	+	+	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV																				
<i>E. asini</i>	+	+	-	V	V	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	V
<i>E. cecorum</i>	-	ND	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. sulfurous</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>E. phoeniculicola</i>	ND	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Enterococcus</i> especie CDC PNS-E1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Grupo V																				
<i>E. columbae</i>	-	+	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>E. canis</i>	ND	+	+	ND	ND	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	+	+	+	-	+	V	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Especies de <i>Vagococcus</i>	-	ND	+	+	-	+	+	+	-	V-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+

Agar BE: agar bilis esculina; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidónil arilamidasa; MOT: motilidad; ADH: arginina dihidrolasa; HIP: hidrólisis de hipurato; GLU: glucosa; MNTL: manitol; SORB: sorbosa; ARAB: arabinosa; SBTL: sorbitol; RAF: rafinosa; SAC: sacarosa; PYRV: piruvato; MGP: metil- α -D-glucopiranosida.

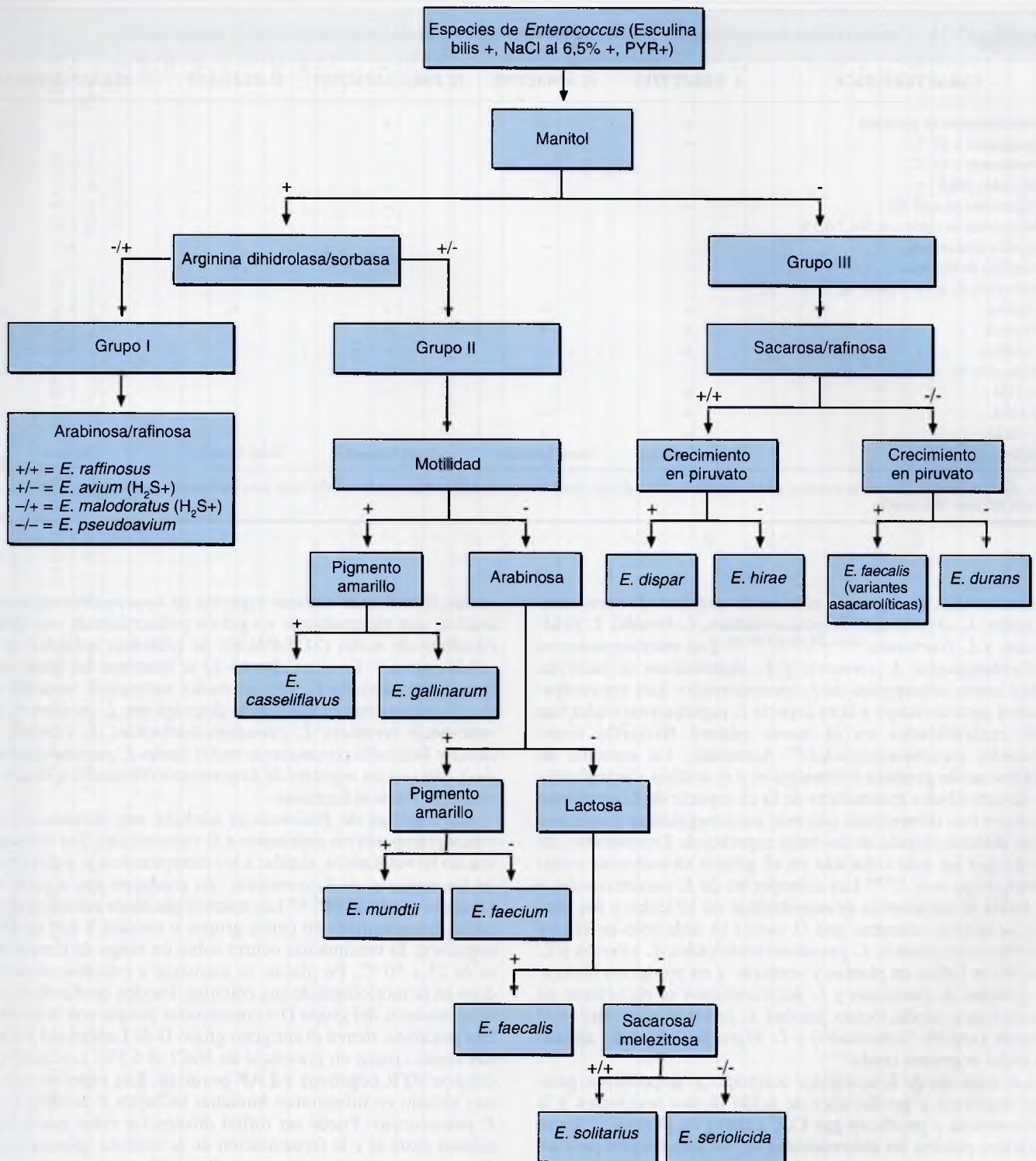


Figura 13-4 Organigrama para la identificación de especies de *Enterococcus* (adaptado de referencia³³⁵).

y PYR positivo, y LAP negativo, produce ácido a partir de glucosa, maltosa, lactosa, trehalosa y glucógeno, y no produce β -galactosidasa o β -glucuronidasa. Estos microorganismos suelen ser sensibles a penicilina, ampicilina y vancomicina. La especie humana *H. kunzii* se diferencia fácilmente de la especie ovina *H. ovis* mediante pruebas bioquímicas (cuadro 13-11).

Identificación de especies de *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*

El género *Leuconostoc* contiene varias especies: *L. mesenteroides* subespecie *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subespecie *cremoris*, *L. mesenteroides* subespecie *dextranicum*, *L. pseudo-*

Cuadro 13-10 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Abiotrophia defectiva* y *Granulicatella*

CARACTERÍSTICA	A. DEFECTIVA	G. ADIACENS	G. PARA-ADIACENS	G. ELEGANS	G. BALAENOPTERAE
Requerimientos de piridoxal	+	+	+	+	+
Crecimiento a 10 °C	—	—	—	—	—
Crecimiento a 45 °C	—	—	—	—	—
Gas, caldo MRS	—	—	—	—	—
Crecimiento en agar BE	—	—	—	—	—
Crecimiento en caldo con NaCl 6,5%	—	—	—	—	—
Arginina dihidrolasa	—	—	—	+	+
Hidrólisis de hipurato	—	—	—	+	—
Producción de ácido a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	—
Trehalosa	+	—	—	—	+
Producción de:					
α-GAL	+	—	—	—	—
β-GAL	+	—	—	—	—
β-GLU	—	+	—	—	—
Hábitat	Seres humanos	Seres humanos	Seres humanos	Seres humanos	Cetáceos

+: reacción positiva; —: reacción negativa; α-GAL: α-galactosidasa; β-GAL: β-galactosidasa; β-GLU: β-glucosidasa; MRS: caldo para *Lactobacillus de Mann-Rugosa-Sharpe*; agar BE: agar *bilis esculina*.

mesenteroides, *L. lactis*, *L. citreum*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. fallax*, *L. argentinum*, *L. gasicomitatum*, *L. kimchii*, *L. ficulneum* y *L. fructosum*.^{32,102,284,350,572,662,881} Los microorganismos antes designados *L. cremoris* y *L. dextranicum* se incluyen ahora como subespecies de *L. mesenteroides*. Los microorganismos pertenecientes a la ex especie *L. paramesenteroides* han sido reclasificados en el nuevo género *Weissella* como *Weissella paramesenteroides*.²²⁷ Asimismo, los estudios de secuenciación genética e hibridación y el análisis electroforético de actividades enzimáticas de la ex especie de *Leuconostoc* *L. oenos* han demostrado que este microorganismo forma una rama distinta alejada de las otras especies de *Leuconostoc*, de modo que ha sido colocado en el género *Oenococcus* como *Oenococcus oeni*.^{283,388} Las subespecies de *L. mesenteroides* y *L. lactis* se encuentran principalmente en la leche y los productos lácteos, mientras que *O. oenos* se aísla sólo en vino y hábitats relacionados. *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchii* se hallan en plantas y verduras, y en productos lácteos. *L. gelidum*, *L. carnosum* y *L. gasicomitatum* se encuentran en carnes (vaca, cerdo, tocino, jamón). *L. fallax* se encuentra en el chucrut (repollo fermentado) y *L. argentinum* ha sido aislado en leche argentina cruda.²⁸⁴

Las especies de *Leuconostoc* son cocos grampositivos, catalasa negativos y productores de ácido láctico resistentes a la vancomicina y producen gas CO₂ a partir de glucosa.³³⁸ Estas bacterias pueden ser diferenciadas de los lactobacilos productores de gas mediante un escrutinio cuidadoso de los frotis teñidos con Gram de caldo de tioglicolato (véase lámina en color 13-3E y F). Las especies de *Leuconostoc* no crecen a 45 °C y son arginina dihidrolasa negativas, PYR negativas y LAP negativas. Es mejor determinar la producción de gas a partir de glucosa en caldo para *Lactobacillus* MRS (Mann-Rogosa-Sharpe) (Difco Laboratories, Detroit, MI) recubierto con vaselina estéril. La formación de burbujas debajo del sello de vaselina indica producción de gas y confirma su metabolismo heterofermentativo. Las especies de *Leuconostoc* son identificadas a su vez por diversas pruebas bioquímicas (cuadro 13-12). También

se han identificado algunas especies de *Leuconostoc* mediante análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de proteínas solubles de la célula entera.³²³ En el cuadro 13-12 se muestran las características fenotípicas de *L. mesenteroides* subespecie *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subespecie *dextranicum*, *L. mesenteroides* subespecie *cremoris*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. lactis* y *Weissella paramesenteroides* (antes *L. paramesenteroides*), que son las especies de *Leuconostoc*/*Weissella* aisladas en muestras clínicas humanas.

Las especies de *Pediococcus* también son intrínsecamente cocos grampositivos resistentes a la vancomicina. Sin embargo, son no fermentativos, similar a los estreptococos y, a diferencia de las especies de *Leuconostoc*, no producen gas a partir de glucosa en caldo MRS.³³⁸ Los microorganismos aparecen como cocos grampositivos en pares, grupos y tétradas y son catalasa negativos. El crecimiento ocurre sobre un rango de temperatura de 25 a 50 °C. En placas, se asemejan a estreptococos viridans en la morfología de sus colonias. Pueden confundirse con estreptococos del grupo D o enterococos porque son bilis esculina positivos, tienen el antígeno grupo D de Lancefield y algunas cepas crecen en presencia de NaCl al 6,5%. Los *pediococos* son PYR negativos y LAP positivos. Las especies que se han aislado en infecciones humanas incluyen *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. Puede ser difícil diferenciar estos microorganismos entre sí y la fermentación de la maltosa —positiva para *P. pentosaceus* y negativa para *P. acidilactici*— constituye la prueba más fiable para la separación de los dos. Sin embargo, Tankovic y cols. señalaron que las dos especies podían ser separadas por la sensibilidad a la novobiocina.⁹⁴⁴ Las 25 cepas de *P. acidilactici* fueron sensibles a la novobiocina (diámetros de las zonas en discos de 5 mg, ≥ 16 mm), mientras que las nueve cepas de *P. pentosaceus* fueron resistentes (diámetros de la zona, ≤ 10 mm). Ambas especies son sensibles a β-lactámicos, clindamicina, rifampicina, eritromicina, gentamicina e imipenem y son resistentes a vancomicina, teicoplanina y fluoroquinolonas.⁹⁴⁴

Cuadro 13-11 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Aerococcus* y *Helcococcus*

CARACTERÍSTICA	<i>A. VIRIDANS</i>	<i>A. URINAE</i>	<i>A. SANGUINICOLA</i>	<i>A. CHRISTENSENII</i>	<i>A. URINAEHOMINIS</i>	<i>H. KUNZII</i>	<i>H. OVIS</i>
Disposición celular	Pares, tétradas, grupos	Pares, tétradas, grupos	Pares, tétradas, grupos	Pares, tétradas, grupos	Pares, tétradas, grupos	Pares, grupos	Pares, grupos
Hemólisis	α	α	α	α	α	Ninguna, α	Ninguna
Crecimiento a 10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	–	ND
Crecimiento a 45 °C	ND	ND	ND	ND	ND	–	ND
PYR	+	–	+	–	–	+	ND
LAP	–	+	+	+	–	–	+
Motilidad	–	–	–	–	–	–	–
Crecimiento en agar BE	V	–	+	–	–	–	ND
Crecimiento con NaCl 65%	+	+	+	–	+	V	ND
Hidrólisis de esculina	+	V	+	–	+	+	–
Hidrólisis de almidón	ND	ND	ND	ND	ND	V	–
Hidrólisis de hipurato	V	+	+	+	+	–	–
Arginina dihidrolasa	–	–	–	–	–	–	–
Ureasa	–	–	–	–	–	–	–
Fosfatasa alcalina	ND	–	ND	–	+ ^d	–	+
Acetoína	–	–	–	–	–	–	–
Ácido a partir de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	V+	–	+	–	+	+	V
Sacarosa	+	+	+	–	+	–	–
Lactosa	V+	–	V–	–	–	+	–
Manitol	V	+	–	–	–	–	–
Ribosa	V	+	+	–	+	–	–
Trehalosa	+	–	+	–	–	+	–
Arabinosa	ND	–	–	–	–	–	–
Rafinosa	ND	ND	–	–	–	–	–
Sorbitol	–	+	–	–	–	–	–
Glucógeno	+	–	–	–	–	V	V
α -GAL	ND	–	–	–	–	–	ND
β -GAL	+	–	–	–	–	–	V
β -GUR	–	+	+	–	+	–	–
α -GLU	ND	ND	–	ND	–	ND	ND
β -GLU	ND	–	–	–	V	+	–
NAGA	ND	ND	–	–	–	+	–

+; reacción positiva; –; reacción negativa; V; reacción variable; V+: variable, pero mayoría de cepas positivas; V–: variable, pero mayoría de cepas negativas; +^d; reacción positiva débil; ND: datos no disponibles; PYR: pirrolidonil arilamidasa; LAP: leucina aminopeptidasa; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; β -GUR: β -glucuronidasa; α -GLU: α -glucosidasa; β -GLU: β -glucosidasa; NAGA: N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

Cuadro 13-12 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Leuconostoc* aisladas en muestras clínicas humanas

CARACTERÍSTICA	<i>L. MESENEROIDES</i> SUBESPECIE <i>MESENEROIDES</i>	<i>L. MESENEROIDES</i> SUBESPECIE <i>DEXTRANICUM</i>	<i>L. MESENEROIDES</i> SUBESPECIE <i>CREMORIS</i>	<i>L. PSEUDOMESENEROIDES</i>	<i>L. CITREUM</i>	<i>L. LACTIS</i>	<i>WEISELLA</i> <i>PARAMESENEROIDES</i>
Hemólisis en SBO	—	—	—	—	—	—	—
Pigmento amarillo	—	—	—	—	+	—	—
Crecimiento a 10 °C	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
Crecimiento a 37 °C	V+	+	+	+	—	+	+
Crecimiento a 45 °C	—	—	—	—	—	—	—
LAP	—	—	—	—	—	—	—
PYR	—	—	—	—	—	—	—
Hidrólisis de esculina	+	V+	—	+	+	V—	V+
Dextrán a partir de sacarosa	+	+	—	ND	ND	—	—
Ácido producido a partir de:							
Amigdalina	V	V	—	V—	V+	—	—
Arabinosa	V+	—	—	V+	+	—	+
Celobiosa	V+	V	—	V+	+	—	V
Fructosa	+	+	V	+	+	+	+
Galactosa	V+	V	+	V+	V—	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	V	+	V	V	—	+	—
Maltosa	+	+	V—	+	+	+	+
Manitol	+	V	—	V—	V	—	+
Manosa	+	V	V	+	+	+	+
Melibiosa	+	V	V—	V+	—	V+	+
Rafinosa	V+	V	V—	V+	—	V+	V—
Ribosa	V+	ND	V—	+	—	—	+
Salicina	+	V	—	V	+	—	V—
Almidón	—	—	—	+	—	—	—
Sacarosa	+	+	V	V+	+	+	+
Trehalosa	+	+	V	+	+	V	+
Xilosa	+	V	V—	+	V—	—	—
Hábitat	Productos lácteos, vegetación	Productos lácteos	Productos lácteos	Plantas, productos lácteos	Plantas	Productos lácteos	Productos lácteos

+ : reacción positiva; — : reacción negativa; V+ : mayoría de cepas positivas, raras cepas negativas; V— : mayoría de cepas negativas, raras cepas positivas; V : reacción variable; ND : datos no disponibles; LAP : leucina aminopeptidasa; PYR : pirrolidonil arilamidasa.

Como ya se mencionó, *P. halophilus* es filogenéticamente más cercano a los enterococos y ha sido reclasificado en el género *Tetragenococcus* como *T. halophilus*. Según los datos que se mencionan en la descripción original de esta especie, *T. halophilus* característicamente crece como pares o tétradas (de ahí el nombre) y, en ocasiones, como grupos, no crece a 10 °C o a 45 °C, es inmóvil, crece en NaCl al 6,5% (en realidad crece hasta en NaCl al 10%) y en agar BE y es arginina dihidrolasa negativo. La mayoría de las cepas producen ácido a partir de arabinosa, glucosa, glicerol, maltosa, ribosa, sacarosa y trehalosa y no lo producen a partir de lactosa, manosa, manitol y sorbitol (véase cuadro 13-13). Al contrario de otros pediococos, *T. halophilus* es sensible a la vancomicina. *T. muriaticus* no se asocia con infecciones humanas.

Identificación de especies de *Gemella*

De las seis especies de *Gemella* que se describieron, cuatro—*G. haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. bergeriae* y *G. sanguinis*—han sido aisladas en muestras clínicas humanas. Las dos especies restantes—*G. palaticanis* y *G. cuniculi*—se encuentran en perros y conejos, respectivamente. Las especies de *Gemella* son cocos grampositivos, catalasa negativos que crecen característicamente como colonias puntiformes en SBA, que a menudo requieren 48 horas o más para el crecimiento de distintas colonias. La incubación en una atmósfera enriquecida con CO₂ estimula el crecimiento. Son α -hemolíticos o no hemolíticos, salvo por la especie animal *G. cuniculi*, que es β -hemolítico. En los frotis teñidos con Gram de cultivos en caldo, los microorganismos aparecen como células únicas, pares o cadenas cortas. Todas las especies de *Gemella* son PYR positivas, LAP positivas, inmóviles y no crecen a 10 °C ni a 45 °C. No crecen en agar BE, no hidrolizan la esculina, la urea, el almidón ni la gelatina y no crecen en caldo con NaCl al 6,5%. Las especies de *Gemella* pueden ser diferenciadas sobre la base de la formación de ácido a partir de maltosa, sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol y trehalosa. *G. haemolysans* y *G. morbillorum*, los aislamientos clínicos más frecuentes, también pueden ser diferenciados por reducción de nitrito. Debido a sus paredes celulares delgadas, *G. haemolysans* y *G. morbillorum* cambian fácilmente de color en la tinción de Gram y pueden aparecer como cocos gramnegativos en pares, en cúmulos y en

cadenas cortas. El crecimiento de algunas cepas se ve aumentado por la presencia de hidratos de carbono fermentables y por el agregado de Tween 80 a los medios de crecimiento. Debido a la cantidad limitada de aislamientos clínicos, el rendimiento de los sistemas para la identificación de estas bacterias no puede ser evaluado en forma crítica. Sólo se incluyen *G. haemolysans* y *G. morbillorum* en las bases de datos de los distintos sistemas comerciales en este momento. En el cuadro 13-14 se señalan las características fenotípicas para la identificación de especies de *Gemella*.

Identificación de especies de *Vagococcus*

El género *Vagococcus* incluye a *V. fluvialis*, aislada en humanos y animales, y a *V. salmoninarum*, *V. lutre* y *V. fessus*, aisladas en animales. El género *Vagococcus* fue descrito inicialmente como lactococos del grupo N móviles, y la cepa tipo es *V. fluvialis*. *V. fluvialis* es similar a *Streptococcus* en la morfología de sus colonias y es α -hemolítico o no hemolítico, facultativo y homofermentativo en su metabolismo, y catalasa negativo. En las tinciones de Gram, los microorganismos aparecen como células esféricas u ovoides, están dispuestos en pares o en cadenas. Según la descripción original de Collins y cols., *V. fluvialis* son cocos móviles que producen flagelos peritricosos. La motilidad puede demostrarse incubando el microorganismo en un medio para movilidad a temperatura ambiente. *V. fluvialis* es PYR positivo, LAP positivo e hidroliza esculina en presencia de bilis al 40% (cuadro 13-15).⁹⁵⁰ La mayoría de las cepas crecen a 10 °C, pero el crecimiento a 45 °C es variable. La mayoría de las cepas también crecen en NaCl al 6,5% y algunas producen acetoina.^{336,950} *V. fluvialis* produce ácido a partir de glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, ribosa y trehalosa, pero no de arabinosa, inulina, melibiosa o rafinosa (cuadro 13-15).⁹⁵⁰ Se han aislado cepas de *V. fluvialis* en cerdos, gatos y caballos; estas cepas fueron VP positivas, fosfatasa alcalina positivas y LAP positivas, y algunas fueron inmóviles.⁷⁸¹ Las cepas de *V. fluvialis* aisladas en muestras clínicas humanas son sensibles a ampicilina, cefotaxina, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina, y son resistentes a clindamicina y ofloxacina.⁹⁵⁰

V. salmoninarum se encuentra en peces enfermos, *V. lutre* en nutrias y focas y *V. fessus* en marsopas de modo que su aislamiento en muestras clínicas humanas es improbable. Las tres

Cuadro 13-13 Características para la identificación de especies de *Pediococcus* y *Tetragenococcus halophilus*

CARACTERÍSTICA	<i>P.</i> <i>ACIDILACTICI</i>	<i>P.</i> <i>PENTOSACEUS</i>	<i>P.</i> <i>DEXTRINICUS</i>	<i>P.</i> <i>DAMNOSUS</i>	<i>P.</i> <i>PARVULUS</i>	<i>P.</i> <i>INOPINATUS</i>	<i>T.</i> <i>HALOPHILUS</i>
Crecimiento a 45 °C	+	V	—	—	—	—	—
Ácido producido a partir de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	—	+	+	V	+	+	+
Arabinosa	V	+	—	—	—	—	+
Almidón	—	—	+	—	—	—	—
Glicerol	—	—	—	—	—	—	+
Melezitosa	—	—	—	V	—	—	+
Dextrina	—	—	+	—	—	V	—
Xilosa	+	V	—	—	—	—	—
Novobiocina	S	R	ND	ND	ND	ND	ND

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; ND: datos no disponibles; S: sensible a novobiocina (zona de disco de 5 mg, ≥ 16 mm); R: resistente a novobiocina (zona de disco de 5 mg, " 10 mm).

Cuadro 13-14 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Gemella*

CARACTERÍSTICA	<i>G.</i> <i>HAEMOLYSANS</i>	<i>G.</i> <i>MORBILLORUM</i>	<i>G.</i> <i>BERGERIAE</i>	<i>G.</i> <i>SANGUINIS</i>	<i>G.</i> <i>PALATICANIS</i>	<i>G.</i> <i>CUNICULI</i>
Hemólisis	Ninguna, α	Ninguna, α	Ninguna, α	Ninguna, β	Ninguna	β
Crecimiento a 10 °C	–	–	–	–	ND	ND
Crecimiento a 45 °C	–	–	–	–	ND	ND
PYR	+	+	+	+	ND	ND
LAP	+	+	+	+	ND	ND
Motilidad	–	–	–	–	–	–
Bilis esculina	–	–	–	–	ND	ND
Crecimiento con NaCl al 6,5%	–	–	–	–	ND	ND
Hidrólisis de esculina	–	–	–	–	–	–
Hidrólisis de hipurato	–	–	–	–	–	ND
Hidrólisis de almidón	–	–	–	–	ND	ND
Arginina dihidrolasa	–	–	–	–	–	–
Ureasa	–	–	–	–	–	–
Fosfatasa alcalina	V+	–	–	+	–	+
Acetoína (VP)	–	–	–	V	–	–
Producción de:						
α -GAL	–	–	–	–	–	–
β -GAL	–	–	–	–	–	–
α -GLU	ND	ND	ND	ND	ND	–
β -GLU	–	–	ND	ND	ND	–
β -GUR	–	–	–	–	ND	–
NAGA	ND	–	–	–	ND	–
Reducción de NO ₃	–	–	–	–	–	–
Reducción de NO ₂	+	–	ND	ND	ND	ND
Producción de ácido a partir de:						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	–/+ ^d	+	+	–
Sacarosa	V	+	–	+	+ ^w	–
Lactosa	–	–	–	V–	+	–
Manitol	–	V+	V–	+	–	+
Sorbitol	–	V+	–	+	–	+
Trehalosa	–	–	–	–	+	–
Hábitat	Seres humanos	Seres humanos	Seres humanos	Seres humanos	Caninos	Conejos

+: reacción positiva; –: reacción negativa; V: reacción variable; V+: reacción variable, pero mayoría de cepas positivas; –/+^d: mayoría de cepas negativas, cepas positivas producen reacciones débiles; ND: datos no disponibles; PYR: pirrolidonil arilamidasa; LAP: leucina aminopeptidasa; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; α -GLU: α -glucosidasa; β -GLU: β -glucosidasa; β -GUR: β -glucuronidasa; NAGA: N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

Cuadro 13-15 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Vagococcus*

CARACTERÍSTICA	<i>V. FLUVIALIS</i>	<i>V. SALMONINARUM</i>	<i>V. LUTRE</i>	<i>V. FESSUS</i>
Disposición celular	Solo, pares, cadenas cortas	Solo, pares, cadenas cortas	Solo, pares, cadenas cortas	Solo, pares, cadenas cortas
Hemólisis en SBO	α, γ	α, γ	ND	α
Crecimiento a 10 °C	V+	+	ND	ND
Crecimiento a 45 °C	V-	-	ND	ND
Motilidad	+	-	+	-
Catalasa	-	-	-	-
LAP	+	ND	ND	+
PYR	+	ND	ND	ND
Hidrólisis de esculina	+	+	+	ND
Crecimiento con NaCl al 6,5%	+	+	ND	ND
Arginina dihidrolasa	V	-	-	-
Hidrólisis de hipurato	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-
Crecimiento en agar BE	+	ND	ND	ND
H ₂ S en KIA	-	+	ND	ND
Acetoína	V	-	-	-
Fosfatasa alcalina	ND	ND	ND	V
Vancomicina	S	S	S	S
Producción de ácido a partir de:				
Glucosa/gas	+/-	+/-	+	+
Maltosa	+	+	+	-
Sacarosa	V	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	-
Sorbitol	+	-	+	-
Arabinosa	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	-
Trehalosa	+	+	+	-
Glucógeno	ND	-	-	-
Hidrólisis de:				
α -GAL	-	ND	+	-
β -GAL	V	ND	-/+ ^d	V
α -GLU	ND	ND	+	-
β -GLU	ND	ND	+	V
β -GUR	-	ND	-	-
NAGA	ND	ND	+	-
Hábitat	Agua, muestras clínicas humanas	Peces salmónidos	Otros	Focas, marsopas del puerto

+: reacción positiva; -: reacción negativa; +/-: reacción positiva débil; ND: datos no disponibles; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidonil arilamidasa; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; α -GLU: α -glucosidasa; β -GLU: β -glucosidasa; β -GUR: α -glucuronidasa; NAGA: N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

especies son cocos α -hemolíticos que aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas en los frotis teñidos con Gram de cultivos en caldo. Al contrario de *V. fluvialis* y *V. lutre*, *V. salmoninarum* es inmóvil y produce H_2S . *V. fluvialis* también produce ácido a partir de glicerol y sorbitol, mientras que *V. salmoninarum* no lo hace. *V. lutre* es inmóvil, pero puede ser diferenciado de *V. fluvialis* por sus reacciones positivas para α -galactosidasa y β -galactosidasa.⁶⁰⁸ Aunque la motilidad de *V. fessus* no se describió, esta especie puede ser diferenciada de *V. fluvialis*, *V. lutre* y *V. salmoninarum* por su incapacidad para producir ácido a partir de maltosa, ribosa, sacarosa o trehalosa. Tanto *V. salmoninarum* como *V. fluvialis* producen reacciones positivas con la prueba AccuProbe para *Enterococcus* (Gen-Probe). Los miembros del género *Vagococcus* no están incluidos en la base de datos de ninguno de los sistemas de identificación comerciales.

Identificación de especies de *Alloiococcus*, *Globicatella*, *Facklamia*, *Dolosigranulum*, *Ignavigranum* y *Dolosicoccus*

Los microorganismos incluidos en el género *Alloiococcus* y los géneros *Globicatella*, *Facklamia*, *Dolosigranulum* e *Ignavigranum* son especies similares a *Gemella* que pueden crecer en NaCl al 6,5% (cuadro 13-16). *A. otitidis*, el único miembro del género *Alloiococcus*, se aísla en muestras de timpanocentesis obtenidas del oído medio de niños con otitis media crónica, en hemocultivos y en esputo.⁶²⁰ El microorganismo crece lentamente en medios de agar, las colonias son visibles luego de 2 a 3 días y no crece en caldo de tioglicolato. Los frotis teñidos con Gram de medios de agar muestran cocos dispuestos en pares, tétradas y a veces en cúmulos. El crecimiento óptimo ocurre a 35 a 37 °C y requiere CO_2 , y no ocurre ningún crecimiento a 10 °C o 45 °C.⁶⁸⁸ Las colonias aparecen de color hueso, puntiformes y no hemolíticas, aunque se puede observar α -hemólisis y una pigmentación ligeramente amarilla después de varios días de incubación.¹¹⁸ Las cepas clínicas frescas de *A. otitidis* crecen en agar sangre, pero es posible que no crezcan en agar chocolate. El crecimiento exuberante en caldo que contiene Tween al 0,5% o lecitina al 0,07% sugiere que el microorganismo puede requerir lípidos para el crecimiento óptimo. Al contrario de los otros microorganismos considerados en este capítulo, *A. otitidis* es catalasa positivo; esta reacción puede ser muy débil o tardía. El microorganismo es aerobio más que facultativo y no produce ácido a partir de ningún hidrato de carbono. *A. otitidis* crece en agar bilis esculina pero no hidroliza la esculina y crece lentamente en caldo de NaCl al 6,5%. Se produce PYR, LAP y β -galactosidasa y algunas cepas hidrolizan el hipurato. Bosley y cols. realizaron estudios de sensibilidad a los antibióticos en 19 cepas de *A. otitidis* y observaron que todas eran resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y 18 eran resistentes a la eritromicina.¹¹⁸ Las CIM para penicilina y ampicilina fueron variables, con cepas sensibles y otras con resistencia intermedia (rango de CIM para penicilina, 0,06 a 0,12 $\mu g/mL$; rango de CIM para ampicilina, 0,12 a 0,5 $\mu g/mL$) y se observa el mismo grado de resistencia relativa para ceftriaxona y cefixima. Ninguna de las cepas que examinaron produjo enzimas β -lactamasas.¹¹⁸

G. sanguinis ha sido aislado en muestras humanas, incluidos sangre, LCR y orina. En los frotis teñidos con Gram de cultivos en caldo, estos microorganismos aparecen como cocos grampositivos en pares y cadenas cortas. Las colonias en agar sangre de carnero son similares a *Streptococcus* y son α -hemolíticas. Al igual que los enterococos, *G. sanguinis* es bilis esculina positivo, crece en NaCl al 6,5% y produce PYR; al contra-

rio de enterococos y estreptococos, no se produce LAP. *G. sanguinis* crece a 45 °C pero no a 10 °C.⁸⁸⁴ Estas reacciones también diferencian a *G. sanguinis* de otros estreptococos viridans en que las últimas especies son PYR negativas y LAP positivas y no crecen en caldo de NaCl al 6,5%. Se puede utilizar para estas determinaciones BactiCard STREP (Remel), que incluye las pruebas Rapid PYR, LAP e hidrólisis de esculina en formato de tarjeta. A diferencia de los aerococos, *G. sanguinis* produce cadenas características en medios de caldo en lugar de tétradas. Se debe determinar esta característica de crecimiento para diferenciar *G. sanguinis* de *A. viridans*, que como *G. sanguinis*, es LAP negativo, PYR positivo e hidrólisis de hipurato positivo. *G. sanguinis* produce ácido a partir de varios hidratos de carbono, incluidos glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, manitol, rafinosa y trehalosa; la producción de ácido a partir de arabinosa, ribosa y sorbitol es variable (cuadro 13-16). *G. sanguinis* se encuentra en la base de datos del sistema BBL Crystal Gram-Positive ID, pero no en la base de datos del API Rapid Strep, el RapID STR o los sistemas de identificación ID32.⁸⁸⁴ Utilizando los puntos de corte de CLSI para especies de *Streptococcus* distintas de *S. pneumoniae*, Shewmaker y cols. determinaron la sensibilidad a los antibióticos de 28 cepas de *G. sanguinis* y observaron que todas eran sensibles a la amoxicilina y la vancomicina y algunas tenían CIM de penicilina que caían en el rango intermedio.⁸⁸⁴ Se observó una sensibilidad variable a otros agentes, incluida cefotaxima (sensibilidad del 52%), cefuroxima (sensibilidad del 26%), meropenem (sensibilidad del 63%), eritromicina (sensibilidad del 52%), trimetoprim-sulfametoxazol (sensibilidad del 48%), clindamicina (sensibilidad del 70%) y tetraciclina (sensibilidad del 48%).

El patógeno bovino/ovino, *G. sulfidifaciens*, puede ser diferenciado fácilmente de *G. sanguinis*.⁹⁹¹ *G. sulfidifaciens* produce H_2S y β -glucuronidasa, mientras que *G. sanguinis* no lo hace. *G. sanguinis* también produce β -galactosidasa, fermenta el manitol e hidroliza el hipurato; *G. sulfidifaciens* produce reacciones negativas en estas tres pruebas.

Los miembros del género *Facklamia* son cocos grampositivos y catalasa negativos relacionados con las especies de *Globicatella* pero que son filogenéticamente distintos. Las especies aisladas en muestras clínicas humanas son *F. hominis*, *F. sourekii*, *F. ignava* y *F. languida*. *F. miroungae* y *F. tabacinalis* han sido aislados en elefantes marinos y en tabaco en polvo, respectivamente. En los frotis de caldo de tioglicolato teñidos con Gram, las especies de *Facklamia* aparecen como cocos grampositivos dispuestos en pares o cadenas cortas, excepto por *F. hominus*, que suele formar grupos. En SBA, las colonias suelen ser α -hemolíticas y similares a estreptococos viridans. Las especies de *Facklamia* no crecen en medios de bilis esculina, pero crecen en NaCl al 6,5%. Las especies de *Facklamia* no crecen a 10 °C ni a 45 °C y son LAP y PYR positivas (cuadro 13-16).

El género *Ignavigranum*, con su única especie, *I. ruoffiae*, fue descrito por primera vez en 1999. Esta especie crece principalmente como cadenas en caldo de tioglicolato y está estrechamente relacionada desde el punto de vista filogenético tanto con *F. hominis* como con *G. sanguinis*. *I. ruoffiae* es PYR y LAP positivo, crece en caldo de NaCl al 6,5% y no hidroliza la esculina. Algunas cepas son argina dihidrolasa positivas. Aunque la mayoría de las cepas de *F. hominis* también son arginina dihidrolasa positivas, esta especie es hidrólisis de hipurato positiva, mientras que *I. ruoffiae* es hipurato negativa (cuadro 13-16). Un rasgo característico de *I. ruoffiae* es el olor a "chucrut" producido por el microorganismo cuando crece en SBA.

Cuadro 13-16 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Globicatella*, *Alloiococcus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Dolosigranulum* y *Dolosicoccus*

CARACTERÍSTICA	<i>G. SANGUINIS</i>	<i>G. SULFIDI-FACIENS</i>	<i>A. OTITIDIS</i>	<i>F. HOMINIS</i>	<i>F. IGNAVA</i>	<i>F. SOUREKII</i>	<i>F. LANGUIDA</i>	<i>F. TABACINALIS</i>	<i>F. MIROUNGAE</i>	<i>I. RUOFFIAE</i>	<i>D. PIGRUM</i>	<i>D. PAUCIVORANS</i>
Disposición celular	Cadenas cortas, pares	Solo, pares, cadenas cortas	Pares, tétradas, grupos	Grupos, pares	Pares, cadenas cortas	Pares, cadenas cortas	Pares, cadenas cortas	Pares, células únicas, cadenas cortas	Pares, cadenas cortas	Células únicas, pares, grupos	Grupos, tétradas	Pares, cadenas cortas
Hemólisis en SBO	α	α	γ	α	γ	α	γ	α	α	γ	α	α
Crecimiento a 10 °C	—	ND	—	—	—	—	—	—	ND	—	—	—
Crecimiento a 45 °C	+	ND	—	—	—	—	—	—	ND	—	—	—
Motilidad	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Catalasa	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LAP	—	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PYR	V+	—	+	V+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	+	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Crecimiento en caldo con NaCl al 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Arginina dihidrolasa	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	ND
Hidrólisis de hipurato	+	—	V	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Ureasa	—	—	—	ND	—	—	—	—	+	+	—	—
Crecimiento en agar BE	+	—	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
H ₂ S en KIA	—	+	ND	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetoína (VP)	—	—	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fosfatasa alcalina	ND	—	ND	S	—	V	+	—	V	—	—	—
Vancomicina	S	S	S	—	S	S	S	S	S	S	S	S
Producción de ácido a partir de:												
Glucosa	+	+	—	—	+ ^d	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+ ^d
Sacarosa	+	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
Lactosa	V+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ ^d
Manitol	+	—	—	—	—	+	—	—	—	V	V	+ ^d
Sorbitol	V	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
Arabinosa	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	V	—
Melibiososa	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	—
Rafinosa	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Ribosa	V+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	+
Trehalosa	+	+	—	—	—	+	+	—	+	—	ND	—
Glucógeno	+	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	—
Hidrólisis de:												
α -GAL	ND	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—
β -GAL	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	V	—
α -GLU	ND	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—
β -GLU	V	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—
β -GUR	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NAGA	ND	ND	ND	ND	—	—	—	—	V+	—	V	—

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; +^d: reacción positiva débil; V+: variable, pero mayoría de cepas positivas; V—: variable pero mayoría de cepas negativas; ND: datos no disponibles; LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidonil arilamidasa; α -GAL: α -galactosidasa; β -GAL: β -galactosidasa; α -GLU: α -glucosidasa; β -GLU: β -glucosidasa; β -GUR: β -glucuronidasa; NAGA: N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

El género *Dolosigranulum* contiene una única especie, *D. pigrum*. En SBA, este microorganismo crece como pequeñas colonias α -hemolíticas blanco grisáceas. En las tinciones de Gram de caldo (tanto tioglicolato y, en el informe de un caso, medio para hemocultivo Organon-Teknika BacT/Alert FAN), este microorganismo aparece en pares, tétradas similares a *Gemella* y cúmulos.⁴⁵¹ Como las especies de *Facklamia*, *D. pigrum* es PYR y LAP positivo y crece en sal al 6,5%. Este microorganismo es hidrólisis de esculina positivo, pero esta reacción puede tardar varios días para desarrollarse. No se observa ningún crecimiento a 10 °C o a 45 °C o en agar BE (cuadro 13-16).

El género *Dolosicoccus*, con su único miembro, *Dolosicoccus paucivorans*, es un grupo nuevo que se basa sobre dos cepas aisladas en hemocultivos humanos. Este microorganismo es distinto de los géneros *Facklamia* y *Globicatella*, pero está relacionado filogenéticamente con ellos. Como el microorganismo explicado antes, *D. paucivorans* es PYR positivo, pero al contrario de estos otros, es LAP negativo, no crece en caldo de NaCl al 6,5% y aparece sobre los frotis de caldo teñidos con Gram como células únicas, en pares y en cadenas cortas. Al igual que *D. pigrum*, *D. paucivorans* no crece en medio BE ni tampoco a 10 °C o a 45 °C (cuadro 13-16).

Identificación de especies de *Lactococcus*

Debido a la semejanza superficial con los enterococos o los estreptococos viridans, estos microorganismos han sido mal identificados como estreptococos o enterococos atípicos en el laboratorio clínico. Los lactococos muestran muchas de las características de los estreptococos y los enterococos; muchas cepas son PYR, LAP, BE y NaCl al 6,5% positivas, y pueden crecer a 10 °C. Los lactococos, al contrario de los enterococos, no crecen a 45 °C. Una información sobre la posibilidad de

que una cepa sea una especie de *Lactococcus* es la generación de una lista de características que no se ajustan a los estreptococos ni a los enterococos.³³⁶ La mayoría de las cepas clínicas de lactococos remitidas a los CDC han sido *L. lactis* subespecie *lactis* o *L. garveiae*. Estas dos especies pueden ser diferenciadas de las especies comunes de *Enterococcus* en que ambas producen ácido a partir de manitol pero no a partir de rafinosa, sorbitol o arabinosa. *L. garveiae*, *L. lactis* subespecie *cremoris*, *L. lactis* subespecie *lactis* y *L. raffinolactis* están incluidos en la base de datos de los sistemas de identificación ID32 Strep, API Rapid Strep y BBL Crystal, respectivamente (véase la sección siguiente). También se describieron métodos de sondas de oligonucleótidos y las técnicas de PCR específicas de género para separar los enterococos y lactobacilos.^{259,839} En el cuadro 13-17 se presentan las características bioquímicas para identificar las especies de *Lactococcus*.

Sistemas comerciales para la identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas

El desarrollo de sistemas comerciales que incorporan tipos similares de pruebas fisiológicas y enzimáticas para la identificación de estreptococos ha sido de gran ayuda para la identificación de las especies de estreptococos viridans, las especies de *Enterococcus* y los estreptococos del grupo D. Se utilizan las reacciones bioquímicas incluidas en los sistemas para generar un número biotipo que corresponde a la identidad del microorganismo. Aunque estos sistemas incluyen los estreptococos β -hemolíticos en sus bases de datos, es mejor manejar estos microorganismos utilizando otros métodos, como las pruebas presuntivas ya descritas o los sistemas comerciales de identificación rápida de grupo estreptocócico. Sin embargo, también hay que tener precaución con los sistemas de identificación comerciales. Por ejemplo, el API Rapid Strep®

Cuadro 13-17 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Lactococcus*

PRUEBA	<i>L. LACTIS</i> SUBESPECIE <i>LACTIS</i>	<i>L. LACTIS</i> SUBESPECIE <i>CREMORIS</i>	<i>L. LACTIS</i> SUBESPECIE <i>HORDNIAE</i>	<i>L.</i> <i>GARVEIAE</i>	<i>L.</i> <i>PLANTARUM</i>	<i>L.</i> <i>RAFFINOLACTIS</i>	<i>L.</i> <i>XYLOSUS</i>
Arginina dihidrolasa	+	—	+	+	—	—	+
Hidrólisis de hipurato	—	+	—	—	—	—	—
PYR	V	—	—	+	—	—	—
Acetoína (VP)	+	+	+	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	—	—	+	+	+	+
Sacarosa	+	—	+	V	+	—	+
Lactosa	+	+	—	V	—	+	—
Manitol	+	—	—	+	+	V	+
Sorbitol	—	—	—	—	+	—	—
Rafinosa	—	—	—	—	—	+	—
Trehalosa	+	—	+	+	+	—	+

+: reacción positiva; —: reacción negativa; V: reacción variable; PYR: pirrolidonil arilamidasa.

identifica erróneamente a los microorganismos *Leuconostoc* como especies de estreptococos viridans, de modo que se debe considerar la resistencia a la vancomicina y otros resultados de pruebas preliminares junto con las reacciones bioquímicas que se observan sobre la tirita. Los sistemas comerciales para la identificación de estreptococos incluyen los siguientes.

API RAPID STREP®

Este sistema con formato en tira (BioMérieux) consta de 20 pruebas, que incluyen pruebas fisiológicas, pruebas de sustratos enzimáticos cromogénicos y pruebas de utilización de hidratos de carbono. Lo que puede destacarse acerca de este sistema es que la tira se puede leer dos veces. Si no se obtiene una identificación luego de 4 horas de incubación utilizando los sustratos fisiológicos y cromogénicos, se puede volver a incubar la tira y leerla luego de la incubación durante toda la noche para incluir la producción de ácido de 10 hidratos de carbono (véase lámina en color 13-3C). La base de datos incluye estreptococos β -hemolíticos, especies de *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. avium* y *E. durans*), estreptococos viridans, lactococos, aerococos, especies de *Gemella*, cepas de *S. bovis* y *Listeria monocytogenes*. El API Rapid Strep® es en la actualidad el sistema comercial más ampliamente disponible para la identificación de los estreptococos y las bacterias similares a *Streptococcus*. La identificación de las cepas que han sido completamente caracterizadas mediante pruebas bioquímicas convencionales y análisis genético (p. ej., relación de DNA, secuenciación de rRNA 16S) indica que el sistema API Rapid Strep® es reproducible y complementa los estudios genéticos existentes. En algunos casos, las pruebas sobre las tiras en realidad pusieron en evidencia diferencias fenotípicas no observadas con los métodos convencionales. En otros casos, la presencia de diferencias fenotípicas entre las cepas del sistema Rapid Strep podría demostrar que es genotípicamente distinto cuando se realizaron estudios de ácidos nucleicos. Las reacciones bioquímicas para muchos microorganismos que se muestran en los cuadros de este capítulo reflejan los estudios recientes durante los cuales se realizó análisis genético y la descripción de nuevas especies junto con la caracterización por API Rapid Strep®. Sin embargo, la base de datos para este sistema no ha sido actualizada ni ampliada para incluir especies estreptocócicas más nuevas (p. ej., *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. crista*).

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN PARA GRAMPOSITIVOS BBL CRYSTAL

El sistema de identificación para grampositivos Crystal contiene 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos desecados más un control negativo a la fluorescencia. Se prepara el inóculo suspendiendo colonias de una cepa aislada pura en el líquido provisto con el equipo hasta una turbidez equivalente a un estándar de McFarland de 0.5. Luego se vierte la suspensión en un área específica de la base del panel, el cual se manipula hasta distribuir el inóculo. Se golpea luego la tapa del panel, que contiene los sustratos de prueba, en la base, con la hidratación ulterior de los sustratos con el inóculo. Después de la incubación, se leen las pruebas para detectar fluorescencia o cambios en los colores de los indicadores de pH utilizando un visualizador especial del panel. El patrón resultante de las 29 reacciones es convertido en un número de perfil de 10 dígitos que se correlaciona con una identificación provista por el libro de Códigos electrónicos Crystal. El panel puede ser interpretado utilizando

una base de datos de 4 horas de incubación o de 18-24 horas de incubación.

En una evaluación de este sistema, el Crystal Gram-Positive® identificó a todas las cepas de estreptococos β -hemolíticos agrupables y *S. pneumoniae*, pero sólo identificó 25 de 37 cepas de estreptococos viridans en la categoría de especie. El sistema identificó correctamente a los 23 *E. faecalis*, 2 de 2 *E. avium* y a todos los 14 *E. faecium*.¹⁰¹⁶ Hudson y cols. probaron el sistema con cepas veterinarias de enterococos definidas por genotipo y observaron que las pruebas repetidas de las mismas cepas conducían a identificaciones diferentes.⁵⁰² De hecho, 19 de las 50 cepas evaluadas fueron identificadas en diferentes momentos tanto como *E. faecalis* y como *E. faecium*. Cuando este sistema fue probado con 55 aislamientos que pertenecen a los géneros similares a *Streptococcus* (*Alloioococcus otitidis*, especies de *Facklamia*, *D. pigrum* y *I. ruoffiae*) que no se encuentran en la base de datos actual, el sistema produjo resultados "de identificación inaceptables" para 14 aislamientos e identificó erróneamente a los otros como especies de *Micrococcus*.⁵⁹⁴

RAPID ID 32 STREP®

Este sistema (BioMérieux) es un sistema de identificación en formato de tira de 32 pruebas para los estreptococos y bacterias similares a *Streptococcus*. Su base de datos es extensa e incluye los estreptococos agrupables, varias especies de *Enterococcus* y los estreptococos viridans (que incluyen las especies recién descritas como los estreptococos bucales del "grupo mutans", *S. oralis*, *S. gordonii* y *S. vestibularis*). Se prepara una suspensión del microorganismo en agua estéril hasta una turbidez equivalente de un estándar de MacFarland de 4 y 55 μ L de la suspensión en cada una de las 32 cúpulas. Se incubaba la tirita a 35 a 37 °C durante 4 horas y se lee manualmente utilizando un libro de códigos o con el lector automático (ATB 1520 Reader conectado a un ordenador ATB 1545, BioMérieux; véase lámina en color 13-3G). En una evaluación del sistema Rapid ID 32 Strep con 433 cepas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, *Erysipelothrix*, *Gardnerella* y *Listeria*, el 95,3% de las cepas fueron identificadas correctamente.³⁷⁸ Se necesitaron pruebas adicionales para la identificación del 25,1% de las cepas. Sólo no se identificaron 16 cepas (3,7%) y sólo cuatro (1%) fueron mal identificadas. Otra evaluación de Kikuchi y cols. comunicó que el sistema ID32 Strep identificó el 87% de 156 cepas de estreptococos viridans y que la mayor parte de las identificaciones incorrectas comprendió cepas de *S. oralis*, *S. mitis* y *S. gordonii*.⁵⁶⁶ Jensen y cols. evaluaron 122 cepas de estreptococos y enterococos en el sistema ID 32 Strep y observaron que, independientemente de que las interpretaciones de las reacciones se obtuvieran por lectura automática o manual, el 75-77% de las cepas fueron identificadas correctamente, el 7% fueron mal identificadas y el 16-18% no fueron identificadas. Se identificaron correctamente la mayoría de los enterococos y cocos piógenos y sólo dos tercios de los estreptococos viridans.⁵³⁴ Cuando se evaluó con 55 cepas aisladas de microorganismos "similares a *Streptococcus*" no incluidos en la base de datos actual, el ID 32 Strep® determinó correctamente la falta de identificación para todos los aislamientos de 27 *D. pigrum*, 6 de 18 especies de *Facklamia* y 2 de 3 *I. ruoffiae* como "identificaciones inaceptables".⁵⁹⁴ Las identificaciones incorrectas más frecuentes de especies de *Facklamia* proporcionadas por el ID 32 fueron como distintas especies de *Streptococcus* y *Gemella*.

RAPID STR®

El sistema RapID STR® (Remel) utiliza una cubeta pequeña que contiene 10 celdas, 4 de las cuales son bifuncionales y conducen a un total de 14 pruebas bioquímicas (utilizadas junto con la reacción hemolítica del microorganismo aislado). Las pruebas incluyen determinaciones fisiológicas (arginina dihidrolasa, hidrólisis de esculina), pruebas de utilización de hidratos de carbono e hidrólisis de sustratos enzimáticos cromogénicos (véase lámina en color 13-3H). El sistema es inoculado con una suspensión del microorganismo (estándar de turbidez de MacFarland de 1) preparada en un líquido adquirido con el sistema y las pruebas se leen después de una incubación de 4 horas a 35 °C en una incubadora sin CO₂. La base de datos de este sistema incluye los estreptococos β-hemolíticos grupos A, B y C/G, estreptococos del grupo D (*S. bovis*, variante de *S. bovis*, *S. equinus*), el grupo de *S. milleri* (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*), especies de *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. malodoratus*), especies de estreptococos viridans (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*), *S. pneumoniae*, especies de *Aerococcus*, *Gemella morbillorum*, especies de *Leuconostoc*, especies de *Lactococcus* (*L. lactis*, grupo de *L. mesenteroides*) y especies de *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*). Los estreptococos viridans descritos recientemente, enterococos y bacterias similares a *Streptococcus* no están incluidos en la base de datos en este momento. En un estudio reciente de Shewmaker y cols. sobre caracterización fenotípica de 28 cepas de *G. sanguinis*, el RapID STR identificó incorrectamente siete cepas: cinco como *S. mutans*, una como *E. casseliflavus* y una como *E. malodoratus*, mientras que las cepas restantes dieron perfiles inadecuados para la identificación.⁸⁸⁴ En la actualidad, los géneros similares a *Streptococcus* recién descritos no forman parte de la base de datos RapID Strep. LaClaire y Facklam evaluaron 27 cepas de *D. pigrum* en el RapID Strep: sólo una proporcionó una identificación "ninguna elección", dos produjeron un "biocódigo cuestionable" y el resto fueron identificadas como "ID inadecuado, 90% *E. faecalis*". Dos de las 18 especies de *Facklamia* y las tres cepas de *I. ruoffiae* evaluadas fueron identificadas correctamente como "ninguna elección".⁵⁹⁴ Las cepas de *A. otitidis* fueron mal identificadas como *G. morbillorum*, *A. viridans*, *S. mitis* o *S. acidominimus*.

TARJETA DE IDENTIFICACIÓN PARA GRAMPOSITIVOS VITEK (GPI)

La tarjeta GPI® (BioMérieux) es la misma utilizada para la identificación de estafilococos coagulasa negativos y algunos bacilos grampositivos facultativos no esporulados. La tarjeta consta de 30 celdas, 29 de las cuales contienen sustratos de identificación bioquímicos; la celda restante es un control negativo. La tarjeta proporciona identificaciones automáticas en 2 a 15 horas. La tarjeta ha sido modificada ligeramente desde su liberación inicial y se ha actualizado la base de datos, la cual incluye estreptococos β-hemolíticos (grupos A, B, C y G), estreptococos del grupo D (*S. bovis*, variante de *S. bovis* y *S. equinus*), *S. pneumoniae*, siete especies de *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y *E. hirae*), algunas especies de estreptococos viridans (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. uberis*), el grupo anginoso (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*), especies de *Aerococcus* y *Gemella morbillorum*. Como sucede con otros sistemas, las especies de estreptococos viridans descritas más recientemente no se han incluido todavía. La base de datos de la tarjeta GPI

incluye también algunas especies de *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Listeria* y *Erysipelothrix*. No se ha evaluado recientemente la tarjeta modificada con la base de datos ampliada en cuanto a su capacidad para identificar correctamente los estreptococos viridans. La tarjeta GPI puede identificar correctamente *E. faecalis* y *E. faecium*, pero no rinde tan bien para la identificación de otras especies de *Enterococcus*.¹³⁵

PANEL COMBINADO DE VALOR CRÍTICO PARA GRAMPOSITIVOS DE MICROSCAN

Los paneles de identificación MicroScan® (Dade MicroScan, West Sacramento, CA) proporcionan resultados simultáneos de identificación y sensibilidad a los antibióticos en un formato de microtítulo. Tritz y cols. evaluaron la capacidad de este sistema para identificar enterococos y observaron que tanto *E. faecalis* como *E. faecium* eran identificados fiablemente, pero las especies de enterococos menos frecuentes eran mal identificadas.⁹⁶³ Iwen y cols. evaluaron el panel de identificación para grampositivos MicroScan Dried Overnight GramPositive Identification por su capacidad para identificar ocho especies diferentes de *Enterococcus* y observaron que el sistema identificaba el 98,5% de las cepas evaluadas; la resolución de las identificaciones de baja probabilidad con otras pruebas (es decir, motilidad y pigmentación) sólo fue necesaria para cepas de *E. gallinarum*/*casseliflavus*.⁵¹⁴

American MicroScan (Sacramento, CA) y MicroMedia (San José, CA) comercializan otros sistemas de microtitulación para identificación de estreptococos pero aún no han sido evaluados.

REFERENCIAS

1. Aarestrup PM, Rasmussen SR, Artursson K, Jensen NE. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet Microbiol* 1998;63:71-80.
2. Adams JT, Faix RG. *Streptococcus mitis* infection in newborns. *J Perinatol* 1994;14:473-478.
3. Adderson EE, Takahashi, Wang, et al. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 2003;71:6857-6863.
4. Adegbola RA, Obaro SK, Biney E, Greenwood BM. Evaluation of Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children in a community with a high carriage rate of pneumococcus. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:718-719.
5. Afessa B, Greaves WL, Frederick WR. Pneumococcal bacteremia in adults: a 14-year experience in an inner-city university hospital. *Clin Infect Dis* 1995;21:345-351.
6. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Alloicoccus otitis* gen. nov. sp. nov., an organism from human middle ear fluid. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:79-83.
7. Aguirre M, Collins MD. Development of a polymerase chain reaction-probe test for identification of *Alloicoccus otitis*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2177-2180.
8. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J Gen Microbiol* 1992;138:401-405.
9. Aguirre M, Collins MD. Development of polymerase chain reaction test for specific identification of the urinary tract pathogen *Aerococcus urinae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1350-1353.
10. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Microbiol* 1993;75:95-107.
11. Aguirre M, Morrison D, Cookson BD, et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Gemella*-like organisms from human infections: description of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov. *J Appl Microbiol* 1993;75:608-612.
12. Ahmed R, Hassall T, Morland B, Gray J. Viridans streptococcal bacteremia in children on chemotherapy for cancer: a underestimated problem. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20:439-444.
13. Akesson P, Linder A, Cronqvist J, Christensson B. Group A streptococcus bacteremia complicated by osteomyelitis in an immunocompetent adult. *Scand J Infect Dis* 2004;36:63-65.
14. Akesson P, Sjöholm AG, Björck L. Protein SIC a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* 1996;271:1081-1088.

15. Alam S, Brailsford SR, Whiley RA, Beighton D. PCR-based methods for genotyping viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:2772-2776.
16. Alba D, Zapater P, Torres E. Recurrent *Streptococcus sanguis* meningitis in a patient with a ventriculoperitoneal shunt. *Clin Infect Dis* 1994;19:808.
17. Alberti S, Asbaugh CD, Wessels M. Structure of the has operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci. *Mol Microbiol* 1998;28:343-353.
18. Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, et al. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* 2001;69:2732-2735.
19. Alouf JE, Lorian C. Production, purification and assay of streptolysin S. *Method Enzymol* 1988;165:59-64.
20. Al-Shahrani DA, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah SA, Al-Oufi SH. Group B streptococcal endocarditis. *Saudi Med J* 2002;23:1127-1129.
21. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Revised guidelines for prevention of early onset group B streptococcal (GBS) infections. *Pediatrics* 1997;99:489-496.
22. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion: number 279, December 2002. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Obstet Gynecol* 2002;100:1405-1412.
23. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice (ACOG). Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborn [ACOG committee opinion]. Washington, DC: ACOG 1996.
24. Ancona RJ, Ferrieri P, Williams PP. Maternal factors that enhance the acquisition of group B streptococci by newborn infants. *J Med Microbiol* 1980;13:273-280.
25. Anderson DJ, Murdoch DR, Sexton DJ, et al. Risk factors for infective endocarditis in patient with enterococcal bacteremia: a case-control study. *Infection* 2004;32:72-77.
26. Anderson B, Dahmen J, Frejd T, et al. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med* 1983;158:559-569.
27. Andrews JI, Diekema DJ, Hunter SK, et al. Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the western hemisphere. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:859-862.
28. Angel-Moreno A, Bolanos M, Buceta E, et al. *Streptococcus bovis* bacteremia from a venous access port in a patient with AIDS. *Scand J Infect Dis* 2002;34:764-766.
29. Anhalt JP, Heiter BJ, Naumovitz DW, et al. Comparison of three methods for detection of group A streptococci in throat swabs. *J Clin Microbiol* 1992;30:2135-2138.
30. Antalek MD, Mylotte JM, Lesse AJ, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1995;20:103-109.
31. Anthony BF, Kaplan EL, Wannamaker LW, et al. Attack rates of acute nephritis after type 49 streptococcal infection of the skin and the respiratory tract. *J Clin Invest* 1969;48:1697-1704.
32. Antunes A, Rainey FA, Fernanda-Nobre M, et al. *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:647-655.
33. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis* 1992;15:77-83.
34. Arala-Chaves MP, Ribeiro AS, Santarem MMG, et al. Strong mitogenic effect for murine B lymphocytes of an immunosuppressor substance released by *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun* 1986;54:543-548.
35. Arditi M, Shulman ST, Davis AT, et al. Group C β -hemolytic streptococcal infections in children: nine pediatric cases and review. *Rev Infect Dis* 1989;11:34-45.
36. Arend SM, Van Buchem MA, van Ogtrop ML, et al. Septicaemia meningitis and spondylodiscitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *Infection* 1995;23:128.
37. Arends JP, Hartwig N, Rudolph M, et al. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *J Clin Microbiol* 1984;20:945-947.
38. Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* 1988;10:131-137.
39. Asciutto R, Drennan J, Fitzgerald V, et al. Group C streptococcal arthritis and osteomyelitis in an adolescent with a hereditary sensory neuropathy. *Pediatr Infect Dis J* 1985;1:553-554.
40. Ashbaugh CD, Warren HB, Carey VJ, Wessels MR. Molecular analysis of the role of the group streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J Clin Invest* 1998;102:550-560.
41. Aspevall O, Hillebrandt E, Linderöth B, et al. Meningitis due to *Gemella haemolyans* after neurosurgical treatment of trigeminal neuralgia. *Scand J Infect Dis* 1991;23:503-505.
42. Atkins JT, Tillman J, Tan TQ, et al. *Pediacoccus pentosaceus* catheter-associated infection in an infant with gastroschisis. *Pediatr Infect Dis* 1994;13:75-76.
43. Awada A, van der Auwera P, Meunier F, et al. Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1992;15:33-48.
44. Ayoub EM, Kotb M, Cunningham MW. Rheumatic fever pathogenesis. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. New York: Oxford University Press, 2000;102-132.
45. Baddour LM. Infective endocarditis caused by β -hemolytic streptococci: the Infectious Diseases Society of America's Emerging Infections Network. *Clin Infect Dis* 1998;26:66-71.
46. Baird RW, Bronze MS, Kraus W, et al. Epitopes of group A streptococcal M proteins shared with antigens of articular cartilage and synovium. *J Immunol* 1991;146:3132-3137.
47. Baker CJ. Inadequacy of rapid immunoassays for intrapartum detection of group B streptococcal carriers. *Obstet Gynecol* 1996;88:51-55.
48. Baker CJ, Rench MA. Commercial latex agglutination for detection of group B streptococcal antigen in body fluids. *J Pediatr* 1983;102:393-395.
49. Ballow CH, Jones RN, Johnson DM, et al. Comparative in vitro assessment of sparfloxacin activity and spectrum using results from over 14,000 pathogens isolated at 190 medical centers in the U.S.A. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:173-186.
50. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:89-99.
51. Bancescu G, Dumitriu S, Bancescu A, Skaug N. Streptococci species of anginosus group isolated from oral and maxillofacial infections. *Room Arch Microbiol Immunol* 1999;58:49-55.
52. Baquero F, Garcia-Rodriguez JA, DeLomas JG, et al. Antimicrobial susceptibility of 914 β -hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Sapin: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:178-180.
53. Baraco GJ, Bisno AL. Therapeutic approaches to streptococcal toxic shock syndrome. *Curr Infect Dis Rep* 1999;1:230-237.
54. Barnham M, Ljunggren A, McIntyre M. Human infection with *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C): three case reports. *Epidemiol Infect* 1987;98:183-190.
55. Barnham M, Thornton TJ, Lange K. Nephritis caused by *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C). *Lancet* 1983;1:45-946.
56. Barnham MR, Weightman NC. Bacteraemic *Streptococcus pyogenes* infection in the peri-partum period: now a rare disease and prior carriage by the patient may be important. *J Infect* 2001;43:173-176.
57. Barnham MR, Weightman N, Anderson A, et al. Review of 17 cases of pneumonia caused by *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:506-509.
58. Barrios H, Bump CM. Conjunctivitis caused by a nutritionally variant *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* 1986;23:379-380.
59. Barry H, Clancy MT, Brady A, et al. Isolation of a *Leuconostoc* species from a retro-areolar breast abscess. *J Infect* 1993;27:208-210.
60. Barsotti O, Decoret D, Renaud FN. Identification of the streptococcus mitis group species by RFLP of the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Res Microbiol* 2002;153:687-691.
61. Barton LL, Rider ED, Coen RW. Bacteremic infection with *Pediacoccus*: vancomycin-resistant opportunists. *Pediatrics* 2001;107:775-776.
62. Barter T, Dascal A, Carrol K, et al. "Toxic strep syndrome": manifestation of group A streptococcal infection. *Arch Intern Med* 1988;148:1421-1424.
63. Battison A, Cawthron R, Horney B. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (gaffemia). *J Invertebr Pathol* 2003;84:177-197.
64. Bauer TM, Pipert H, Zimmerli W. Vertebral osteomyelitis cause by group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*) secondary to urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:244-246.
65. Baxter F, McChesney J. Severe group A streptococcal infection and streptococcal toxic shock syndrome. *Can J Anaesth* 2000;47:1129-1140.
66. Beachey EH, Simpson WA. The adherence of group A streptococci to oropharyngeal cells: the lipoteichoic acid adhesin and fibronectin receptor. *Infection* 1982;10:107-111.
67. Beal B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:953-958.
68. Becker JA, Ascher DP, Mendiola J, et al. False-negative urine latex particle agglutination testing in neonates with group B streptococcal bacteremia. *Clin Pediatr* 1993;32:467-471.
69. Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, et al. Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals the C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 2002;70:2869-2876.
70. Beighton D, Carr AD, Oppenheim BA. Identification of novel adhesins from group B streptococci associated with bacteremia in neutropenic cancer patients. *J Med Microbiol* 1994;40:202-204.
71. Beighton D, Homer KA, Bouvet A, et al. A scheme for the identification of viridans streptococci. *J Med Microbiol* 1991;35:367-372.
72. Beighton D, Homer KA, Bouvet A, et al. Analysis of enzymatic activities for differentiation of two species of nutritionally variant streptococci, *Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adjacens*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1584-1587.
73. Beighton D, Russell RRB, Whiley RA. A simple scheme biochemical for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991;25:174-178.
74. Beighton D, Whiley RA. Sialidase activity of the "*Streptococcus milleri* group" and other viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1990;28:1431-1433.
75. Bell E, McCartney AC. *Gemella morbillorum* endocarditis in an intravenous drug abuser. *J Infect* 1992;25:110-112.
76. Ben-Abraham R, Keller N, Vered R, et al. Invasive group A streptococcal infections in a large tertiary center: center: epidemiology, characteristics, and outcome. *Infection* 2001;29:81-85, 2002.
77. Benkirane R, Gottschalk M, Jacques M, Dubreuil JD. Immunochemical characterization of a IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20:122-127.
78. Bennett NM, Buffington J, LaForce FM. Pneumococcal bacteremia in Monroe County, New York. *Am J Public Health* 1992;82:1513-1516.

79. Bentley RW, Leigh JA. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J Clin Microbiol* 1995;33:1296-1301.
80. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intragenomic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:487-494.
81. Berenguer J, Sampedro I, Cencenado E, et al. Group β -hemolytic streptococcus bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:151-155.
82. Berg S, Trollfors B, Lagergard T, et al. Serotypes and clinical manifestation of group B streptococcal infections in western Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:9-13.
83. Begman S, Selig M, Collins MD, et al. "*Streptococcus milleri*" strains displaying a gliding type of motility. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:235-239.
84. Berk SL, Verghese A, Holtzclaw SA, et al. Enterococcal pneumonia. Occurrence in patients receiving broad-spectrum antibiotic regimens and enteral feeding. *Am J Med* 1983;74:153-154.
85. Berry AM, Lock RA, Hansman D, et al. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1989;57:2324-2330.
86. Berry AM, Lock A, Thomas SM, et al. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994;62:1101-1108.
87. Berry AM, Yother J, Briles DE, et al. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1989;57:2037-2042.
88. Bert F, Bariou-Lancelin M, Lambert-Zechovsky N. Clinical significance of bacteremia involving the "*Streptococcus milleri*" group: 51 cases and review. *Clin Infect Dis* 1998;150:107-112.
89. Bert F, Branger C, Poutrel B, Lambert-Zechovsky N. Clinical significance of bacteremia involving the "*Streptococcus milleri*" group: 51 cases and review. *Clin Infect Dis* 1998;27:385-387.
90. Bert F, Lambert-Zechovsky N. Septicemia caused by *Streptococcus canis* in a human. *J Clin Microbiol* 1997;35:777-779.
91. Bessen DE, Sotir CM, Readdy T, Hollingshead SK. Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci. *J Infect Dis* 1996;173:896-900.
92. Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, et al. Detection of *Alloicoccus otitis* in mixed bacterial population from middle-ear effusions of patients with otitis media. *Lancet* 1999;354:386-389.
93. Bhakdi S, Roth M, Sziegoleit A, Traum-Jensen J. Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin O. *Infect Immun* 1984;46:394-400.
94. Biermann C, Fries G, Jehnichen P, et al. Isolation of *Abiotrophia adiacens* from a brain abscess which developed in a patient after neurosurgery. *J Clin Microbiol* 1999;37:769-771.
95. Bisno AL. Alternate complement pathway activation by group A streptococci: role of M protein. *Infect Immun* 1979;6:1172-1176.
96. Bisno AL. Nonsuppurative poststreptococcal sequelae: rheumatic fever and glomerulonephritis. In: Mandell L, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. New York, Churchill-Livingstone, 2000:2117-2128.
97. Bisno AL, Rito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003;3:191-200.
98. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *Clin Infect Dis* 2002;35:113-125.
99. Bisno AL, Stevens DL. Streptococcal infections of skin and soft tissue. *N Engl J Med* 1995;334:240-245.
100. Bisno AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes* (including streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. New York: Churchill-Livingstone, 2000:2101-2117.
101. Bisno AL, Wood JW, Lawson J, et al. Antigens in urine of patients with glomerulonephritis and in normal human serum which cross-react with group A streptococci: identification and partial characterization. *J Lab Clin Med* 1978;91:500-513.
102. Bjorkroth KJ, Geisen R, Schillinger U, et al. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3764-3772.
103. Blanckaert H, Frans I, Bosteels J, et al. Optimization of prenatal group B streptococcal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:619-621.
104. Blanco JR, Zabaleta M, Salcedo J, San Roman J. Rhabdomyolysis as a result of *Streptococcus pneumoniae*: case report and review. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:944-948.
105. Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:57-511.
106. Blumberg HM, Stephens DS, Modanski M, et al. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis* 1996;173:365-373.
107. Bochud P-Y, Calandra T, Francioli P. Bacteremia due to viridans streptococci in neutropenic patients: a review. *Am J Med* 1994; 97:256-264.
108. Bochud P-Y, Eggiman P, Calandra T, et al. Bacteremia due to viridans streptococcus in neutropenic patients with cancer: clinical spectrum and risk factors. *Clin Infect Dis* 1994;18:25-31.
109. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet* 2004;4:144-154.
110. Bohnsack IF, Mollison KW, Buko AM, et al. Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymatic cleavage at the C-terminus. *Biochem J* 1991;273:635-640.
111. Bohnsack IF, Takahashi S, Detrick SR, et al. Phylogenetic classification of serotype III group B streptococci on the basis of *hylB* gene analysis and DNA sequences specific to restriction digest pattern type III-3. *J Infect Dis* 2001;183:1694-1697.
112. Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, et al. The α C protein mediates internalization of group B streptococcus within human cervical epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002;4:751-758.
113. Bonnetblanc JM, Bedane C. Erysipelas: recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:157-163.
114. Borchardt SM, Foxman B, Chaffin DO, et al. Comparison of DNA dot blot hybridization and lancefield capillary precipitin methods for group B streptococcal capsular typing. *J Clin Microbiol* 2004;42:146-150.
115. Borek AP, Dressel DC, Hussong J, Peterson LR. Evolving clinical problems with *Streptococcus pneumoniae*: increasing resistance to antimicrobial agents and failure of traditional Optochin identification in Chicago, Illinois, between 1993 and 1996. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:209-214.
116. Borer A, Weber G, Avnon LS, et al. Pleural empyema caused by *Leuconostoc* spp. *Scand J Infect Dis* 1997;29:311-312.
117. Bos AP, Fetter WPF, Baerts W, et al. Streptococcal pharyngitis and epiglottitis in a newborn infant. *Eur J Pediatr* 1992;151:874-875.
118. Bosley GS, Whitney AM, Pruckler JM, et al. Characterization of ear fluid isolates of *Alloicoccus otitis* from patients with recurrent otitis media. *J Clin Microbiol* 1995;33:2876-2880.
119. Bouchillon SK, Hoban DJ, Johnson JL, et al. In vitro activity of gemifloxacin and contemporary oral antimicrobial agents against 27,247 gram-positive and gram-negative aerobic isolates: a global surveillance study. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:181-196.
120. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992;138:249-259.
121. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991;5:2611-2616.
122. Bourbeau PP, Heiter BI, Figdore M. Use of Gen-Probe AccuProbe group B streptococcus test to detect group B streptococci in broth cultures of vaginal-anorectal specimens from pregnant women: comparison with traditional culture method. *J Clin Microbiol* 1997;35:144-147.
123. Bouvet A. Human endocarditis due to nutritionally variant streptococci: *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus*. *Eur Heart J* 1995;16(Suppl B):24-27.
124. Bouvet A, Geslin P, Kriz-Kuzemenska P, et al. Restricted association between biotypes and serotypes with group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:1312-1317.
125. Bouvet A, Grimont F, Collins MD, et al. *Streptococcus infantarius* sp nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:393-395.
126. Bouvet A, Grimont F, Grimont PAD. *Streptococcus defectivus* sp nov. and *Streptococcus adjacens* sp nov., nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:290-294.
127. Boyce JM, Opal DSM, Chow JW, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanB* class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994;32:1148-1153.
128. Boyer KM, Gotoff SP. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1986;314:1665-1669.
129. Brandt CM, Haase G, Schnitzler N, et al. Characterization of blood culture isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. *J Clin Microbiol* 1999;37:4194-4197.
130. Briles DE, Hollingshead SIC, Swiatlo E, et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 1997;3:401-408.
131. Brook L, Gobar AE, Leyva F. In vitro and in vivo effects of penicillin and clindamycin on expression of group A β -hemolytic streptococcal capsule. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1565-1568.
132. Brown J, Shriner DL, Schwartz RA, Janniger CK. Impetigo: an update. *Int J Dermatol* 2003;42:251-255.
133. Bruneau S, de Montclos H, Drouet E, et al. rRNA gene restriction patterns of *Streptococcus pyogenes*: epidemiological applications and relation to serotypes. *J Clin Microbiol* 1994;32:2953-2958.
134. Bryant ER, Salmon CJ. Pleural empyema. *Clin Infect Dis* 1996; 22:747-764.
135. Bryce EA, Zencov SJ, Clarke AM. Species identification and antibiotic resistance patterns of the enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:745-747.
136. Bucher A, Martin PR, Hoiby EA, et al. Spectrum of disease in bacteremic patients during a *Streptococcus pyogenes* serotype M-1 epidemic in Norway in 1988. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:416-426.
137. Bungener W, Bialek R. Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir worker. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:306-308.
138. Burden AD, Oppenheim BA, Crowther D, et al. Viridans streptococcal bacteraemia in patients with haematological and solid malignancies. *Eur J Cancer* 1991;27:409-411.
139. Burkert T, Watanakunakorn C. Group G streptococcus septic arthritis and osteomyelitis: report and literature review. *J Rheumatol* 1991;18:904-907.
140. Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* 1985;7:133-142.
141. Burns DL, Ginsburg CM. Recrudescence of acute rheumatic fever in Dallas, Texas. *Pediatr Res* 1987;21(Suppl):26A.

142. Buschelman BJ, Bale MJ, Jones RN. Species identification and determination of high-level aminoglycoside resistance among enterococci: comparison study of sterile body fluid isolates, 1985-1991. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16:119-122.
143. Butler JC, Breiman RF, Campbell JF, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: an evaluation of current recommendations. *JAMA* 1993;270:1826-1831.
144. Buu-Hoi A, Sapoeira A, Branger C, et al. Antimicrobial susceptibility of *Genella hemolyticus* isolated from patients with subacute endocarditis. *Eur J Clin Microbiol* 1982;1:102-106.
145. Cai J, Collins MD. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:365-367.
146. Cainzos M, Hindi EY, Fernandez F, et al. Wound erysipelas following appendectomy caused by Group B β -hemolytic *Streptococcus agalactiae*. *Surg Infect* 2001; 2:37-40.
147. Caliendo AM, Jordan CD, Ruoff KL. *Helcococcus*: a new genus of catalase-negative, gram-positive cocci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:1638-1639.
148. Camara M, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1991;59:2856-2858.
149. Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, et al. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol* 2000;96:498-503.
150. Campos JM, Charilaou CC. Evaluation of Detect-A-Strep and the Culturette Ten-Minute Strep ID kits for detection of group A streptococcal antigen in oropharyngeal swabs from children. *J Clin Microbiol* 1985;22:145-148.
151. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 1995;172:119-123.
152. Cappelli EA, Barros RR, Camello TC, et al. *Leuconostoc pseudomesenteroides* as a cause of nosocomial urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 1999;37:4124-4126.
153. Caputo GM, Appelbaum PC, Liu HH. Infections due to penicillin-resistant pneumococci: clinical, epidemiologic, and microbiologic features. *Arch Intern Med* 1993;153:1301-1310.
154. Carapetis J, Bishop S, Davis J, et al. *Leuconostoc sepsis* in association with continuous enteral feeding: two case reports and a review. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13: 816-823.
155. Carey RB, Gross KC, Roberts RB. Vitamin B₉ dependent *Streptococcus mitis* (mitis) isolated from patients with systemic infections. *J Infect Dis* 1975;131:722-726.
156. Carley NH. *Streptococcus salivarius* bacteremia and meningitis following upper gastrointestinal endoscopy and cauterization for gastric bleeding. *Clin Infect Dis* 1992;14:947-948.
157. Carmeli Y, Ruoff KL. Report of cases of and taxonomic considerations for large-colony-forming Lancefield group C streptococcal bacteremia. *J Clin Microbiol* 1995;33:2114-2117.
158. Carrascosa M, Perez-Castrillon JL, Sampedro I, et al. Lung abscess due to *Streptococcus mitis*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;19:781-783.
159. Carroll KC, Monroe P, Cohen S, et al. Susceptibility of β -hemolytic streptococci to nine antimicrobial agents among four medical centers in Salt Lake City, Utah. *USA. Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;27:123-128.
160. Cartwright CP, Stock F, Fahle GA, et al. Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1931-1933.
161. Carvalho MS, Steigerwalt AG, Morey RE, et al. Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:1192-1198.
162. Catalan MJ, Fernandez JM, Vazquez A, et al. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1994;18:766-769.
163. Cavalieri SJ, Allais JM, Schlievert PM, et al. Group A streptococcal peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med* 1989;86:249-250.
164. Centers for Disease Control and Prevention. Acute rheumatic fever at a Navy training center—San Diego. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1988;37:101-104.
165. Centers for Disease Control and Prevention. Acute rheumatic fever among Army trainees—Fort Leonard Wood, Missouri, 1987-1988. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1988;37:519-522.
166. Centers for Disease Control and Prevention. Group A β -hemolytic streptococcal bacteremia—Colorado, 1989. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39:3-11, 1990.
167. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45(RR-7):1-24.
168. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46(RR-8):1-24.
169. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;46(RR-9):1-35.
170. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-22.
171. Cerceio E, Christie JD, Nachamkin I, Lautenbach E. Central nervous system infections due to *Abiotrophia* and *Granulicatella* species: an emerging challenge? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:161-165.
172. Chaglia AH, Borezyk AA, Facklam RR, Lovgren M. Breast abscess associated with *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2377-2379.
173. Chang HH, Lu CY, Hsueh PR, et al. Endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:697-700.
174. Chapin KC, Blake P, Wilson CD. Performance characteristics and utilization of rapid antigen test, DNA probe, and culture for detection of group A streptococci in an acute care clinic. *J Clin Microbiol* 2002;40:4207-4210.
175. Chapin-Robertson C, Dahlberg SE, Edberg SC. Clinical and laboratory analyses of cytospin-prepared Gram stains for recovery and diagnosis of bacteria from sterile body fluids. *J Clin Microbiol* 1992;30:377-380.
176. Chapnick EK, Graddon JD, Lutwick LJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome due to noninvasive pharyngitis. *Clin Infect Dis* 1992;14:1074-1077.
177. Chateallier S, Gottschalk M, Higgins R, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J Clin Microbiol* 1999;37:362-366.
178. Chateallier S, Harel J, Zhang Y, et al. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48:581-589.
179. Chau PY, Huang CY, Kay R. *Streptococcus suis* meningitis: an important under-diagnosed disease in Hong Kong. *Med J Aust* 1983;1:414-417.
180. Cheng Q, Carlson B, Pillai S, et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun* 2001;69:2302-2308.
181. Cheng Q, Debol S, Lam H, et al. Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B streptococci from lungs of infected mice. *Infect Immun* 2002;70:6409-6415.
182. Cheng Q, Stafshien D, Purushotamen SS, Cleary P. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun* 2002;70:2408-2413.
183. Cherchi GB, Kaplan EL, Schlievert PM, et al. First reported case of *Streptococcus pyogenes* infection with toxic shock-like syndrome in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:836-838.
184. Chew TA, Smith JMB. Detection of diacetyl (caramel odor) in presumptive identification of the "*Streptococcus milleri*" group. *J Clin Microbiol* 1992;30:3028-3029.
185. Chirungi VA, Oster SE, Goldberg A, et al. Ampicillin-resistant *Enterococcus raffinosus* in an acute-care hospital: case-control study and antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol* 1991;29:2663-2665.
186. Choi M, Mailman TL. Pneumococcal endocarditis in infants and children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:166-171.
187. Chow JW, Muder RR, Group A streptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 1992;14:418-421.
188. Chow JW, Thal LA, Perri MB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contributes to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2472-2477.
189. Christensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3520-3523.
190. Christensen JJ, Gruhn N, Facklam RR. Endocarditis caused by *Abiotrophia* species. *Scand J Infect Dis* 1999;31:210-212.
191. Christensen JJ, Gutschik E, Friss-Moller A, et al. Urosepticemia and fatal endocarditis caused by *Aerococcus*-like organisms. *Scand J Infect Dis* 1991;23:717-721.
192. Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, et al. Bacteremia/septicemia due to *Aerococcus*-like organisms: report of seventeen cases. *Clin Infect Dis* 1995;21:943-947.
193. Christensen JJ, Korner B, Kjaergaard H. *Aerococcus*-like organism—an unnoticed urinary tract pathogen. *APMIS* 1989;97:539-546.
194. Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, et al. *Aerococcus*-like organism, a newly recognized urinary tract pathogen. *J Clin Microbiol* 1991;29:1049-1053.
195. Christensen JJ, Whitney AM, Teixeira LM, et al. *Aerococcus urinae*: intraspecies genetic and phenotypic relatedness. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:28-32.
196. Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1944;22:197-200.
197. Chuard C, Reller LB. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *J Clin Microbiol* 1998;36:1135-1136.
198. Cimolai N, Morrison BJ, MacCulloch L, et al. β -Haemolytic non-group A streptococci and pharyngitis: a case-control study. *Eur J Pediatr* 1991;150:776-779.
199. Claridge JE III, Attorri SM, Musher DM, et al. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri* group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. *Clin Infect Dis* 2001;32:1511-1515.
200. Claridge JE III, Attorri SM, Zhang Q, Bartell J. 16S Ribosomal DN sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis* *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. *J Clin Microbiol* 2001;39:1549-1552.
201. Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993;73:9-12.
202. Cockeran R, Anderson R, Feldman C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:235-239.
203. Cockeran R, Durandt C, Feldman C, et al. Pneumolysin activates de synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* 2002;186:562-565.
204. Collazos J, Echevarria MJ, Ayarza R, et al. *Streptococcus zooepidemicus* septic arthritis: case report and review of group C streptococcal arthritis. *Clin Infect Dis* 1992;15:744-746.

205. Collins MD, Aguirre M, Facklam RR, et al. *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive, catalase-negative bacterium from human sources. *J Appl Microbiol* 1992;73:433-437.
206. Collins MD, Ash C, Farrow JAE, et al. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa: description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J Appl Microbiol* 1989;67:453-460.
207. Collins MD, Facklam RR, Farrow JAE, et al. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov., and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* 1989;57:283-288.
208. Collins MD, Facklam RR, Rodrigues UM, et al. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:425-429.
209. Collins MD, Falsen E, Foster C, et al. *Helcococcus ovis* sp. nov., a gram-positive organism from sheep. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1429-1432.
210. Collins MD, Falsen E, Lemoz J, et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Globicatella*-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:880-882.
211. Collins MD, Farrow JAE, Jones D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:8-12.
212. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, et al. An unusual *Streptococcus* from human urine, *Streptococcus urinalis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1173-1178.
213. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Sjoden B. *Facklamia soureiki* sp. nov., isolated from human sources. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:635-638.
214. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Sjoden B. *Facklamia tabacinalis* sp. nov., from powdered tobacco. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1247-1250.
215. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, et al. *Gemella bergeriae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1290-1293.
216. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, et al. Description of *Gemella sanguinis* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:3090-3093.
- 216a. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, et al. *Streptococcus gallinae* sp. nov., from chickens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1161-1164.
217. Collins MD, Hutson RA, Hoyle L, et al. *Streptococcus ovis* sp. nov., isolated from sheep. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1147-1150.
218. Collins MD, Jones D, Farrow JAE, et al. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* nom. rev., comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:220-223.
219. Collins MD, Jovita MR, Foster G, et al. Characterization of a *Gemella*-like organism from the oral cavity of a dog: description of *Gemella palaticanis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1523-1526.
220. Collins MD, Jovita MR, Hutson RA, et al. *Dolosicoccus paucivorans* gen. nov. Sp. nov., isolated from human blood. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1439-1442.
221. Collins MD, Jovita MR, Hutson RA, et al. *Aerococcus christensenii* sp. nov., from the human vagina. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1125-1128.
222. Collins MD, Jovita MR, Lawson PA, et al. Characterization of a novel catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus coleocola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1381-1385.
223. Collins MD, Lawson PA. The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov., and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:365-369.
224. Collins MD, Lawson PA, Monasterio R, et al. *Facklamia ignava* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:2146-2148.
225. Collins MD, Lawson PA, Monasterio R, et al. *Ignavigranum ruoffiae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:97-101.
226. Collins MD, Rodrigues UM, Piggott NE, et al. *Enterococcus dispar* sp. nov., a new *Enterococcus* species from human sources. *Let Appl Microbiol* 1991;12:95-98.
227. Collins MD, Samelis J, Metazopoulos J, et al. Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Microbiol* 1993;75:595-603.
228. Collins MD, Williams AM, Wallbanks S. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol Lett* 1990;70:255-262.
229. Colville A, Davies W, Heneghan M, et al. A rare complication of dental treatment: *Streptococcus oralis* meningitis. *Br Dent J* 1993;175:133-134.
230. Cone LA, Woodard DR, Schlievert PM, et al. Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. *N Engl J Med* 1987;317:146-149.
231. Coonan KM, Kaplan EL. In vitro susceptibility of recent North American group A streptococcal isolates to eleven oral antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:630-635.
232. Cooper RJ, Hoffman JR, Bartlett JG, et al. Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults: background. *Ann Intern Med* 2001;134:509-517.
233. Coovadia YM, Solwa Z, van den Ende J. Meningitis caused by vancomycin-resistant *Leuconostoc* sp. *J Clin Microbiol* 1987;25:1784-1785.
234. Corcoran GD, Gibbons N, Mulvihill TE. Septicaemia caused by *Pediococcus pentosaceus*; a new opportunistic pathogen. *J Infect* 1991;23:179-182.
235. Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A, et al. Resistance of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and related antibiotics in Italy. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):S87-S82.
236. Corson AP, Garigusa VF, Chretien IH. Group C β -hemolytic streptococci causing pharyngitis and scarlet fever. *South Med J* 1989;82:1119-1121.
237. Corson MA, Postlethwaite KP, Seymour RA. Are dental infections a cause of brain abscess? Case report and review of the literature. *Oral Diseases* 2001;7:61-65.
238. Cottagnoud P, Rossi M. *Enterococcus avium* osteomyelitis. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:290.
239. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* 2002;34:77-87.
240. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:315-328.
241. Crain MJ, Waltman WD, Turner JS, et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1990;58:3293-3299.
242. Crater DL, van de Rijn I. Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in group A streptococci. *J Biol Chem* 1995;270:18452-18458.
243. Craven DE, Rixinger AI, Bisno AL, et al. Bacteremia caused by group G streptococci in parenteral drug abusers: epidemiological and clinical aspects. *J Infect Dis* 1986;153:988-992.
244. Cunney RJ, Fenton S, Fielding JF, et al. *Streptococcus mitis* meningitis in an adult. *J Infect* 1993;27:96-97.
245. Da Costa CT, Porter C, Parry K, et al. Empyema thoracis and lung abscess due to *Gemella morbillorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:75-77.
246. Dagan R, Englehard D, Piccard E. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Israel. *JAMA* 1992;268:3328-3332.
247. Dahl PR, Perniciaro C, Holmkvist KA, et al. Fulminant group A streptococcal necrotizing fasciitis: clinical and pathological findings in 7 patients. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:489-492.
248. Dajani AS, Ayoub E, Bierman FZ, et al. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever: Jones criteria, updated 1992. *Circulation* 1993;87:302-307.
249. Dale JB, Beachey EH. Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart. *J Exp Med* 1982;156:1165-1176.
250. Dale JB, Beachey EH. Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin. *J Exp Med* 1985;162:583-591.
251. Daly JA, Clifton NL, Seskin KC, Gooch WM III. Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, and *Enterococcus* spp. from pediatric patients with significant infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:80-82.
252. Daly JA, Korgenski EK, Munson AC, et al. Optical immunoassay for streptococcal pharyngitis: evaluation of accuracy with routine and mucoid strains associated with acute rheumatic fever outbreak in the intermountain area of the United States. *J Clin Microbiol* 1994;32:531-532.
253. Danilidou V, Mantadakis E, Galanakis E, et al. Three cases of viridans group streptococcal bacteremia in children with febrile neutropenia and literature review. *Scand J Infect Dis* 2003;35:873-876.
254. Dargere S, Vergnaud M, Verdon R, et al. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J Clin Microbiol* 2002;40:2308-2310.
255. Darling CL. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. *J Clin Microbiol* 1975;1:171-174.
256. Davidson M, Parkinson A, Bulkow LR, et al. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990—ethnic differences and opportunities for prevention. *J Infect Dis* 1994;170:368-376.
257. Davis TE, Fuller DD. Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1991;29:2193-2196.
258. Dealler SF, Grace RJ, Norfolk DR. *Enterococcus avium* septicemia in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:367-368.
259. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, et al. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst Appl Microbiol* 2000;23:510-522.
260. DeBaere T, Claeys G, Verschraegen G, et al. Continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis due to *Enterococcus cecorum*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3511-3512.
261. Debast SB, Koot R, Meis JFGM. Infections caused by *Gemella morbillorum*. *Lancet* 1993;342:560.
262. De Gheldre Y, Vandamme P, Goossens H, Struelens MJ. Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer RNA intergenic spacer length polymorphism. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1591-1598.
263. De Graef EM, Devriese LA, Vancanneyt M, et al. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1069-1074.
264. De Herdt P, Haesebrouck F, Devriese LA, et al. Biochemical and antigenic properties of *Streptococcus bovis* isolated from pigeons. *J Clin Microbiol* 1992;30:2432-2434.
265. De la Rosa M, Perez M, Carazo C, et al. New Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1992;30:1019-1021.
266. De la Rosa M, Villarreal R, Vega D, et al. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:779-785.
267. Dell A, Antone SM, Gauntt CJ, et al. Autoimmune determinants of rheumatic carditis: Localization of epitopes in human cardiac myosin. *Eur Heart J* 1991;12(Suppl D):158-162.
268. Della-Latta P, Whittier S, Hosmer M, et al. Rapid detection of group A streptococcal pharyngitis in a pediatric population with optical immunoassay. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:742-743.
269. DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol* 1960;23:130-135.

270. De Moor CE. Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S, and T. *Antonie Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 1963;29:272-280.
271. De Soet JJ, De Graf J. Monoclonal antibodies for enumeration and identification of mutans streptococci in epidemiological studies. *Arch Oral Biol* 1990;35:165S-168S.
272. Die Vaux A, Laguerre G, Divies C, Prevost H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 1998;48:383-387.
273. Dever LL, Smith SM, Handwerger S, Eng RHK. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J Clin Microbiol* 1995;33:2770-2773.
274. Devriese LA, Ceysens K, Haesebrouck F. Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from the intestines of different animal species. *Lett Appl Microbiol* 1991;12:137-139.
275. Devriese LA, Ceysens K, Rodrigues UM, et al. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett* 1990;71:247-252.
276. Devriese LA, Dutta GN, Farrow JAE, et al. *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:772-776.
277. Devriese LA, Hommez J, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Streptococcus canis* sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:422-425.
278. Devriese LA, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Streptococcus hyointestinalis* sp. nov. from the gut of swine. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:440-441.
279. Devriese LA, Pot B, Vandamme P, et al. *Streptococcus hyovaginalis* sp. nov., and *Streptococcus thoralensis* sp. nov. from the genital tract of sows. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1073-1077.
280. Devriese LA, Vandamme P, Collins MD, et al. *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1221-1226.
281. Devriese LA, Vandamme P, Pot B, et al. Differentiation between *Streptococcus galloyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *J Clin Microbiol* 1998;36:2520-2523.
282. Dhariwal DK, Patton DW, Gregory MC. Epidural spinal abscess following dental extraction: a rare and potentially fatal complication. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41:56-58.
283. Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov. comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:395-397.
284. Dicks LMT, Fantuzzi L, Gonzales FC, et al. *Leuconostoc argentinum* sp. nov. isolated from Argentine raw milk. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:347-351.
285. Diekema DJ, Andrews JI, Huynh H, et al. Molecular epidemiology of macrolide resistance in neonatal bloodstream isolates of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:2659-2661.
286. Dillon HC Jr, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987;110:31-36.
287. DiNubile MJ, Alborno MA, Stumacher RJ, et al. Pneumococcal soft-tissue infections: possible association with connective tissue diseases. *J Infect Dis* 1991;163:897-900.
288. Dobkin D, Shulman ST. Evaluation of an ELISA for group A streptococcal antigen for diagnosis of pharyngitis. *J Pediatr* 1987;110:566-568.
289. Dobson CM, Deneer H, Lee S, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:2003-2010.
290. Dobson SRM, Baker CJ. Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infections. *Pediatrics* 1990;85:165-171.
291. Doern GV, Brown SD. Antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract pathogens in the U.S.A.: data from PROTEKT US 2000-01. *J Infect* 2004;48:56-65.
292. Doern GV, Ferraro J, Brueggemann AB, Ruoff KL. Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:891-894.
293. Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1721-1729.
294. Doern GV, Pfaller MA, Kugler K, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis* 1998;27:764-770.
295. Domingo P, Barquet N, Alvarez M, et al. Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:1180-1187.
296. Donabedian S, Chow JW, Shlaes DM, et al. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. *J Clin Microbiol* 1995;33:141-145.
297. Donders GG, Vereecken A, Salembier G, Spitz B. Accuracy of rapid antigen detection test for group B streptococci in the indigenous vaginal bacterial flora. *Arch Gynecol Obstet* 1999;263:34-36.
298. Donsakul K, Dejthavorn C, Witoonpanich R. *Streptococcus suis* infection: clinical features and diagnostic pitfalls. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34:154-158.
299. Dorvilus P, Edoe-Sowah R. *Streptococcus milleri*: a cause of pyogenic liver abscess. *J Natl Med Assoc* 2001;93:276-277.
300. Dougherty SH. Role of enterococcus in intraabdominal sepsis. *Am J Surg* 1984;148:308-312.
301. Douglas CWI, Heath J, Hampton KK, et al. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol* 1993;39:179-182.
302. Doyuk E, Ormerod OJ, Bowler ICJW. Native valve endocarditis due to *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus oralis*. *J Infect* 2002;45:39-41.
303. Duff P, Gibbs RS. Acute intraamniotic infection due to *Streptococcus pneumoniae*. *Obstet Gynecol* 1983;61(Suppl):25S-27S.
304. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 1993;328:21-28.
305. Durmaz R, Ozerol IH, Kalcioğlu MT, et al. Detection of *Alloiococcus otitidis* in the nasopharynx and in the outer ear canal. *New Microbiol* 2002;25:265-268.
306. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:24-27.
307. Duval X, Papastamopoulos V, Longuet P, et al. Definite *Streptococcus bovis* endocarditis: characteristics in 20 patients. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:3-10.
308. Ebner C, Altwegg M, Gottschalk J, et al. *Aerococcus urinae* endocarditis: case report and review of the literature. *Infection* 2002;30:310-313.
309. Edson RS, Osmon DR, Berry DJ. Septic arthritis due to *Streptococcus sanguis*. *Mayo Clin Proc* 2002;77:709-710.
310. Edwards AT, Roulson M. A milk-borne outbreak of serious infection due to *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C). *Epidemiol Infect* 1988;101:43-51.
311. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2, 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2000:2156-2167.
312. Edwards MS, Kasper DL, Jennings H, et al. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* 1982;128:1278-1283.
313. Efstratiou A, Emery M, Lamagni TL, et al. Increasing incidence of group A streptococcal infections amongst injecting drug users in England and Wales. *J Med Microbiol* 2003;52:525-526.
314. Eggemeijer F, Petit P, Dijkmans BA. Total knee arthroplasty infection due to *Gemella haemolysans*. *Br J Rheumatol* 1992;31:67-69.
315. Eisenberger U, Brunkhorst R, Perharic L, et al. *Gemella morbillorum*—spondylodiscitis in a patient with a renal graft. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1565-1567.
316. Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson H, et al. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experience from the South Swedish pneumococcal intervention project. *Clin Infect Dis* 1997;25:1113-1117.
317. Eldar A, Frelief PF, Assenta L, et al. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:840-842.
318. Eldar A, Ghittino C, Asanta L, et al. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae* a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol* 1996;32:85-88.
319. Eledrisi MS, Zuckerman MJ, Ho H. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus bovis*. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1110-1111.
320. Elhanen G, Raz R. Group B streptococcal vertebral osteomyelitis in an adult. *Infection* 1993;21:397-399.
321. Eliopoulos GM. Increasing problems in the therapy of enterococcal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:409-412.
322. Elliott IA, Collins MD, Pigott NE, Facklam RR. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J Clin Microbiol* 1991;29:2731-2734.
323. Elliott JA, Facklam RR. Identification of *Leuconostoc* spp. by soluble whole cell protein patterns. *J Clin Microbiol* 1993;31:1030-1033.
324. Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. *J Clin Microbiol* 1998;36:2115-2116.
325. Elliott PM, Williams H, Brooksby IAB. A case of infective endocarditis in a farmer caused by *Streptococcus equinus*. *Eur Heart J* 1993;14:1291-1293.
326. Elsayed S, Hammerberg O, Massey V, Hussain Z. *Streptococcus equi* subspecies *equi* (Lancefield group C) meningitis in a child. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:869-872.
327. Emiliani VJ, Chodos JE, Comer GM, et al. *Streptococcus bovis* brain abscess associated with an occult colonic villous adenoma. *Am J Gastroenterol* 1990;85:78-80.
328. Erdogan S, Fagan PK, Talay SR, et al. Molecular analysis of group B protective surface protein, a new cell surface protective antigen of group B streptococci. *Infect Immun* 2002;70:803-811.
329. Erickson D, Doster AR, Pokorny TS. Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. *J Am Vet Assoc* 1984;185:666-668.
330. Espinoza R, Kusne S, Pascual AW, et al. *Leuconostoc* bacteremia after liver transplantation: another cause of vancomycin-resistant gram-positive infection. *Clin Transplant* 1997;11:322-324.
331. Evaldson GR, Malmberg A-S, Nord CE. Premature rupture of the membranes and ascending infection. *Br J Obstet Gynaecol* 1982;89:793-801.
332. Ezaki T, Facklam RR, Takeuchi N, et al. Genetic relatedness between the type strain of *Streptococcus anginosus* and minute-colony-forming β -hemolytic streptococci carrying different Lancefield grouping antigens. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:345-347.
333. Facklam RR. Specificity study of kits for detection of group A streptococci directly from throat swabs. *J Clin Microbiol* 1987;25:504-508.
334. Facklam R, Beall B, Efstratiou A, et al. *emm* typing and validation of provisional M types or group A streptococci. *Emerg Infect Dis* 1999;5:247-253.

335. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989;27:731-734.
336. Facklam R, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:479-495.
337. Facklam R, Elliott J, Pigott N, Franklin AR. Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. *J Clin Microbiol* 1995;33:385-388.
338. Facklam R, Hollis D, Collins MD. Identification of gram-positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J Clin Microbiol* 1989;27:724-730.
339. Facklam R, Lovgren M, Shewmaker PL, Tyrrell G. Phenotypic description and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* isolates from human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003;41:2587-2592.
340. Facklam RR, Martin DR, Lovgren M, et al. Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm103* to *emm124*. *Clin Infect Dis* 2002;34:28-38.
341. Facklam R, Pigott N, Franklin R, et al. Evaluation of three disk tests for identification of enterococci, leuconostocs, and pediococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:885-887.
342. Facklam RR, Thacker LG, Fox B, et al. Presumptive identification of streptococci with a new test system. *J Clin Microbiol* 1982;15:987-990.
343. Faden H, Dryja D. Recovery of a unique bacterial organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media. *J Clin Microbiol* 1989;27:2488-2491.
344. Farley MM. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 2001;33:556-561.
345. Farley MM, Harvey C, Stull T, et al. A population-based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in non-pregnant adults. *N Engl J Med* 1993;328:1807-1811.
346. Farmaki E, Roidides E, Darlis E, et al. *Gemella morbillorum* endocarditis in a child. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:751-753.
347. Farrow JAE, Collins MD. DNA base composition, DNA-DNA homology, and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol* 1984;130:357-362.
348. Farrow JAE, Collins MD. Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G, and L and possibly related taxa. *Syst Appl Microbiol* 1984;5:483-493.
349. Farrow JAE, Collins MD. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:73-75.
350. Farrow JAE, Facklam RR, Collins MD. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:279-283.
351. Farrow JAE, Kruze J, Phillips BA, et al. Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*: description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 1984;5:467-483.
352. Fasano FJ, Graham DR, Stauffer ES. Vertebral osteomyelitis secondary to *Streptococcus agalactiae*. *Clin Orthop* 1990;256:101-104.
353. Fast DJ, Schlievert PM, Nelson RD. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. *Infect Immun* 1989;57:291-294.
354. Felmingham D, Wilson APR, Quintana AI, Gruneberg RN. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1992;15:295-301.
355. Fenoll A, Martinez-Suarez JV, Munoz R, et al. Identification of atypical strains of *Streptococcus pneumoniae* by a specific DNA probe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:396-401.
356. Ferrer JC, Padilla JJV, Igual RI, et al. *Streptococcus bovis* meningitis: no association with colonic malignancy. *Clin Infect Dis* 1993;17:527-528.
357. Ferrer S, deMiguel G, Domingo P, et al. Pulmonary infection due to *Leuconostoc* species in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;21:225-226.
358. Ferrieri P. Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogen. *Rev Infect Dis* 1990;12(Suppl 4):S394-S400.
359. Ferrieri P, Cleary PP, Seeds SE. Epidemiology of group B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol* 1976;13:273-280.
360. Fillit HM, McCarty M, Blake M. Induction of antibodies to hyaluronic acid by immunization of rabbit with encapsulated streptococci. *J Exp Med* 1986;164:762-776.
361. Fines M, Perichon B, Reynolds PE, et al. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2161-2164.
362. Finlay FO, Witherow H, Rudd PT. Latex agglutination testing in bacterial meningitis. *Arch Dis Child* 1995;73:160-163.
363. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:285-314.
364. Fisher LE, Russell RRB. The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. *J Dent Res* 1993;72:1191-1193.
365. Flanagan PG, Mills RG. Fulminant septicemia due to *Streptococcus milleri* infection in a previously healthy adult. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:247-248.
366. Flint SH, Ward LJH, Brooks JD. *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:759-767.
367. Food and Drug Administration. Risks of devices for direct detection of group B streptococcal antigen. *J Nurse Midwifery* 1997;42:408-409.
368. Ford M, Perry JD, Gould FK. Use of cephalixin-aztreonam-arabinose agar for selective isolation of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2999-3001.
369. Forni AL, Kaplan EL, Schlievert PM, et al. Clinical and microbiological characteristics of severe group A streptococcus infections and streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Infect Dis* 1995;21:333-340.
370. Fox K, Turner J, Fox A. Role of β -hemolytic group C streptococci in pharyngitis: incidence and biochemical characteristics of *Streptococcus equismitis* and *Streptococcus anginosus* in patients and healthy controls. *J Clin Microbiol* 1993;31:804-807.
371. Fox KL, Born MW, Cohen MA. Fulminant infection and toxic shock syndrome caused by *Streptococcus pyogenes*. *J Emerg Med* 2002;22:357-366.
372. Fraimow HS, Jungkind DL. Vancomycin-dependent enterococci: a clinical and laboratory assessment. *Adv Exp Med Biol* 1995;390:97-107.
373. Fraimow HS, Jungkind DL, Lander DW, et al. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Ann Intern Med* 1994;121:22-26.
374. Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973;82:707-718.
375. Francis AJ, Nimmo GR, Elstratou A, et al. Investigation of milk-borne *Streptococcus zooepidemicus* infection associated with glomerulonephritis in Australia. *J Infect* 1993;27:317-323.
376. Frandsen EVG, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:129-133.
377. French GL, Talsania H, Phillips I. Identification of viridans streptococci by pyrolysis-gas chromatography. *J Med Microbiol* 1989;29:19-27.
378. Freney J, Bland S, Etienne J, et al. Description and evaluation of the semiautomated 4-hour rapid ID 32 Strep method for identification of streptococci and members of related genera. *J Clin Microbiol* 1992;30:2657-2661.
379. Fresard S, Michel VP, Rueda X, et al. *Gemella hemolysans* endocarditis. *Clin Infect Dis* 1993;16:586-587.
380. Friedland IR, Snipelsky M, Khoosal M. Meningitis in a neonate caused by *Leuconostoc* sp. *J Clin Microbiol* 1990;28:2125-2126.
381. Friedman CA, Wender DF, Rawson JE. Rapid diagnosis of group B streptococcal infection utilizing a commercially available latex agglutination assay. *Pediatrics* 1984;73:27-30.
382. Gallagher PG, Watanakunakorn C. Group B streptococcal endocarditis report of seven cases and review of the literature, 1962-1985. *Rev Infect Dis* 1986;8:175-188.
383. Galli D, Wirth R. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance. *J Bacteriol* 1991;173:3029-3033.
384. Garcia S, Combalia A, Segur JM. Septic arthritis of the shoulder due to *Streptococcus agalactiae*. *Acta Orthop Belg* 1996;62:66-68.
385. Garcia-Lechuz JM, Bachiller P, Vassallo FJ, et al. Group B streptococcal osteomyelitis in adults. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:191-199.
386. Gardam MA, Low DE, Saginur R, Miller MA. Group B streptococcal necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome in adults. *Arch Intern Med* 1998;158:1704-1708.
387. Garland SM, Fliegner JR. Group B streptococcus and neonatal infections: the case for intrapartum prophylaxis. *Aust NZ J Obstet Gynecol* 1991;31:119-122.
388. Garvie EL. *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J Gen Microbiol* 1967;48:431-438.
389. Gavin PJ, Thomson RB Jr, Horng S-J, Yagov R. Neonatal sepsis caused by *Streptococcus bovis* variant (biotype II/2): report of a case and review. *J Clin Microbiol* 2003;41:3433-3435.
390. Gelfand MS, Hughey JR, Sloas DD. Group B streptococcal bacteremia associated with adenocarcinoma of the stomach. *Clin Infect Dis* 1994;19:364.
391. Gelfand MS, Threlkeld MG. Subacute bacterial endocarditis secondary to *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Med* 1992;93:91.
392. George AL Jr, Savage AM. Fatal group B streptococcal empyema in an adult. *South Med J* 1987;80:1436-1438.
393. Gerber MA. Comparison of throat cultures and rapid strep tests for diagnosis of streptococcal pharyngitis. *Pediatr Infect Dis* 1989;8:820-824.
394. Gerber MA, Randolph MF, DeMeo KK. Liposome immunoassay for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. *J Clin Microbiol* 1990;28:1463-1464.
395. Gesner M, Desiderio D, Kim M, et al. *Streptococcus pneumoniae* in human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:697-703.
396. Gholizadeh Y, Courvalin P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:S11-S17.
397. Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal β -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 1999;45:626-634.
398. Gieseke KE, Roe MH, MacKenzie T, Todd JK. Evaluating the American Academy of Pediatrics diagnostic standard for *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: backup culture versus repeat rapid antigen testing. *Pediatrics* 2003;111:e666-e670.
399. Gilad J, Borer A, Riesenberk K, et al. *Enterococcus hirae* septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:576-577.
400. Gillespie RS, Symons JM, McDonald RA. Peritonitis due to *Leuconostoc* species in a child receiving peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 2002;17:966-968.
401. Gilon D, Moses A. Carcinoma of the colon presenting as *Streptococcus equinus* bacteremia. *Am J Med* 1989;86:135-136.
402. Giraud P, Attal M, Lemouzy J, et al. *Leuconostoc*: a potential pathogen in bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341:1481-1482.
403. Givner LB, Mason EO Jr, Tan TQ, et al. Pneumococcal endocarditis in children. *Clin Infect Dis* 2004;38:1273-1278.

434. Godeau B, Bachir D, Schaeffer A, et al. Severe pneumococcal sepsis and meningitis in human immunodeficiency virus-infected adults with sickle cell disease. *Clin Infect Dis* 1992;15:327-329.
405. Gold HS. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clin Infect Dis* 2001;33:210-219.
406. Golden S. Group A streptococcus and streptococcal toxic shock syndrome: a post-partum case report. *J Midwifery Womens Health* 2003;48:357-359.
407. Goldschmidt JC, Panos C. Teichoic acids of *Streptococcus agalactiae*: chemistry, cytotoxicity, and effect on bacterial adherence. *Infect Immun* 1984;43:670-677.
408. Goldshlack P, Blackburn G, Lancefield group G streptococcus septic arthritis in a heroin user: report of a case. *J Am Osteopath Assoc* 1984;84:60-61.
409. Goldstein I, Rebeyrotte P, Parlebas J, et al. Isolation from heart valves of glycopeptides which share immunological properties with *Streptococcus haemolyticus* group A polysaccharides. *Nature* 1968;219:866-868.
410. Golledge CL, Stringemore N, Aravena M, et al. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. *J Clin Microbiol* 1991;28:1678-1679.
411. Gomez-Garcés J-L, Alos J-I, Cogollos R. Bacteriological characteristics and antimicrobial susceptibility of 70 clinically significant isolates of the *Streptococcus milleri* group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19:69-73.
412. Gonzalez-Quintela A, Marín-Rey C, Castroagudín JF, et al. Prevalence of liver disease in patients with *Streptococcus bovis* bacteremia. *J Infect* 2001;42:116-119.
413. Gordillo ME, Singh KV, Murray BF. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1570-1574.
414. Gordon DM, Oster CN. Hemalogenous group B streptococcal osteomyelitis in an adult. *South Med J* 1984;77:643-645.
415. Gordon KA, Biedenbach DJ, Jones RN. Comparison of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* susceptibilities from community-acquired respiratory tract infections and hospitalized patients with pneumonia: five-year results for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:285-289.
416. Goroncy-Bermes P, Dale JB, Beachey EH, et al. Monoclonal antibody to human renal glomeruli cross-reacts with streptococcal M-protein. *Infect Immun* 1987;55:2416-2419.
417. Goshom SC, Bohach GA, Schlievert PM. Cloning and characterization of the gene, *speC*, for pyrogenic exotoxin type C from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Gen Genet* 1988;212:66-70.
418. Goshom SC, Schlievert PM. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infect Immun* 1988;56:2518.
419. Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, et al. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. *J Med Microbiol* 2002;51:178-186.
420. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2192-2194.
421. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J Vet Diagn Invest* 1991;3:60-65.
422. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2590-2594.
423. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2633-2636.
424. Gottschalk M, LeBrun A, Jacques M, et al. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2156-2158.
425. Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unsolved questions. *Vet Microbiol* 2000;76:259-270.
426. Graber CJ, de Almeida KN, Atkinson JC, et al. Dental health and viridans streptococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:537-542.
427. Graninger W, Raggette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992;15:49-57.
428. Granowitz EV, Donaldson WR, Skolnick PR. Gas-forming soft tissue abscess caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Med* 1992;93:105-107.
429. Grant KA, Dickinson JH, Collins MD, et al. Rapid identification of *Aerococcus viridans* using the polymerase chain reaction and an oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol Lett* 1992;95:63-68.
430. Gray BM, Converse GM III, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980;142:923-933.
431. Gray BM, Dillon HC Jr. Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:201-207.
432. Gray BM, Dillon HC Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. *J Infect Dis* 1988;158:948-955.
433. Green M, Barbadora K, Michaels M. Recovery of vancomycin-resistant gram-positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1991;29:2503-2506.
434. Green M, Wadowsky RW, Barbadora K. Recovery of vancomycin-resistant gram-positive cocci from children. *Clin Microbiol* 1990;28:484-488.
435. Green PA, Campbell JR. Transient, asymptomatic bacteremia due to *Enterococcus avium* in a 33-month-old child. *Clin Infect Dis* 1994;19:561.
436. Greenberg DN, Ascher DP, Yoder BA, et al. Group B streptococcus serotype V. *J Pediatr* 1993;123:494-495.
437. Greub G, Devriese LA, Pot B, et al. *Enterococcus cecorum* septicemia in a malnourished adult patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:594-598.
438. Griffith SP, Gersony WM. Acute rheumatic fever in New York City (1969-1988): a comparative study of two decades. *J Pediatr* 1990;116:882-887.
439. Griffiths BB, McClain O. The role of iron in the growth and hemolysin (streptolysin S) production in *Streptococcus pyogenes*. *J Basic Microbiol* 1988;28:427-436.
440. Gruteke P, van Belkum A, Schouls LM, et al. Outbreak of group A streptococci in a burn center: use of pheno- and genotypic procedures for strain tracking. *J Clin Microbiol* 1996;34:114-118.
441. Guerin JM, Mofredj A, Leibinger F, et al. Group B streptococcus meningitis in an HIV-positive adult: case report and review. *Scand J Infect Dis* 2000;32:215-217.
442. Guerrero C, Martínez J, Menasalvas A, et al. Use of direct late agglutination testing of selective broth in the detection of group B streptococcal carriage in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:61-62.
443. Gullberg RM, Homann SR, Phair JP. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. *Rev Infect Dis* 1989;11:74-85.
444. Gutierrez F, Masia M, Rodríguez JC, et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis* 2003;36:286-292.
445. Haas J, Jernick SL, Scardina RJ, et al. Colonization of skin by *Helococcus kunzii*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2759-2761.
446. Hachey WE, Wiswell TE. Limitations in the usefulness of urine latex particle agglutination and hematologic measurements in diagnosing neonatal sepsis during the first week of life. *J Perinatol* 1992;12:240-245.
447. Hackett SP, Stevens DL. Streptococcal toxic shock syndrome: synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. *J Infect Dis* 1992;165:879-885.
448. Hackett SP, Stevens DL. Superantigens associated with staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome are potent inducers of tumor necrosis factor- β synthesis. *J Infect Dis* 1993;168:232-235.
449. Haddad PA, Repka TL, Weisdorf D. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* septic shock and meningitis complicating chronic graft versus host disease: a case report and review of the literature. *Am J Med* 2002;113:152-155.
450. Hall GE, Baddour LM. Apparent failure of endocarditis prophylaxis caused by penicillin-resistant *Streptococcus mitis*. *Am J Med Sci* 2002;324:51-53.
451. Hall GS, Gordon S, Schroeder S, et al. Case of synovitis potentially caused by *Dolosigranulum pigrum*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1202-1203.
452. Hamer DH, Egas J, Estrella B, et al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis* 2002;34:1025-1028.
453. Hamilton JR. Comparison of Meritec-Strep with Streptex for direct colony grouping of β -hemolytic streptococci from primary isolation and subculture plates. *J Clin Microbiol* 1988;26:692-695.
454. Hamoudi AC, Marcon MJ, Cannon HJ, et al. Comparison of three major antigen detection methods for the diagnosis of group B streptococcal sepsis in neonate. *Pediatr Infect Dis* 1983;2:432-435.
455. Han JK, Kerschner JE. *Streptococcus milleri*: an organism for head and neck infections and abscess. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:650-654.
456. Handley P, Coykendall A, Beighton D, et al. *Streptococcus crista* sp. nov., a viridans streptococcus with tufted fibrils, isolated from the human oral cavity and throat. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:543-547.
457. Handwerker S, Horowitz H, Coburn K, et al. Infection due to *Leuconostoc* species: six cases and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:602-610.
458. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sørensen UB. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* 2004;42:83-89.
459. Hanski E, Caparon M. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6172-6176.
460. Harbarth S, Uckay I. Are there patients with peritonitis who require empiric therapy for enterococcus? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:73-77.
461. Harbeck RJ, Teague J, Crossen GR, et al. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A streptococci from pharyngeal specimen: comparison with standard culture methods. *J Clin Microbiol* 1993;31:839-844.
462. Hardy S, Ruoff KL, Catlin EA, et al. Catheter-associated infection with a vancomycin-resistant gram-positive coccus of the *Leuconostoc* sp. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:519-520.
463. Hardwick RH, Taylor A, Thompson MH, et al. Association between *Streptococcus milleri* and abscess formation after appendicitis. *Ann R Coll Surg Engl* 2000;82:24-26.
464. Harley WB, Gibbs C, Horton JM. *Streptococcus bovis* meningitis associated with a colonic villous adenoma. *Clin Infect Dis* 1992;14:979-980.
465. Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 1984;29:843-848.
466. Hashikawa S, Iinuma Y, Furushita M, et al. Characterization of group C and group G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 2004;42:186-192.
467. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:1721-1724.
468. Hauser AR, Schlievert PM. Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between toxin and the streptococcal proteinase precursor. *J Bacteriol* 1990;172:4536-4542.
469. Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, et al. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Microbiol* 1991;29:1562-1567.

470. Heath CH, Bowen SF, McCarthy JS, Dwyer B. Vertebral osteomyelitis and discitis associated with *Abiotrophia adiacens* (nutritionally variant streptococcus) infection. *Aust NZ Med J* 1998;28:663.
471. Hechmann-Wittrup I, Chenoufi-Schaadt ML, Arpi M, Danneskiold-Samsøe B. Bacteremia complicated by vertebral osteomyelitis due to *Streptococcus bovis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:365-367.
472. Heelan JS, Wilbur S, Depetris G, Letourneau C. Rapid antigen testing for group A streptococcus by DNA probe. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;24:65-69.
473. Heilesen AM. Septicaemia due to *Aerococcus urinae*. *Scand J Infect Dis* 1994;26:759-760.
474. Heinz M, von Wintzingerode F, Moter A, et al. A case of septicemia with *Pediococcus acidilactici* after long-term antibiotic treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:946-948.
475. Heiter BJ, Bourbeau PP. Comparison of the Gen-Probe group A streptococcus direct test with culture and a rapid streptococcal antigen assay for diagnosis of streptococcal pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2070-2073.
476. Heiter BJ, Bourbeau PP. Comparison of two rapid streptococcal antigen detection assay with culture for diagnosis of streptococcal pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1408-1410.
477. Helft G, Tabone X, Metzger JP, Vacheron A. *Gemella haemolysans* endocarditis with colonic carcinoma. *Eur J Med* 1993;2:369-370.
478. Hendrickx B, Vandepitte J, DeWit P, Van den Bergh R. Brain abscess associated with *Streptococcus milleri*. A report of eight cases. *Acta Clin Belg* 1982;37:307-313.
479. Hepburn MJ, Fraser SL, Rennie TA, et al. Septic arthritis caused by *Granulicatella adiacens*: diagnosis by inoculation of synovial fluid into blood culture bottles. *Rheumatol Int* 2003;23:255-257.
480. Herwald H, Collin M, Muller-Esterl W, Björck L. Streptococcal cysteine protease releases kinins: a novel virulence mechanism. *J Exp Med* 1996;184:665-673.
481. Herwald H, Cramer H, Morgelin M, et al. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell* 2004;116:367-379.
482. Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, et al. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:405-406.
483. Higgins R, Gottschalk M, Mittal MK, et al. *Streptococcus suis* infections in swine: a 16-month study. *Can J Vet Res* 1990;54:170-173.
484. Hill AW, Leigh JA. DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis*: a useful tool for epidemiology of bovine mastitis. *Epidemiol Infect* 1989;103:165-271.
485. Ho AKC, Woo KS, Tse KK, et al. Infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J Infect* 1990;21:209-211.
486. Hoe N, Nakashima K, Grigsby D, et al. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M-I group A streptococcus strains. *Emerg Infect Dis* 1999;5:254-263.
487. Hoen B, Briançon S, Delahaye F, et al. Tumors of the colon increase the risk of developing *Streptococcus bovis* endocarditis: case-control study. *Clin Infect Dis* 1994;19:361-362.
488. Hoffman JA, Mason EO, Schutze GE, et al. *Streptococcus pneumoniae* infections in the neonate. *Pediatrics* 2003;112:1095-1102.
489. Hoffmann S. Detection of group A streptococcal antigen from throat swabs with five diagnostic kits in general practice. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:209-215.
490. Holland J, Wilson R, Cumpston N. *Gemella morbillorum* prosthetic valve endocarditis. *NZ Med J* 1996;109:367.
491. Holm SE, Nordstrand A, Stevens DL, Norgren M. Acute poststreptococcal glomerulonephritis. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. New York: Oxford University Press, 2000;152-162.
492. Homer KA, Denbow L, Whaley RA, et al. Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *J Clin Microbiol* 1993;31:1648-1651.
493. Honig E, Mouton JW, van der Meijden WJ. Can group B streptococci cause symptomatic vaginitis? *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7:206-209.
494. Honig E, Mouton JW, van der Meijden WJ. The epidemiology of vaginal colonization with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. *Eur J Obstet Gynecol* 2002;105:177-180.
495. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:105-113.
496. Hoyle L, Foster G, Falsen E, Collin MD. Characterization of a *Gemella*-like organism isolates from an abscess of a rabbit: description of *Gemella cuniculi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:2037-2041.
497. Hoyle L, Foster G, Falsen E, et al. *Facklamia miroungae* sp. nov., from a juvenile southern elephant seal (*Mirounga leonina*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1401-1403.
498. Hoyle L, Lawson PA, Foster G, et al. *Vagococcus fessus* sp. nov., isolated from a seal and a harbor porpoise. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1151-1154.
499. Hsueh P-R, Teng L-J, Chen Y-C, et al. Recurrent bacteremic peritonitis caused by *Enterococcus cecorum* in a patient with liver cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:2450-2452.
500. Huang IF, Chiou CC, Liu YC, Hsieh KS. Endocarditis caused by penicillin-resistant *Streptococcus mitis* in a 12-year-old boy. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35:129-132.
501. Huck W, Reed BD, French T, et al. Comparison of the Directigen 1-2-3 Group A Strep Test with culture for detection of group A β -hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol* 1989;27:1715-1718.
502. Hudson CR, Fedorka-Cray PJ, Jackson-Hall MC, Hiott LM. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. *Lett Appl Microbiol* 2003;36:245-250.
503. Husby G, van de Rijn I, Zabriskie JB, et al. Antibodies reacting with cytoplasm of subthalamic and caudate nuclei neurons in chorea and rheumatic fever. *J Exp Med* 1976;144:1094-1100.
504. Hutchins ME, Shores CG, Bauer MS, Yarbrough WG. Sinogenic subdural empyema and *Streptococcus anginosus*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1262-1266.
505. Huycke M, Gilmore M. In vitro survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv Ep Med Biol* 1997;418:781-784.
506. Hwang M, Ederer GM. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1975;11:114-115.
507. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, et al. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999;37:1436-1440.
508. Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. *J Microbiol Meth* 2001;46:99-105.
509. Igwe EL, Shewmaker PL, Facklam RR, et al. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa* and *smeZ* in invasive strains of β -hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiol Lett* 2003;229:259-264.
510. Ince A, Tiemer B, Gille J, et al. Total knee arthroplasty infection due to *Abiotrophia defectiva*. *J Med Microbiol* 2002;51:899-902.
511. Ingram DL, Suggs DM, Pearson AW. Detection of group B streptococcal antigen in early-onset and late-onset group B streptococcal disease with the Wellcogen Strep B latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1982;16:656-658.
512. Irvine MCG, Solomons NB. Atypical supraglottitis caused by *Streptococcus sanguis*. *J Laryngol Otol* 1990;104:430-431.
513. Isenberg HD, Vellozi EM, Shapiro J, et al. Clinical laboratory challenges in the recognition of *Leuconostoc* spp. *J Clin Microbiol* 1988;26:479-484.
514. Iwen PC, Rupp ME, Schreckenberger PC, Hinrichs SH. Evaluation of the revised MicroScan dried overnight Gram-Positive identification panel to identify *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1999;37:3756-3758.
515. Jackson DH, Hinder SM, Stringer J, Easmon CSF. Carriage and transmission of group B streptococci among STD clinic patients. *Br J Vener Dis* 1982;58:334-337.
516. Jackson LA, Hilsdon R, Farley MM, et al. Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann Intern Med* 1995;123:415-420.
517. Jackson MA, Columbo J, Boldrey A. Streptococcal fasciitis with toxic shock syndrome in the pediatric patient. *Orthop Nurs* 2003;22:4-8.
518. Jacobs AAC, Loeffen PLW, van den Berg AJG, et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (sulysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 1994;62:1742-1748.
519. Jacobs JA, de Krom MCT, Kellens JTC, et al. Meningitis and sepsis due to group G streptococcus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:224-225.
520. Jacobs JA, Pietersen HG, Stobberingh EE, Soeters PB. Bacteremia involving the "Streptococcus milleri" group: analysis of 19 cases. *Clin Infect Dis* 1994;19:704-713.
521. Jacobs JA, Pietersen HG, Stobberingh EE, Soeters PB. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*. Clinical relevance, hemolytic art serologic characteristics. *Am J Clin Pathol* 1995;104:547-553.
522. Jacobs JA, Schot CS, Schouls LM. The *Streptococcus anginosus* species comprises five 16S rRNA ribotypes with different phenotypic characteristics and clinical relevance. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1073-1079.
523. Jacobs JA, Stappers JLN, Sels JP. Endocarditis due to *Streptococcus oralis* in a patient with a colon tumour. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:557-558.
524. Jacobs JA, Stobberingh EE. Hydrolytic enzymes of *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus intermedius* in relation to infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:818-820.
525. Jacobs JA, Van Baar G, London NHJJ, et al. Prevalence of macrolide resistance genes in clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* ("S milleri") group. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2375-2377.
526. Jacobs MR. Treatment and diagnosis of infections caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992;15:119-127.
527. Jacoby GA. Prevalence and resistance mechanisms of common bacterial respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 1994;18:951-957.
528. Jadeja L, Kantarjian H, Bolivar R. *Streptococcus bovis* bacteremia and meningitis associated with chronic radiation enterocolitis. *South Med J* 1983;76:1588-1589.
529. Jaffe J, Natanson-Yaron S, Caparon MG, Hanski E, Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes* possesses two binding domain. *Mol Microbiol* 1996;21:373-384.
530. Jain AK, Agarwal SK, El-Sadr W. *Streptococcus bovis* bacteremia and meningitis associated with *Strongyloides stercoralis* colitis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1994;18:253-254.
531. Jasir A, Tanna A, Efstratiou A, Schalen C. Unusual occurrence of M type 77, antibiotic-resistant group A streptococci in southern Sweden. *J Clin Microbiol* 2001;39:586-590.
532. Jayarao BM, Dore JJ, Jr, Baumbach GA, et al. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus paruberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 1991;29:2774-2778.
533. Jelinkova J, Motlova J. Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V. *J Clin Microbiol* 1985;21:361-362.
534. Jensen TG, Konradsen HB, Bruun B. Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:417-423.

535. Jerng JS, Hsueh PR, Teng LJ, et al. Empyema thoracis and lung abscess caused by viridans streptococci. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1508-1514.
536. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462-478.
537. Jett BD, Jensen HG, Atkuri V, Gilmore MS. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:9-16.
538. Jevon GP, Dunne WM, Jr, Hawkins HK, et al. Fatal group A streptococcal meningitis and toxic shock-like syndrome: case report. *Clin Infect Dis* 1994;18:91-93.
539. Ji Y, Schnitzler N, DeMaster E, Cleary P. Impact of M49, Mrp, Enn, and C5a peptidase proteins on colonization of the mouse oral mucosa by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1998;66:5399-5405.
540. Jimenez-Mejias ME, Becerril B, Gomez-Cia T, et al. Bacteremia caused by *Leuconostoc cremoris* in patient with severe burn injuries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:533-535.
541. Jobin M-C, Grenier D. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;220:113-119.
542. John CC. Treatment failure with use of third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:188-193.
543. Johnson DR, Kaplan EL. A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. *J Med Microbiol* 1993;38:311-315.
544. Jones AL, Needham RHV, Clancy A, et al. Penicillin binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Mol Microbiol* 2003;47:247-256.
545. Jones ME, Blosser-Middleton RS, Critchley IA, et al. In vitro susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*: a European multicenter study during 2000-2001. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:590-599.
546. Jones RN, Pfaller MA. In vitro activity of newer fluoroquinolones for respiratory tract infections and emerging patterns of antimicrobial resistance. Data from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis* 2000;31(Suppl 2):S16-S23.
547. Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-195.
548. Kanamoto T, Sato S, Inoue M. Genetic heterogeneities and phenotypic characteristics of strains of the genus *Abiotrophia* and proposal of *Abiotrophia paraadiacens* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2000;38:492-498.
549. Kaplan EL, Johnson DR, Del Rosario MC, Horn DL. Susceptibility of group A β -hemolytic streptococci to thirteen antibiotics: examination of 301 strains isolated in the United States between 1994 and 1997. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:1069-1072.
550. Karakousis PC, Page KR, Varello MA, et al. Waterhouse-Friderichsen syndrome after infection with group A streptococcus. *May Clin Proc*. 2001;76:1167-1170.
551. Karlowsky JA, Jones ME, Mayfield DC, et al. Ceftriaxone activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens isolated in U.S. clinical microbiology laboratories from 1996 to 2000: results from The Surveillance Network (TSN) database-USA. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:413-426.
552. Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, et al. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:48-52.
553. Kataoka Y, Yoshida T, Sawada T. A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in Japan. *J Vet Med Sci* 2000;62:1053-1057.
554. Kaufhold A, Ferrieri P. Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J Clin Microbiol* 1991;29:1075-1077.
555. Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, et al. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:19-25.
556. Kaufhold A, Potgieter E. Chromosomally mediated high-level gentamicin-resistance in *Streptococcus mitis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2740-2742.
557. Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, et al. Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. and *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:798-803.
558. Kawamura Y, Hou X-C, Sultana F, et al. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:406-408.
559. Kawamura Y, Hou X-G, Todome Y, et al. *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:921-927.
560. Kawamura Y, Whiley RA, Shu S-E, et al. Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* 1999;145:2605-2613.
561. Keay L, Harmis N, Corrigan K, et al. Infiltrative keratitis associated with extended wear of hydrogel lenses and *Abiotrophia defectiva*. *Cornea* 2000;19:864-869.
562. Keiser P, Campbell W. "Toxic strep syndrome" associated with group C streptococci. *Arch Intern Med* 1992;152:882-884.
563. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol* 2001;39:3373-3375.
564. Kerbaugh MA, Evans JB. *Aerococcus viridans* in the hospital environment. *Appl Microbiol* 1968;16:519-523.
565. Kern W, Vanek E. *Aerococcus* bacteremia associated with granulocytopenia. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:670-673.
566. Kikuchi K, Enari T, Totsuka K-I, Shimizu K. Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, and results with a commercial rapid bio-chemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1215-1222.
567. Kilian M. Recommended conservation of the names *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, and seven other names included in the Approved Lists of Bacterial Names. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:723-724.
568. Kilian M, Mikkelsen L, Henriksen J. Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:471-484.
569. Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:160-162.
570. Kilpper-Balz R, Schkifer KH. Transfer of *Streptococcus morbillorum* to the genus *Gemella* as *Gemella morbillorum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:442-443.
571. Kilpper-Balz R, Wenzig P, Schleifer KH. Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:482-488.
572. Kim J, Chun J, Han H-U. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1915-1919.
573. Kim N, Lazar JM, Cunha BA, et al. Multi-valvular endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:207-212.
574. Kimberlin DW. Meningitis in the neonate. *Curr Treat Options Neurol* 2002;4:239-248.
575. King SJ, Heath PJ, Luque I, et al. Distribution and genetic diversity of suisysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suisysin absence. *Infect Immun* 2001;69:7572-7582.
576. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol* 2002;40:3671-3680.
577. Klein JO. Otitis media. *Clin Infect Dis* 1994;19:823-833.
578. Klein RS, Recca RA, Catalano MT, et al. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med* 1977;296:800-802.
579. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:171-196.
580. Knight RG, Shlaes DM. Physiological characteristics and deoxyribonucleic acid relatedness of *Streptococcus bovis* and *Streptococcus bovis* (var.). *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:357-361.
581. Knudsen LM, Hartman PA. Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Appl Env Microbiol* 1992;58:3027-3031.
582. Kogan G, Uhrin D, Brisson J-R, et al. Structure and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem* 1996;271:8786-8796.
583. Kong F, Gowan S, Martin D, et al. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2002;40:216-226.
584. Kong F, Gowan S, Martin D, et al. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. *J Clin Microbiol* 2002;40:620-626.
585. Koorevaar CT, Scherpenzeel PGN, Neijens HJ, et al. Childhood meningitis caused by enterococci and viridans streptococci. *Infection* 1992;20:118-121.
586. Kouppari G, Zaphiropoulou A, Stamos G, et al. Pneumococcal acute otitis media in children. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:69-73.
587. Kreft B, Marre R, Schramm U, et al. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992;60:25-30.
588. Kreikemeyer B, Talay SR, Chhatwal GS. Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol Microbiol* 1995;17:137-145.
589. Kuhls TL, Viering TP, Leach CT, et al. Relapsing pneumococcal bacteremia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 1992;14:1050-1054.
590. Kusuda R, Kawai K, Salati F, et al. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:406-409.
591. Lachnauer CS, Kasper DL, Shimada J, et al. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999;179:1030-1033.
592. LaClaire L, Facklam R. Antimicrobial susceptibility and clinical sources of *Dolosigranulum pigrum* cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2001-2003.
593. LaClaire L, Facklam R. Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of *Facklamia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2130-2132.
594. LaClaire LL, Facklam RR. Comparison of three commercial rapid identification systems for the unusual Gram-positive cocci *Dolosigranulum pigrum*, *Ignavigranulum ruoffiae*, and *Facklamia* species. *J Clin Microbiol* 2000;38:2037-2042.
595. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 2000;146:1913-1921.
596. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of β -hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;57:571-595.
597. Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* 1962;89:307-313.
598. Landman D, Quale JM, Odyne E, et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:751-752.
599. Lang MM, Towers C. Identifying poststreptococcal glomerulonephritis. *Nurse Pract* 2001;26:34, 37-47.

600. LaScola B, Raoult D. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1998;36:866-871.
601. Lattore M, Alvarez M, Fernandez JM, et al. A case of meningitis due to "*Streptococcus zooepidemicus*." *Clin Infect Dis* 1993;17:932-933.
602. Law-Brown J, Meyers PR. *Enterococcus phenoliculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the red-billed wood-hoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:683-685.
603. Lawlor MT, Crowe HM, Quintiliani R. Cellulitis due to *Streptococcus pneumoniae*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:247-250.
604. Lawrence J, Yajko DM, Hadley WK. Incidence and characterisation of β -hemolytic *Streptococcus milleri* and differentiation from *S. pyogenes* (group A), *S. equisimilis* (group C), and large colony group G streptococci. *J Clin Microbiol* 1985;22:772-777.
605. Lawson PA, Collins MD, Falsen E, et al. *Facklamia languida* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:1161-1164.
606. Lawson PA, Falsen E, Ohlen M, Collins MD. *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., isolated from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:683-686.
607. Lawson PA, Falsen E, Truberg-Jensen K, Collins MD. *Aerococcus sanguicola* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:475-479.
608. Lawson PA, Foster G, Falsen E, et al. *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1251-1254.
609. Lawson PA, Foster G, Falsen E, et al. *Abiotrophia balaenopterae* sp. nov., isolated from the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:503-506.
610. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2005-2008.
611. Lee KC, Tsai YT, Lin CY, Tsai CS. Vertebral osteomyelitis combined streptococcal viridans endocarditis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:125-127.
612. Lee P-C, Wetherall BL. Cross-reaction between *Streptococcus pneumoniae* and group C streptococcal latex reagent. *J Clin Microbiol* 1987;25:152-153.
613. Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, et al. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2724-2728.
614. LeFort A, Lortholary O, Casassus P, et al. Comparison between adult endocarditis due to β -hemolytic streptococci (serogroups A, B, C, and G) and *Streptococcus milleri*: a multicenter study in France. *Arch Intern Med* 2002;162:2450-2456.
615. Lefort A, Mainardi JL, Selton-Suty C, et al. *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in adults: a multicenter study in France in the era of penicillin resistance (1991-1998). *Medicine (Baltimore)* 2000;79:327-337.
616. Leggiadro RJ, Birnbaum SE, Chase NA, et al. A resurgence of acute rheumatic fever in a mid-South children's hospital. *South Med J* 1990;83:1418-1420.
617. Legier JF. *Streptococcus salivaris* meningitis and colonic carcinoma. *South Med J* 1991;84:1058-1059.
618. Leibovitch G, Maaravi Y, Shalev O. Multiple brain abscesses caused by *Streptococcus bovis* J Infect 1991;23:195-196.
619. Lentnek AL, Giger O, O'Rourke E. Group A β -hemolytic streptococcal bacteremia and intravenous drug abuse: a growing clinical problem? *Arch Intern Med* 1990;150:89-93.
620. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, et al. *Alloisococcus otitidis* in acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004;68:51-56.
621. Levin JC, Wessels MR. Identification of *csrR/csrS* a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol* 1998;30:209-219.
622. Levy CS, Kogulan P, Gill VJ, et al. Endocarditis caused by penicillin-resistant viridans streptococci: two cases and controversies in therapy. *Clin Infect Dis* 2001;33:577-579.
623. Li Y, Pan Y, Qi F, Caulfield PW. Identification of *Streptococcus sanguinis* with a PCR-generated species-specific DNA probe. *J Clin Microbiol* 2003;41:3481-3486.
624. Lim DV, Morales WJ, Walsh AF. Reduction of morbidity and mortality rate for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. *J Clin Microbiol* 1986;23:489-492.
625. Lim DV, Morales WJ, Walsh AF. Lim group B strep broth and coagglutination for rapid identification of group B streptococci in preterm pregnant women. *J Clin Microbiol* 1987;25:452-453.
626. Limia A, Jimenez ML, Alarcon T, Lopez-Brea M. Five-year analysis of antimicrobial susceptibility of the *Streptococcus milleri* group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:440-444.
627. Lin FY, Azimi PH, Weisman LE, et al. Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates, 1995; 1998. *Clin Infect Dis* 2000;31:76-79.
628. Lin FY, Clemens JD, Azimi PH, et al. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. *J Infect Dis* 1998;177:790-792.
629. Lischke JH, McCreight PHB. Maternal group B streptococcal vertebral osteomyelitis: an unusual complication of vaginal delivery. *Obstet Gynecol* 1990;76:489-491.
630. Llewellyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2001;2:156-162.
631. Loeb M. Pneumonia in older persons. *Clin Infect Dis* 2003;37:1335-1339.
632. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
633. Lopez-Dupla M, Creus M, Navarro O, Raga X. Association of *Gemella morbillorum* endocarditis with adenomatous polyps and carcinoma of the colon: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;22:379-380.
634. Losonsky GA, Wolf A, Schwalbe RS, et al. Successful treatment of meningitis due to multiply resistant *Enterococcus faecium* with a combination of intrathecal teicoplanin and intravenous antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 1994;19:163-165.
635. Lu C-H, Chang W-N, Chang H-W. Streptococcal meningitis in adults: therapeutic outcomes and prognostic factors. *Clin Neurol Neurosurg* 2001;103:137-142.
636. Lu C-H, Chang W-N, Chang H-W. Adults with meningitis caused by viridans streptococci. *Infection* 2001;29:305-309.
637. Lu C-H, Chang W-N, Lin Y-C, et al. Bacterial brain abscess: microbiological features, epidemiological trends, and therapeutic outcomes. *QJ Med* 2002;95:501-509.
638. Lu H-Z, Weng X-H, Zhu B, et al. Major outbreak of toxic shock-like syndrome caused by *Streptococcus mitis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3051-3055.
639. Luck S, Torny M, d'Agapeyeff K, et al. Estimated early-onset group B streptococcal neonatal disease. *Lancet* 2003;361:1953-1954.
640. Ludwig W, Weizenegger M, Kilpper-Balz R, et al. Phylogenetic relationships of anaerobic streptococci. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:15-18.
641. Luginbuhl LM, Rotbart HA, Facklam RR, et al. Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis* 1987;6:1022-1030.
642. Luque L, Tarradas C, Arenas A, et al. *Streptococcus suis* serotypes associated with different disease conditions in pigs. *Vet Rec* 1998;142:726-727.
643. Luticken R, Temme N, Hahn G, Bartelheimer EW. Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Infection* 1986;14:181-185.
644. Luyx C, Vanpee D, Glupczynski Y, et al. Delayed diagnosis of meningitis caused by β -haemolytic group G streptococcus in an older woman. *J Emerg Med* 2001;21:393-396.
645. Lyytikäinen O, Rautio M, Carlson P, et al. Nosocomial bloodstream infections due to viridans streptococci in haematological and non-haematological patient: species distribution and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:631-634.
646. Mackey T, Lejeune V, Janssens M, et al. Identification of vancomycin-resistant lactic acid bacteria isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1993;31:2499-2501.
647. Macy MG, Whitley RA, Miller L, Nagamune H. Effect on polymorphonuclear cell function of a specific cytotoxin, intermedilysin, expressed by *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun* 2001;69:6102-6109.
648. Madsen LW, Svensmark B, Elvestad K, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J Comp Pathol* 2002;126:57-65.
649. Maher D. *Streptococcus suis* septicaemia presenting as severe, acute gastroenteritis. *J Infect* 1990;21:303-304.
650. Mäkinen P-L, Mäkinen KK. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC3.4.24.30: Coccylisin) inactivates human endothelin and bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:981-985.
651. Manachini PL, Flint SH, Ward LJH, et al. Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint et al. 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou et al. 1998). *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:945-951.
652. Mannion PT, Rothburn MM. Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis* assisted by immunoblotting of serum antibodies. *J Infect* 1990;21:317-326.
653. Manzella J P. *Streptococcus bovis* bacteremia: diagnosis of neoplasms by colonoscopy. *South Med J* 1981;74:999-1000.
654. Marie J, Morvan H, Berthelot-Herauld F, et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:201-209.
655. Markowitz M, Kaplan EL. Rheumatic fever. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. New York: Oxford University Press, 2000:133-143.
656. Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group R streptococci. *Infect Immun* 1992;60:3986-3993.
657. Marrie TJ. Bacteremic community-acquired pneumonia due to viridans group streptococci. *Clin Invest Med* 1993;16:38-44.
658. Marrie TJ. Community acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 1994;18:501-515.
659. Marsal S, Castro-Guardiola A, Clemente C, et al. *Streptococcus bovis* endocarditis presenting as acute spondylodiscitis. *Br J Rheumatol* 1994;33:403-404.
660. Martin MA, Hebben JN, Bustamante CI, et al. Group A streptococcal bacteremias associated with intravenous catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990;11:542-544.
661. Martin TR, Ruzinski IT, Rubens CE, et al. The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lungs of infant and adult rats. *J Infect Dis* 1992;165:306-314.
662. Martinez-Murcia AJ, Collins MD. A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of *Leuconostoc fallax* sp nov. *FEMS Microbiol Lett* 1991;82:55-60.
663. Martinez-Murcia AJ, Collins MD. *Enterococcus sulfureus* a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 1991;80:69-74.
664. Martin-Galiano AJ, Balsalobre L, Fenoll A, de la Campa AG. Genetic characterization of Optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3187-3194.
665. Mascini EM, Jansze M, Schouls LM, et al. Penicillin and clindamycin differentially inhibit the production of pyrogenic exotoxins A and B by group streptococci. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:395-398.
666. Mason T, Fisher M, Kujala G. Acute rheumatic fever in West Virginia: not just a disease of children. *Arch Intern Med* 1991;151:133-136.

667. Mastro TD, Spika JS, Lozano P, et al. Vancomycin-resistant *Pedococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia. *J Infect Dis* 1990;161:956-960.
668. Matsubara K, Nishiyama Y, Katayama K, et al. Change of antimicrobial susceptibility of group B streptococci over 15 years in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:579-582.
669. Matsubara K, Sugiyama M, Hoshina K, et al. Early onset neonatal sepsis caused by serotype VIII group B streptococci. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:359-360.
670. Maugein J, Crouzet P, Cony Makhoul P, et al. Characterization and antibiotic susceptibility of *Pedococcus acidilactici* strains isolated from neutropenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:383-385.
671. May T, Amiel C, Lion C, et al. Meningitis due to *Gemella haemolysans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:644-645.
672. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:3446-3451.
673. McCarthy AE, Victor G, Ramotar K, et al. Risk factors for acquiring ampicillin-resistant enterococci and clinical outcomes at a Canadian tertiary-care hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:2671-2676.
674. McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, et al. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one serotype. *Infect Immun* 1991;59:222-228.
675. McDonald HM, Chambers HM. Intrauterine infection and spontaneous midgestation preterm abortion: is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:220-227.
676. McDonnell PJ, Kwitko S, McDonnell JM, et al. Characterization of infectious crystalline keratitis caused by a human isolate of *Streptococcus mitis*. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1147-1151.
677. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, et al. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3224-3228.
678. McLellan DG, Chiang EY, Courtney HS, et al. Spa contributes to the virulence of type 18 group A streptococci. *Infect Immun* 2001;69:2943-2949.
679. McLendon BF, Bron AJ, Mitchell CJ. *Streptococcus suis* type II (group R) as a cause of endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1978;62:729-731.
680. Megran DW. Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992;15:63-71.
681. Meier FA, Centor RM, Graham L, et al. Clinical and microbiologic evidence for endemic pharyngitis among adults due to group C streptococci. *Arch Intern Med* 1990;150:825-829.
682. Mellman RL, Spisak GM, Burakoff R. *Enterococcus avium* bacteremia in association with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:375-378.
683. Michael AF, Drummond KN, Good RA, et al. Acute poststreptococcal glomerulonephritis: immune deposit disease. *J Clin Invest* 1966;45:237-248.
684. Michel RS, DeFlora E, Jefferies J, et al. Recurrent meningitis in a child with inner ear dysplasia. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:336-338.
685. Michelow IC, McCracken G, Luckett PM, Krisher K. *Abiotrophia* sp. brain abscess in a child with Down's syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:760-762.
686. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatric*. 2004;113:701-707.
687. Mikkelsen L, Theilade E, Poulsen K. *Abiotrophia* species in early dental plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:263-268.
688. Miller PH, Facklam RR, Miller JM. Atmospheric growth requirements for *Alloicoccus* species and related Gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 1996;34:1027-1028.
689. Mitchell RG, Teddy PJ. Meningitis due to *Gemella haemolysans* after radiofrequency trigeminal rhizotomy. *J Clin Pathol* 1985;38:558-560.
690. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992;14:1173-1178.
691. Mohan UR, Walters S, Kroll JS. Endocarditis due to group A β -hemolytic streptococcus in children with potentially lethal sequelae: two cases and review. *Clin Infect Dis* 2000;30:624-625.
692. Moller M, Thomsen AC, Borch K, et al. Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet* 1984;2:69-70.
693. Mollick JA, Miller GG, Musser JM, et al. A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. *J Clin Invest* 1993;92:710-719.
694. Monsen T, Granlund M, Olofsson K, Olsen B. *Leuconostoc* spp. septicaemia in a child with short bowel syndrome. *Scand J Infect Dis* 1997;29:310-311.
695. Montalto M, La Regina M, Gemelli P, et al. Mitral valve endocarditis caused by *Streptococcus oralis* occurring after upper gastrointestinal endoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002;97:49-50.
696. Montejo M, Grande C, Valdivieso A, et al. Abdominal abscess due to *Leuconostoc* species in a liver transplant recipient. *J Infect* 2000;41:197-198.
697. Morales WJ, Lim DV. Reduction in group B streptococcal maternal and neonatal infections in preterm pregnancies with premature rupture of membranes through a rapid identification test. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:13-16.
698. Morea P, Toni M, Bressan M, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Gemella haemolysans*. *Infection* 1991;19:446.
699. Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Nosocomial urinary tract infections due to enterococci: ten years' experience at a university hospital. *Arch Intern Med* 1986;146:1549-1551.
700. Moshowitz M, Arber N, Wajzman R, et al. *Streptococcus bovis* endocarditis as a presenting manifestation of idiopathic ulcerative colitis. *Postgrad Med J* 1992;68:930-931.
701. Mulford JS, Mills J. Osteomyelitis caused by *Leuconostoc* species. *Aust NZ J Surg* 1999;69:541-542.
702. Muller MP, Low DE, Green KA, et al. Clinical and epidemiologic features of group A streptococcal pneumonia in Ontario, Canada. *Arch Intern Med* 2003;163:467-472.
703. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal resistance and virulence. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:513-522.
704. Munoz P, Coque T, Creixems MR, et al. Group B *Streptococcus*: a cause of urinary tract infection in non-pregnant adults. *Clin Infect Dis* 1992;14:492-496.
705. Munoz P, Llancaqueo A, Rodriguez-Creixems M, et al. Group B streptococcus bacteremia in nonpregnant adults. *Arch Intern Med* 1997;157:213-216.
706. Munoz R, Fenoll A, Vicioso D, et al. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;13:63-66.
707. Murdoch DR, Laing RTR, Mills GD, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3495-3498.
708. Murdoch DR, Reller LB. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3623-3624.
709. Murphy DJ Jr. Group A streptococcal meningitis. *Pediatrics* 1983;71:1-5.
710. Murray CK, Walter EA, Crawford S, et al. *Abiotrophia* bacteremia in a patient with neutropenic fever and antimicrobial susceptibility testing of *Abiotrophia* isolates. *Clin Infect Dis* 2001;32:E140-E142.
711. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000;2128-2147.
712. Musher DM, Groover JE, Rowland JM, et al. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, persistence, and response to revaccination. *Clin Infect Dis* 1993;17:66-73.
713. Musser M, Gray BM, Schlievert M, et al. *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: characterization of strains by multilocus enzyme genotype, M and T protein serotype, and pyrogenic exotoxin gene probing. *J Clin Microbiol* 1992;30:600-603.
714. Musser JM, Hauser AR, Kim MH, et al. *Streptococcus pyogenes* causing toxic shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2668-2672.
715. Namdari H, Kintner K, Jackson BA, et al. *Abiotrophia* species as a cause of endophthalmitis following cataract extraction. *J Clin Microbiol* 1999;37:1564-1566.
716. Namiduru M, Karaoglan I, Aktaran S, et al. A case of septicaemia, meningitis, and pneumonia caused by *Streptococcus bovis* type II. *Int J Clin Pract* 2003;735-736.
717. Nathavitharana KA, Arsecularatne SN, Aponso HA, et al. Acute meningitis in early childhood caused by *Aerococcus viridans*. *BMJ* 1983;286:1248.
718. Nathavitharana KA, Watkinson M. Neonatal pleural empyema caused by group A streptococcus. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:671-672.
719. Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1788-1793.
720. Nealon TJ, Mattingly SJ. Kinetic and chemical analysis of the biological significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect Immun* 1985;50:107-115.
721. Nichol P, Rod R, Corliss RF, Schurr M. Central myonecrosis in a patient with group A β -hemolytic streptococcus toxic shock syndrome. *J Trauma* 2003;55:994-996.
722. Nichols RL, Muzik AC. Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues. *Clin Infect Dis* 1992;15:72-76.
723. Nizet V, Gibson RL, Chi EY, et al. Group B streptococcal β -hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* 1996;64:3818-3826.
724. Nizet V, Gibson RL, Rubens CE. The role of group B streptococci β -hemolysin expression in newborn lung injury. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:627-630.
725. Nizet V, Kims KS, Stins M, et al. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* 1997;65:5074-5081.
726. Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;93:195-198.
727. Norfleet RG. Infectious endocarditis after fiberoptic sigmoidoscopy. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:448-451.
728. Noriega FR, Kotloff KL, Martin MA, et al. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:447-449.
729. Norby-Teglund A, Holm SE, Norgren M. Detection and nucleotide sequence analysis of the *speC* gene in Swedish clinical group A streptococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:705-709.
730. Norby-Teglund A, Newton D, Kotb M, et al. Superantigenic properties of the group A streptococcal exotoxin SPE F (MF). *Infect Immun* 1994;62:5227-5233.
731. Norby-Teglund A, Norby SR, Low DE. The treatment of severe group A streptococcal infections. *Curr Infect Dis Rep* 2003;5:28-37.
732. Obando I, Garcia-Navarrete A, Moreno MJ, Chileme A. Catheter-related *Streptococcus equisimilis* bacteremia in a four-month old infant with congenital CMV infection. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:910-911.
733. Obaro SK. The new pneumococcal vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:623-633.
734. O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, et al. Epidemiology of invasive group A streptococcus disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:268-276.
735. O'Brien KL, Swift AJ, Winkelstein JA. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM₁₉₇ among infants with sickle cell disease. *Pediatrics* 2000;106:965-972.

736. O'Connor AP, Cleary PP. Localization of the streptococcal C5a peptidase to the surface of group A streptococci. *Infect Immun* 1986;53:432-434.
737. Ofek I, Beachey EH, Jefferson W, Campbell GL. Cell-membrane binding properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. *J Exp Med* 1975;187:1161-1167.
738. Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Sasaki M, Kaneko M. Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2458-2463.
739. Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2489-2493.
740. Okada Y, Kitada K, Takagaki M, et al. Endocardial infectivity and binding to extracellular matrix proteins of oral *Abiotrophia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;27:257-261.
741. Okamoto Y, Ribeiro RC, Srivastava DK, et al. Viridans streptococcal sepsis: clinical features and complications in childhood acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:696-703.
742. Olmsted S, Dunny G, Erlandsen S, Wells C. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1994;170:1549-1556.
743. Olopoenia L, Frederick W, Greaves W, et al. Pneumococcal sepsis and meningitis in adults with sickle cell disease. *South Med J* 1990;83:1002-1004.
744. Omran Y, Wood CA. Endovascular infection and septic arthritis caused by *Gemella morbillorum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16:131-134.
745. Orange M, Gray BM. Pneumococcal serotypes causing disease in children in Alabama. *Pediatr Infect Dis* 1993;12:244-246.
746. Orfila C, Lepert JC, Modesto A, et al. Rapidly progressive glomerulonephritis associated with bacterial endocarditis: efficacy of antibiotic therapy alone. *Am J Nephrol* 1993;13:218-222.
747. Ormerod LD, Paton BG. Severe group B streptococcal eye infections in adult. *J Infect* 1989;18:29-34.
748. Ormerod LD, Ruoff KL, Meisler DM, et al. Infectious crystalline keratopathy: role of nutritionally variant streptococci and other bacterial factors. *Ophthalmology* 1991;98:159-169.
749. Osada T, Nagawa H, Masaki T, et al. Thoracic empyema associated with recurrent colon cancer: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2001;44:291-294.
750. Osawa R, Fujisawa T, Sly LI. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.: gallatedegrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Syst Appl Microbiol* 1995;18:74-78.
751. Pacifico L, Ranucci A, Ravagnan G, et al. Relative value of selective group A streptococcal agar incubated under different atmospheres. *J Clin Microbiol* 1995;33:2480-2482.
752. Paganini H, Staffolani V, Zubizarreta P, et al. Viridans streptococci bacteremia in children with fever and neutropenia: a case-control study of predisposing factors. *Eur J Cancer* 2003;39:1284-1289.
753. Panaro NR, Lutwick LI, Chapnick EK. Intrapartum transmission of group A *Streptococcus*. *Clin Infect Dis* 1993;17:79-81.
754. Pappas G, Liberopoulos E, Tsianos E, Elisaf M. *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and review. *J Infect* 2004;48:206-208.
755. Paredes A, Wong P, Mason EO Jr, et al. Nosocomial transmission of group B streptococci in a newborn nursery. *Pediatrics* 1976;59:679-682.
756. Park JW, Grossman O. *Aerococcus viridans* infection: case report and review. *Clin Pediatr* 1990;29:525-526.
757. Parola P, Brouqui P, Maurin M, Bourgeade A. A new case of *Streptococcus equisimilis* septic arthritis. *Clin Rheumatol* 1998;17:71-72.
758. Patel M, Ahrens JC, Moyer DV, et al. Pneumococcal soft-tissue infections: a problem deserving more recognition. *Clin Infect Dis* 1994;19:149-151.
759. Patel R, Keating MR, Cockerill FR III, et al. Bacteremia due to *Enterococcus avium*. *Clin Infect Dis* 1993;17:1006-1011.
760. Patel R, Piper K, Cockerill FR, et al. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:705-709.
761. Paton JC, Lock RA, Lee C-J, et al. Purification and immunogenicity of genetically toxoided derivatives of pneumolysin and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun* 1991;59:2297-2304.
762. Patterson JE, Masecar BL, Zervos MJ. Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:122-124.
763. Payne NR, Kim YK, Ferrieri P. Effect of differences in antibody and complement requirements on phagocytic uptake and intracellular killing of "c" protein-positive and -negative strains of type II group B streptococci. *Infect Immun* 1987;55:1243-1251.
764. Peel MM, Davis JM, Griffin KJ, Freedman DL. *Helcococcus kunzii* as sole isolate from an infected sebaceous cyst. *J Clin Microbiol* 1997;35:328-329.
765. Peetermans WE, Buyse B, Vanhoof J. Pyogenic abscess of the gluteal muscle due to *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1993;17:939.
766. Peetermans WEC, Moffie BG, Thompson J. Bacterial endocarditis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* 1989;159:595-596.
767. Perch B, Pedersen KB, Henriksen J. Serology of encapsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 1983;17:993-996.
768. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;43:2161-2164.
769. Pesson L, Vickerfors T, Sjöberg L, et al. Increased incidence of bacteraemia due to viridans streptococci in an unselected population of patients with acute myeloid leukemia. *Scand J Infect Dis* 2000;32:615-621.
770. Pesanti EL, Lyons RW, Verilli M, et al. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) as a risk factor for bacteremic illness due to *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Med* 1988;52:703-704.
771. Peters NS, Eykyn SJ, Rudd SG. Pneumococcal cellulitis: a rare manifestation of pneumococcaemia in adults. *J Infect* 1989;19:57-59.
772. Peters TR, Edwards KM. The pneumococcal protein conjugate vaccines. *J Pediatr* 2000;137:416-420.
773. Peyser A, Liebergall M, Bar-On E, et al. *Streptococcus bovis* osteomyelitis of the ileum. *Clin Infect Dis* 1994;19:205-206.
774. Phillips GN Jr, Flicker PF, Cohen C, et al. Streptococcal M protein: α -helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4689-4693.
775. Pien FD, Wilson WR, Kunz K, et al. *Aerococcus viridans* endocarditis. *Mayo Clin Proc* 1984;59:47-48.
776. Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, Keith JM. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J Infect Dis* 2001;184:582-590.
777. Pintado V, Cabellos C, Moreno S, et al. Enterococcal meningitis: a clinical study of 39 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:346-364.
778. Pokorski SJ, Vetter EA, Wollan PC, et al. Comparison of Gen-Probe group A streptococcus direct test with culture for diagnosing streptococcal pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1440-1443.
779. Pompei R, Lampis G, Berluti F, et al. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:2884-2886.
780. Porta G, Rodriguez-Carballeira M, Gomez L, et al. Thoracic infection caused by *Streptococcus milleri*. *Eur Respir J* 1998;12:357-362.
781. Pot B, Devriese LA, Hommez J, et al. Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *J Appl Bacteriol* 1994;77:362-369.
782. Potgieter E, Carmichael M, Koornhof HJ, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of viridans streptococci isolated from blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:543-546.
783. Powderly WG, Stanley SL Jr, Medoff G. Pneumococcal endocarditis: report of a series and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1986;8:786-791.
784. Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* as *Streptococcus lutetiensis* and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1247-1255.
785. Pradeep R, Ali M, Encarnacion CF. Retropharyngeal abscess due to *Gemella morbillorum*. *Clin Infect Dis* 1997;24:284-285.
786. Prakash PK, Biswas M, El Bouri K, et al. Pneumococcal necrotizing fasciitis in a patient with type 2 diabetes. *Diabet Med* 2003;20:899-903.
787. Prieto C, Garcia FJ, Suarez P, et al. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. *Zentralbl Veterinärmedizin Reihe B* 1994;41:608-617.
788. Pritchard DG, Lin B, Willingham TR, Baker JR. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys* 1994;315:431-437.
789. Proft T, Louise-Moffatt S, Berkahn CJ, Fraser JD. Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med* 1999;189:89-102.
790. Proft T, Sriskandan S, Yang L, Fraser JD. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1211-1218.
791. Prusakorn S, Currie B, Brandt E, et al. Towards a vaccine for rheumatic fever: identification of a conserved target epitope on M protein of group A streptococci. *Lancet* 1994;344:639-642.
792. Purdy RA, Cassidy B, Marrie TJ. *Streptococcus bovis* meningitis: report of two cases. *Neurology* 1990;40:1782-1784.
793. Quesy S, Busque P, Higgins R, et al. Description of an albumin-binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* 1997;147:245-250.
794. Quinn RW. Comprehensive review of morbidity and mortality trends for rheumatic fever, streptococcal disease, and scarlet fever: the decline of rheumatic fever. *Rev Infect Dis* 1989;11:928-953.
795. Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 1999;67:6067-6075.
796. Ramaswamy G, Ng A, Quinlan L, et al. *Streptococcus equisimilis* (group C) as a cause of ophthalmic infection. *Am J Clin Pathol* 1983;79:385-387.
797. Rasmussen SR, Aarestrup FM, Jensen SE. Associations of *Streptococcus suis* serotype 2 ribotype profiles with clinical disease and antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol* 1999;37:404-408.
798. Rasmussen SR, Andresen LO. 16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1063-1065.
799. Raval AN, Menkis AH, Boughner DR. Mitral valve aneurysm associated with aortic valve endocarditis and regurgitation. *Heart Surg Forum* 2002;5:298-299.
800. Ravighione MC, Tierno PM, Ottuso P, et al. Group G streptococcal meningitis and sepsis in a patient with AIDS. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:261-264.
801. Raymond J, Bergeret M, Francoal C, et al. Neonatal infection with *Streptococcus milleri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:799-801.
802. Reda KB, Kapur V, Mollick J, et al. Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen (ssa) from *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1994;62:1867-1874.

803. Redd SC, Rutherford GW III, Sande MA, et al. The role of human immunodeficiency virus infection in pneumococcal bacteremia in San Francisco residents. *J Infect Dis* 1990;162:1012-1017.
804. Reed C, Efstratiou A, Morrison D, et al. Glycopeptide-resistant *Gemella haemolyans* from blood. *Lancet* 1993;342:927-928.
805. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococci in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol* 1991;77:604-610.
806. Rehder CD, Johnson DR, Kaplan EL. Comparison of methods for obtaining serum opacity factor from group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:2963-2967.
807. Reid KC, Cockerill FR, Patel R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clin Infect Dis* 2001;32:1540-1546.
808. Reinert M, Bussing A, Kierdorf H, et al. Recurrent systemic pneumococcal infection in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:304-307.
809. Relf VA, Martin DR, Sriprakash KS. Identification of sequence types among the M-nontypeable group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1992;30:3190-3194.
810. Rennels MB, Edwards MB, Keyserling HL, et al. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM₉₇ in United States infants. *Pediatrics* 1998;101:604-611.
811. Rice LB, Calderwood SB, Eliopoulos GM, et al. Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Rev Infect Dis* 1991;13:1-7.
812. Riefler J, Molavi A, Schwartz D, et al. Necrotizing fasciitis in adults due to group B *Streptococcus*. *Arch Intern Med* 1988;148:727-729.
813. Riegel P, Lepargneur JP. Isolation of *Helicococcus kunzii* from a post-surgical foot abscess. *Int J Med Microbiol* 2003;293:437-439.
814. Ring A, Braun JS, Pohl J, et al. Group B streptococcal β -hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J Infect Dis* 2002;185:1745-1753.
815. Ritterband D, Shah M, Kresloff M, et al. *Gemella hemolysans* keratitis and consecutive endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 2002;133:268-269.
816. Robertson ID, Blackmore DK. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* 1989;124:391-394.
817. Rocha CL, Fischetti VA. Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infect Immun* 1999;67:2720-2728.
818. Rodrigues U, Collins MD. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 1990;71:231-234.
819. Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, Hamill RJ, et al. Unusual manifestations of pneumococcal infection in human immunodeficiency virus-infected individuals: the past revisited. *Clin Infect Dis* 1992;14:192-199.
820. Roggenkamp A, Abele-Horn M, Trebesius K-H, et al. *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol* 1998;36:100-104.
821. Roggenkamp A, Leitritz L, Baus K, et al. PCR for detection and identification of *Abiotrophia* spp. *J Clin Microbiol* 1998;36:2844-2846.
822. Rosenberg A. Pneumococcus virulence factor sialidase: a new direction in neuro-AIDS research? *J Neuroimmunol* 2004;147:33-34.
823. Rosenthal O, Woywodt A, Kirschner P, Haller H. Vertebral osteomyelitis and endocarditis of a pacemaker lead due to *Granulicatella (Abiotrophia) adiacens*. *Infection* 2002;30:317-319.
824. Ross PW, Cumming CG. Group B streptococci in women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect* 1982;4:161-166.
825. Ross SS, Saltzman CL, Carling P, Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: review of 100 cases. *Clin Infect Dis* 2003;36:319-327.
826. Roy S, Kaplan EL, Rodriguez B, et al. A family cluster of five cases of group A streptococcal pneumonia. *Pediatrics* 2003;112:e61-e65.
827. Rubens CE, Wessels MR, Heggen LM, Kasper DL. Transposon mutagenesis of type III group B streptococcus: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7208-7212.
828. Rubins J, Charboneau D, Fasching C, et al. Distinct role for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Crit Care Med* 1996;153:1339-1346.
829. Rudney JD, Larson CJ. Species identification of oral viridans streptococci by restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1993;31:2467-2473.
830. Rudney JD, Larson CJ. Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:437-443.
831. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, et al. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1993;31:2661-2666.
832. Ruess M, Sander A, Hentschel R, Berner R. *Enterococcus casseliflavus* septicaemia in a preterm neonate. *Scand J Infect Dis* 2002;34:471-472.
833. Ruoff KL, de la Maza L, Murtaugh MJ, et al. Species identities of enterococci from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:435-437.
834. Ruoff KL, Ferraro MJ. Hydrolytic enzymes of "*Streptococcus milleri*." *J Clin Microbiol* 1987;25:1645-1647.
835. Rurangirwa FR, Teitzel CA, Cui J, et al. *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:759-765.
836. Sachse S, Seidel P, Gerlach D, et al. Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: genomic localization of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (*speGdys*) FEMS Immunol Med Microbiol 2002;34:159-167.
837. Sahn DF, Boonlayangoor S, Schulz JE. Detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci other than *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2595-2598.
838. Sahn DF, Free L, Smith C, et al. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1997;35:2026-2030.
839. Salama M, Sandine W, Giovannoni S. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:1313-1318.
840. Salata RA, Lerner PI, Shlaes DM, et al. Infections due to Lancefield group C streptococci. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:225-239.
841. Samra Z, Shmueli H, Nahum E, et al. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:237-240.
842. Sandoe JAT, Witherden IR, Settle C. Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1678-1679.
843. Sarker TK, Murarka RS, Gilardi GL. Primary *Streptococcus viridans* pneumonia. *Chest* 1989;96:831-834.
844. Sarma PS, Mohanty S. *Pediococcus acidilactici* pneumonia and bacteremia in a pregnant woman. *J Clin Microbiol* 1998;36:2392-2393.
845. Sato S, Kanamoto T, Inoue M. *Abiotrophia elegans* strains comprise 8% of the nutritionally variant streptococci isolated from the human mouth. *J Clin Microbiol* 1999;37:2553-2556.
846. Sato T, Hu JP, Ohki K, et al. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:323-326.
847. Satomi M, Kimura B, Mizoi T, et al. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:832-836.
848. Saunders NA, Hallas G, Gaworzewska ET, et al. PCR-enzyme linked immunosorbent assay and sequencing as an alternative to serology for M-antigen typing of *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2689-2691.
849. Scano F, Rossi L, Cattelan A, et al. *Leuconostoc* species: a case-cluster hospital infection. *Scand J Infect Dis* 1999;31:371-373.
850. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes IP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. *Am J Med* 1991;91(Suppl 3B):72S-75S.
851. Schattner A, Vosti KL. Bacterial arthritis due to β -hemolytic streptococci of serogroups A, B, C, F, and G. Analysis of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:122-139.
852. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, et al. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov., and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:631-645.
853. Schlegel L, Grimont F, Collins MD, et al. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov., and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1425-1434.
854. Schlegel L, Grimont F, Grimont PA, Bouvet A. New group D streptococcal species. *Ind J Med Res* 2004;119(Suppl):252-256.
855. Schlegel L, Merlet C, Laroche JM, et al. Iatrogenic meningitis due to *Abiotrophia defectiva* after myelography. *Clin Infect Dis* 1999;28:155-156.
856. Schleifer KH, Ehrmann M, Krusch U, et al. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex. Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Syst Appl Microbiol* 1991;14:386-388.
857. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:31-34.
858. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol* 1987;10:1-9.
859. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 1985;6:183-195.
860. Schlievert PM, Gocke JA, Deringer JR. Group B streptococcal toxic shock-like syndrome: report of a case and purification of an associated pyrogenic toxin. *Clin Infect Dis* 1993;17:26-31.
861. Schmidtke LM, Carson J. Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *J Appl Bacteriol* 1994;77:229-236.
862. Schneerson JM, Chattopadhyay B, Murphy MFG, et al. Permanent perceptive deafness due to *Streptococcus suis* type II infection. *J Laryngol Otol* 1980;94:425-427.
863. Schrag S, Zywicki S, Farley MM, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.
864. Schragger HM, Alberti S, Cywes C, et al. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* 1998;101:1708-1716.
865. Schuchat A. Neonatal group B streptococcal disease-screening and prevention. *N Engl J Med* 2000;343:209-210.
866. Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S, et al. Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Infect Dis* 1990;162:672-677.
867. Schutz CE, Kaplan SL, Jacob RF. Resistant pneumococcus: a worldwide problem. *Infection* 1994;22:233-237.

868. Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, et al. Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16: 871-875.
869. Schuur PM, Sabbe L, van der Wouw AJ, et al. Three cases of serious infection caused by *Aerococcus urinae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:368-371.
870. Schwab JH, Cromartie WJ. Immunological studies on a C polysaccharide complex of group A streptococci having a direct toxic effect on connective tissue. *J Exp Med* 1960;111:295-307.
871. Schwabe LD, Small MT, Randall EL. Comparison of TestPack Strep A test kit and culture technique for detection of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1987;25: 309-311.
872. Schwartz B, Elliott IA, Buter JC, et al. Clusters of invasive group A streptococcal infections in family, hospital, and nursing home settings. *Clin Infect Dis* 1992;15:277-284.
873. Scully BE, Spriggs D, Neu HC. *Streptococcus agalactiae* (group B) endocarditis: a description of twelve cases and review of the literature. *Infection* 1987;1:169-176.
874. Seal DV. Necrotizing fasciitis. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:127-132.
875. Segers RP, Kenter L, De Haan A, Jacobs AA. Characterisation of the gene encoding sulislysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:255-261.
876. Sekiya K, Datoh R, Danbara H, Futaesaku Y. A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J Bacteriol* 1993;175:5953-5961.
877. Seppala H, He Q, Osterblad M, et al. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1945-1948.
878. Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *N Engl J Med* 1997;337:441-446.
879. Seppala H, Nissinen A, Jarvinen H, et al. Resistance to erythromycin in group A streptococci. *N Engl J Med* 1992;326:292-297.
880. Shankar V, Baghdayan A, Huycke M, et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *espA* gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999;67:193-200.
881. Shaw BG, Harding CD. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov., from chill-stored meats. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:217-223.
882. Shea KW, Schoch PE, Klein NC, et al. Liver abscess due to pyridoxal-dependent *Streptococcus mitis*. *Clin Infect Dis* 1995;21:238-289.
883. Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, et al. Autolysin targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Med Microbiol* 2004;53:189-195.
884. Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Shealey L, et al. DNA relatedness, phenotypic characteristics, and antimicrobial susceptibilities of *Globicatella sanguinis* strains. *J Clin Microbiol* 2001;39:4052-4057.
885. Shimizu T, Harada M, Zempo N, et al. Nonclostridial gas gangrene due to *Streptococcus anginosus* in a diabetic patient. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:347-349.
886. Shinelid HR, Black S, Ray P, et al. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM 197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:757-763.
887. Shinzato T, Saito A. A mechanism of pathogenicity of "*Streptococcus milleri* group" in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *J Med Microbiol* 1994; 40:118-123.
888. Shinzato T, Saito A. The *Streptococcus milleri* group as a cause of pulmonary infections. *Clin Infect Dis* 1995;21(Suppl 3):S238-S243.
889. Shulman ST. Complications of streptococcal pharyngitis. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:S70-S74.
890. Shulman ST. Acute streptococcal pharyngitis in pediatric medicine: current issues in diagnosis and treatment. *Paediatr Drugs* 2003;5(Suppl 1):13-23.
891. Shutt CK, Samore M, Carroll KC. Comparison of the Denka Seiken slide agglutination method to the quelling test for serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:1274-1276.
892. Sieffkin AD, Peterson DL, Hansen B. *Streptococcus equisimilis* pneumonia in a compromised host. *J Clin Microbiol* 1983;17:306-308.
893. Siegel M, Timpone J. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: a case report and review. *Clin Infect Dis* 2001;15:972-974.
894. Siegman-Igra Y, Schwartz D. *Streptococcus bovis* revisited: a clinical review of 81 bacteremic episodes paying special attention to emerging antibiotic resistance. *Scand J Infect Dis* 2003;35:90-93.
895. Sing A, Trebesius K, Heesemann J. Diagnosis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (group C streptococci) associated with deep soft tissue infection using fluorescent *in situ* hybridization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20: 146-149.
896. Sire JM, Donnio PY, Mesnard R, et al. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pedococcus acidilactici*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:623-625.
897. Sirotak AP, Eppes SC, Klein JD. Tuboovarian abscess and peritonitis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in young girls. *Clin Infect Dis* 1996;22:993-996.
898. Skaar I, Gaustad P, Tonjum T, et al. *Streptococcus phocae* sp. nov., a new specie isolated from clinical specimens from seals. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:646-650.
899. Skov R, Christensen JJ, Korner B, et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Aerococcus urinae* to 14 antibiotics, and time-kill curves for penicillin, gentamicin, and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:653-658.
900. Skov RL, Klarlund M, Thorsen S. Fatal endocarditis due to *Aerococcus urinae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:219-221.
901. Sledge D, Austin E, Sobczyk W, et al. Group B streptococcal endocarditis involving the tricuspid valve in a 7-month-old infant. *Clin Infect Dis* 1994;19:166-168.
902. Sly LI, Cahill MM, Osawa R, Fujisawa T. The tannin-degrading species *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus caprinus* are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:893-894.
903. Smith AM, Klugman KP. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1995;39:859-867.
904. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG. Genetic diversity of penicillin binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1938-1944.
905. Smith HE, Damman M, van der Velde J, et al. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 1999;67:1750-1756.
906. Smith HE, DeVries R, van't Slot R, Smits MA. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant of the synthesis of sialic acid. *Microb Pathog* 2000;29:127-134.
907. Smith HE, Veenbergen V, van der Velde J, et al. The *cps* genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:3146-3152.
908. Smith MD, Derrington P, Evans R, et al. Rapid diagnosis of bacteremia pneumococcal infections in adults by using the Binas NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 2003;41:2810-2813.
909. Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC, et al. Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infect Immun* 2002;70:7095-7104.
910. Snow V, Mottur-Pilson C, Cooper RJ, et al. Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults. *Ann Intern Med* 2001;134:506-508.
911. Sobrinho J, Bosch X, Wennberg P, et al. Septic arthritis secondary to group C streptococcus typed as *Streptococcus equisimilis*. *J Rheumatol* 1991;18:485-486.
912. Sommer R, Rohner P, Garbino J, et al. Group A β -hemolytic streptococcus meningitis: clinical and microbiological features of nine cases. *Clin Infect Dis* 1999;29:929-931.
913. Song JY, Lin LL, Schott S, et al. Evaluation of the Strep B OIA test compared to standard culture methods for detection of group B streptococci. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7:202-205.
914. Spataro V, Marone C. Rhabdomyolysis associated with bacteremia due to *Streptococcus pneumoniae*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:1063-1064.
915. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infection. *Microb Infect* 2000;2:1733-1742.
916. Sriskandan S, McKee A, Hall L, Cohen J. Comparative effects of clindamycin and ampicillin on superantigenic activity of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:275-277.
917. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* 1997;21:381-407.
918. Staats JJ, Plattner BL, Stewart CC, Changappa MM. Presence of the *Streptococcus suis* sulislysin gene and expression of MRP and RF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Vet Microbiol* 1999;70:201-211.
919. Stefonck KR, Maerz LL, Nielsen MP, et al. Group A streptococcal puerperal sepsis preceded by positive surveillance cultures. *Obstet Gynecol* 2001;98:840-848.
920. Steiner JL, Septimus EJ, Vartian CV. Infection of the psoas muscle secondary to *Streptococcus pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 1992;15:1047-1048.
921. Steiner M, Villablanca J, Kersey J, et al. Viridans streptococcal shock in bone marrow transplantation patients. *Am J Hematol* 1993;42:354-358.
922. Steinfield S, Galle C, Struelens M, et al. Pyogenic arthritis caused by *Streptococcus equisimilis* (group C streptococcus) in a patient with AIDS. *Clin Rheumatol* 1997;16:314-316.
923. Stepanovic S, Jovanovic M, Lavadinovic L, et al. *Enterococcus durans* endocarditis in a patient with transposition of the great vessels. *J Med Microbiol* 2004;53: 259-261.
924. Stevens DL. Invasive group A streptococcus infections. *Clin Infect Dis* 1992;14:2-13.
925. Stevens DL. Invasive group A streptococcal infections: the past, present, and future. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:561-566.
926. Stevens DL. Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Ann Rev Med* 2000;51:271-288.
927. Stevens DL. Streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:133-136.
928. Stevens DL, Tanner MH, Winship J, et al. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N Engl J Med* 1989;321:1-7.
929. Stevenson KB, Murray EW, Sarubbi FA. Enterococcal meningitis: report of four cases and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:233-239.
930. Stocker E, Cortes E, Pema K, et al. *Streptococcus milleri* as a cause of antecubital abscess and bacteremia in intravenous drug abusers. *South Med J* 1994;87:95-96.
931. Stollerman GH. Rheumatogenic streptococci and autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:131-142.
932. Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis* 2001;33:806-814.
933. Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cell synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 1988;81:1419-1426.

934. Stryt B. Infection associated with asplenia: risks, mechanism, and prevention. *Am J Med* 1990;88(5N):33N-42N.
935. Su T-M, Lin Y-C, Lu C-H, et al. Streptococcal brain abscess: analysis of clinical features in 20 patients. *Surg Neurol* 2001;56:189-194.
936. Subramanian KN, Lam KS. Malignant necrotizing streptococcal myositis: a rare and fatal condition. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:277-278.
937. Sutton GP, Smirz LR, Clark DH, et al. Group B streptococcal necrotizing fasciitis arising from an episiotomy. *Obstet Gynecol* 1985;66:733-736.
938. Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, et al. *Enterococcus haemophysalis* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1567-1674.
939. Swanson H, Cutts E, Lepow M. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia in a child receiving prophylaxis for sickle-cell disease. *Clin Infect Dis* 1996;22:387-388.
940. Swartztrauber K, Cohen I. Nonhemolytic group B streptococcal osteomyelitis: identification and treatment in a five-week-old infant. *J La State Med Soc* 1991;143:29-32.
941. Swenson JM, Facklam RR, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:543-549.
942. Syrogiannopoulos GA, McCracken GH Jr, Nelson JD. Osteoarticular infections in children with sickle cell disease. *Pediatrics* 1986;78:1090-1096.
943. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 2004;233:83-89.
944. Tankovic J, Leclercq R, Duval J. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:789-792.
945. Tapsall JW. Pigment production by Lancefield group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J Med Microbiol* 1986;21:75-81.
946. Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, et al. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol* 1994;32:578-580.
947. Tarradas C, Luque I, DeAndres D, et al. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Med B* 2001;48:347-355.
948. Taylor PW, Trueblood MC. Septic arthritis due to *Aerococcus viridans*. *J Rheumatol* 1985;12:1004-1005.
949. Teixeira LM, Carvalho MGS, Espinola MMB, et al. *Enterococcus porcinus* p. nov., and *Enterococcus ratti* sp. nov. associated with enteric disorders in animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1737-1743.
950. Teixeira LM, Carvalho MGS, Merquior VLC, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human source. *J Clin Microbiol* 1997;35:2778-2781.
951. Teixeira LM, Carvalho MGS, Merquior VLC, et al. Recent approaches on the taxonomy of the enterococci and some related microorganisms. *Adv Exp Med* 1997;418:397-400.
952. Teixeira LM, Merquior VLC, Vianni MCE, et al. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffaloes with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:664-668.
953. Templin KS, Crook T, Riley T, et al. Spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia due to *Leuconostoc* species in a patient with end-stage renal disease: a case report. *Infect* 2001;43:155-157.
954. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, et al. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:557-563.
955. Thompson T, Facklam R. Cross reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1885-1886.
956. Thornsberry C, Swenson JM, Baker CN, et al. Methods for determining susceptibility of fastidious and unusual pathogens to selected antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;9:139-153.
957. Timoney JF. Strangles. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1993;9:365-74.
958. Tong H, Gao X, Dong X. *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1101-1104.
959. Towers CV, Garite TJ, Friedman WW, et al. Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test and the Gram stain for detection of group B *Streptococcus* in high-risk antepartum patients. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:965-967.
960. Tracy M, Wanhata A, Shuhatovich Y, et al. Antibiotic susceptibility of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1511-1514.
961. Traub WH, Leonard B. Comparative susceptibility of clinical group A, B, C, F, and G β -hemolytic streptococcal isolates to 24 antimicrobial agents. *Chemotherapy* 1997;43:10-20.
962. Tresadern JC, Farrand RJ, Irving MH. *Streptococcus milleri* and surgical sepsis. *Annu Rev Coll Surg (Engl)* 1983;65:78-79.
963. Tritz DM, Iwen PC, Woods GL. Evaluation of MicroScan for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1990;28:1477-1478.
964. Trotman J, Hughes B, Mollison L. Invasive pneumococcal disease in central Australia. *Clin Invest Dis* 1994;20:1553-1556.
965. Trotter S, Higgins R, Brochu G, et al. A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev Infect Dis* 1991;13:1251-1252.
966. Truant AL, Satishchandran V. Comparison of Streptex versus PathoDx for group D typing of vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16:89-91.
967. Truong TL, Menard C, Mouton C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol* 2000;49:63-71.
968. Truper HG, de Clari L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition." *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:908-909.
969. Tsai MS, Huang TC, Liu IW. Lemire's syndrome caused by viridans streptococci: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 1999;32:126-128.
970. Tsakalidou E, Zoidou E, Pot B, et al. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:519-527.
971. Tsutsui O, Kokeyuchi S, Matsumura T, et al. Relationship of the chemical structure and immunobiological activities of lipoteichoic acid from *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus hirae*) ATCC 9790. *FEMS Microbiol Immunol* 1991;3:211-218.
972. Tung KSK, Woodroffe AJ, Ahlin TD, et al. Application of the solid phase C1q and Raji cell radioimmune assays for the detection of circulating immune complexes in glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1978;62:61-72.
973. Tunkel AR, Scheld MW. Acute bacterial meningitis. *Lancet* 1995;346:1675-1680.
974. Tunkel AR, Sepkowitz KA. Infections caused by viridans streptococci in patients with neutropenia. *Clin Infect Dis* 2002;34:1524-1529.
975. Tuohy MJ, Procop GW, Washington JA. Antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:189-191.
976. Tupperainen N, Hallman M. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: intrapartum detection and chemoprophylaxis of heavily colonized parturients. *Obstet Gynecol* 1989;73:583-587.
977. Turner JC, Fox A, Fox K, et al. Role of group C β -hemolytic streptococci in pharyngitis: epidemiologic study of clinical features associated with isolation of group C streptococci. *J Clin Microbiol* 1993;31:808-811.
978. Turner JC, Hayden GF, Kiselica D, et al. Association of group C β -hemolytic streptococci with endemic pharyngitis among college students. *JAMA* 1990;264:2644-2647.
979. Tyrrell GJ, Turnbull L, Teixeira LM, et al. *Enterococcus gilvus* and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:1140-1145.
980. Udayaraj UP, Gendi NS, Osman EM. Septic discitis as a complication of infective endocarditis caused by *Streptococcus orali*. *Rheumatol* 2003;30:62-63.
981. Uhl JR, Adamson SC, Vetter EA, et al. Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs. *J Clin Microbiol* 2003;41:242-249.
982. Unnikrishnan M, Altmann DM, Proft T, et al. The bacterial superantigen streptococcal mitogenic exotoxin Z is the major immunoreactive agent of *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 2002;169:2561-2569.
983. Vacca-Smith AM, Jones CA, Levine MJ, et al. Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1994;62:2187-2194.
984. Vagiakou-Voudris E, Mylona-Petropoulou D, Kalogeropoulou E, et al. Multiple liver abscesses associated with bacteremia due to *Leuconostoc lactis*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:766-767.
985. Vancanneyt M, Devriese LA, DeGraef EM, et al. *Streptococcus minor* sp. nov. from faecal samples and tonsils of domestic animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;54:449-452.
986. Vancanneyt M, Snauwaert C, Cleenwerck I, et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:393-400.
987. Vance DW Jr. Group C streptococci: "*Streptococcus equisimilis*" or *Streptococcus anginosus*. *Clin Infect Dis* 1992;14:616.
988. Van Dam JEG, Fleer A, Snippe H. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek* 1990;58:1-47.
989. Vandamme P, Devriese LA, Haesebrouck F, Kersters K. *Streptococcus intestinalis* Robinson et al 1988 and *Streptococcus alactolyticus* Farrow et al 1984 are phenotypically indistinguishable. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:737-741.
990. Vandamme P, Devriese LA, Pot B, et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B type 1b streptococcus. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:81-85.
991. Vandamme P, Hommez J, Snauwaert C, et al. *Globicatella sulfidifaciens* sp. nov., isolated from purulent infections in domestic animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1745-1749.
992. Vandamme P, Pot B, Falsen E, et al. Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:774-781.
993. Vandamme P, Torck U, Falsen E, et al. Whole-cell protein electrophoretic analysis of viridans streptococci: evidence for heterogeneity among *Streptococcus mitis* biovars. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:117-125.
994. Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Group A streptococcal meningitis in adults: report of 41 cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2004;34:e32-e36.
995. Van der Mei, Naumann D, Busscher HJ. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Arch Oral Biol* 1993;38:1013-1019.
996. Van de Tijn I, Fillit H, Brandeis WE, et al. Serial studies on circulating immune complexes in post-streptococcal sequelae. *Clin Exp Immunol* 1978;34:318-325.
997. Van Dijk M, van Toyen BJ, Wuisman PJ, et al. Trochanter osteomyelitis and ipsilateral arthritis due to *Gemella morbillorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:600-602.

998. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, et al. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:49-60.
999. Van Goethem GF, Louwagie BM, Simoons MJ, et al. *Enterococcus casseliflavus* septicemia in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:519-520.
1000. Van Haeften R, Palladino S, Kay I, et al. A quantitative Light Cycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:407-414.
1001. Vartian C, Lerner PI, Shlaes DM, et al. Infections due to Lancefield group G streptococci. *Medicine (Baltimore)* 1985;64:75-88.
1002. Vartian CV, Septimus EJ. Meningitis caused by group B *Streptococcus* in association with cerebrospinal rhinorrhea. *Clin Infect Dis* 1992;14:1261-1262.
1003. Vasishttha S, Isenberg HD, Sood SK. *Gemella morbillorum* as a cause of septic shock. *Clin Infect Dis* 1996;22:1084-1086.
1004. Veasy LG, Wiedmeier SE, Orsmond GS. Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. *N Engl J Med* 1987;316:421-427.
1005. Vela AI, Fernandez E, Lawson PA, et al. *Streptococcus entericus* sp. nov., isolated from canine intestines. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:665-669.
1006. Vela AI, Goyache J, Tarradas C, et al. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2498-2502.
1007. Verghese A, Berk SL, Boelen LJ, et al. Group B streptococcal pneumonia in the elderly. *Arch Intern Med* 1982;142:1642-1645.
1008. Veziris N, Fuhrman C, Chouaid C, et al. Empyema of the thorax due to *Gemella haemolysans*. *J Infect* 1999;39:245-246.
1009. Vickerman AM, Clewell DB, Jones GW. Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of *Streptococcus gordonii* on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 1991;59:3523-3530.
1010. Vieira VV, Castro ACD. Biochemical properties and whole cell protein profiles of group G streptococci isolated from dogs. *J Appl Bacteriol* 1994;77:408-411.
1011. Vieira VV, Teixeira LM, Zahner V, et al. Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1231-1243.
1012. Vilaichone RK, Mahachai V, Kullavanijaya P, Nunthapisud P. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus bovis*: case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1476-1479.
1013. Vilaichone RK, Mahachai V, Nunthapisud P. *Streptococcus suis* peritonitis: case report. *J Med Assoc Thai* 2000;83:1274-1277.
1014. Vince KG, Kantor SR, Descalzi J. Late infection of a total knee arthroplasty with *Streptococcus bovis* in association with carcinoma of the large intestine. *J Arthroplasty* 2003;18:813-815.
1015. Virolainen A, Salo P, Jero J, et al. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 1994;32:2667-2670.
1016. Von Baum H, Klemme FR, Geiss HK, Sonntag H-G. Comparative evaluation of a commercial system for identification of Gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:849-852.
1017. Von Essen R, Ikavalko M, Forsblom B. Isolation of *Gemella morbillorum* from joint fluid. *Lancet* 1993;342:177-178.
1018. Von Hunolstein C, D'Ascenzi S, Wagner B, et al. Immunochromatography of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). *Infect Immun* 1993;61:1272-1280.
1019. Von Hunolstein C, Parisi L, Tissi L, et al. Virulence properties of the type VII *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide. *J Med Microbiol* 1999;48:983-990.
1020. Votava J, Tejkalova M, Drabkova M, et al. Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:120-122.
1021. Waisberg J, Matheus CO, Pimenta J. Infectious endocarditis from *Streptococcus bovis* associated with colonic carcinoma: case report and literature review. *Arq Gastroenterol* 2002;39:177-180.
1022. Wald ER, Bergman I, Taylor HC, et al. Long-term outcome of group B streptococcal meningitis. *Pediatrics* 1986;77:217-221.
1023. Wald ER, Dashefsky B, Feidt C, et al. Acute rheumatic fever in western Pennsylvania and the tri-state area. *Pediatrics* 1987;80:371-374.
1024. Wallbanks S, Martinez-Murcia AJ, Fryer JL, et al. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum*. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:224-230.
1025. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM, et al. Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and *Streptococcus milleri* group bacteria. *J Infect Dis* 2002;185:85-90.
1026. Watanabe Y, Todome Y, Ohkuni H, et al. Cysteine protease activity and histamine release from the human mast cell line HMC-1 stimulated by recombinant streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal cysteine protease. *Infect Immun* 2002;70:3944-3947.
1027. Watanakunorn C, Pantelakis J. α -Hemolytic streptococcal bacteremia: a review of 203 episodes during 1980-1991. *Scand J Infect Dis* 1993;25:403-408.
1028. Watanakunorn C, Patel R. Comparison of patients with enterococcal bacteremia due to strains with and without high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1993;17:74-78.
1029. Watkins EJ, Brooksby P, Schweiger MS, Enright SM. Septicemia in a pig farm worker. *Lancet* 2001;357:1147-1148.
1030. Watkins LM, Pasternack MS, Banks M, et al. Bilateral cavernous sinus thromboses and intraorbital abscesses secondary to *Streptococcus milleri*. *Ophthalmology* 2003;110:569-574.
1031. Watkins R, Vyas H. Toxic shock syndrome and streptococcal myositis: three case reports. *Eur J Pediatr* 2002;161:497-498.
1032. Watsky KL, Kollisch N, Densen P. Group G streptococcal bacteremia: the clinical experience at Boston University Medical Center and a critical review of the literature. *Arch Intern Med* 1985;145:58-61.
1033. Weeks CR, Ferretti JJ. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. *Infect Immun* 1986;52:144.
1034. Weinstein MR, Litt M, Kertesz DA, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N Engl J Med* 1997;337:589-594.
1035. Weiss K, DeAzavedo J, Restieri C, et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A *Streptococcus* strains in the province of Quebec, Canada. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:345-348.
1036. Welch DF, Hensel D, Pickett D, et al. Comparative evaluation of selective and non-selective culture techniques for isolation of group A β -hemolytic streptococci. *Am J Clin Pathol* 1991;95:587-590.
1037. Wenocur HS, Smith MA, Vellozi EM, et al. Odontogenic infection secondary to *Leuconostoc* species. *J Clin Microbiol* 1988;26:1893-1894.
1038. Wessels MR. Capsular polysaccharide of group A *Streptococcus*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ et al., eds. *Gram-Positive Pathogens*. Washington, DC: ASM Press, 2000:34-42.
1039. Wessels MR, DiFabio JL, Benedi V-J, et al. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem* 1991;266:6714-6719.
1040. Wessels MR, Haft R, Heggen LM, et al. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci. *Infect Immun* 1992;60:392-400.
1041. Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, DiCesare TJ. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8317-8321.
1042. Wessels MR, Rubens CE, Benedi VJ, Kasper DL. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8983-8987.
1043. Westh H, Skibsted L, Korner B. *Streptococcus pneumoniae* infections of the female genital tract and the newborn child. *Rev Infect Dis* 1990;12:416-422.
1044. Westlake RM, Graham TP, Edwards KM. An outbreak of acute rheumatic fever in Tennessee. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:97-100.
1045. Wheeler MC, Roe MH, Kaplan EL, et al. Outbreak of group A streptococcal septicemia in children: clinical, epidemiologic, and microbiological correlates. *JAMA* 1991;266:533-537.
1046. Whitley RA, Beighton D. Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus anginosus* as distinct species. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:1-5.
1047. Whitley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:195-216.
1048. Whitley RA, Beighton D, Winstanley TG, et al. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol* 1992;30:243-244.
1049. Whitley RA, Fraser HY, Douglas CWI, et al. *Streptococcus parasanguis* sp. nov., an atypical viridans streptococcus from human clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett* 1990;68:115-122.
1050. Whitley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri*" group. *J Clin Microbiol* 1990;28:1497-1501.
1051. Whitley RA, Hall LMC, Hardie JM, Brighton D. A study of small-colony, β -hemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group-description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov., associated with the human throat and pharyngitis. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1443-1449.
1052. Whitley RA, Hardie JM. *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:335-339.
1053. Whitley RA, Hardie JM. DNA-DNA hybridization studies and phenotypic characteristics of strains within the "*Streptococcus milleri* group." *J Gen Microbiol* 1989;133:2623-2633.
1054. White BA, Labhsetwar SA, Mian AN. *Streptococcus bovis* bacteremia and fetal death. *Obstet Gynecol* 2002;100:1126-1129.
1055. Whitney AM, O'Connor SP. Phylogenetic relationship of *Gemella morbillorum* to *Gemella haemolysans*. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:832-838.
1056. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000;343:1917-1924.
1057. Willcox MDP. Potential pathogenic properties of members of the "*Streptococcus milleri*" group in relation to the production of endocarditis and abscesses. *J Med Microbiol* 1995;43:405-410.
1058. Willcox MDP, Zhu H, Knox KW. *Streptococcus australis* sp. nov., a novel oral streptococcus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1277-1281.
1059. Williams AM, Collins MD. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. *J Appl Bacteriol* 1990;68:485-490.
1060. Williams AM, Farrow JAE, Collins MD. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:185-189.

1061. Williams AM, Rodrigues UM, Collins MD. Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small subunit rRNA. *Res Microbiol* 1990;142:67-74.
1062. Williams GS. Group C and group G streptococci infections: emerging challenges. *Clin Lab Sci* 2003;16:209-213.
1063. Williams-Bouyer N, Reisner BS, Woods GL. Comparison of Gen-Probe AccuProbe Group B streptococcus culture identification test with conventional culture for the detection of group B streptococci in broth cultures of vaginal-anorectal specimens from pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:159-162.
1064. Wilson WR, Thompson RL, Wilkowske CJ, et al. Short-term therapy for streptococcal infective endocarditis. *JAMA* 1981;245:360-363.
1065. Winterbotham A, Riley S, Kavanaugh-McHugh A, Dermody TS. Endocarditis caused by group A β -hemolytic streptococci in an infant: case report and review. *Clin Infect Dis* 1999;29:196-198.
1066. Wiseman A, Rene P, Crelinsten GL. *Streptococcus agalactiae* endocarditis: an association with villous adenomas of the large intestine. *Ann Intern Med* 1985;103:893-894.
1067. Wong SS, Woo PC, Ho PL, Wang TK. Continuous ambulatory peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Streptococcus bovis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:424-426.
1068. Wong WY, Overturf GD, Powars DR. Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis* 1992;14:1124-1136.
1069. Woo PCY, Fung AMY, Lau SKP, et al. Group G β -hemolytic streptococcal bacteremia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2001;39:3147-3155.
1070. Woo PCY, Tam DM, Lau SK, et al. *Enterococcus cecorum* empyema thoracis successfully treated with cefotaxime. *J Clin Microbiol* 2004;42:919-922.
1071. Woo PCY, Tam DMW, Leung K-W, et al. *Streptococcus sinensis* sp. nov., a novel species isolated from a patient with infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 2002;40:805-810.
1072. Woo PCY, To AP, Tse H, et al. Clinical and molecular epidemiology of erythromycin-resistant β -hemolytic lancefield group C streptococci causing bacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5188-5191.
1073. Woo PCY, Tse H, Chan K, et al. "*Streptococcus milleri*" endocarditis caused by *Streptococcus anginosus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:81-88.
1074. Wood EG, Dillon HC. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:515-520.
1075. Wood HF, Jacobs K, McCarty M. *Streptococcus lactis* isolated from a patient with subacute bacterial endocarditis. *Am J Med* 1985;18:345-347.
1076. Wood TF, Potter MA, Jonasson O. Streptococcal toxic shock-like syndrome: the importance of surgical intervention. *Ann Surg* 1993;217:109-114.
1077. Woodford N. Epidemiology of genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb Drug Resist* 2001;7:229-236.
1078. Woodford N, Morrison D, Johnson AP, et al. Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993;31:653-658.
1079. Woods CR, Edwards MS. Renal abscess caused by group B *Streptococcus*. *Clin Infect Dis* 1994;18:662-663.
1080. Wu HY, Nahm MH, Guo Y, et al. Intranasal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A) can prevent carriage and infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997;175:834-846.
1081. Yagupsky P, Menegus MA, Powell KR. The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:801-808.
1082. Yamamoto M, Fukushima T, Ohshiro S, et al. Brain abscess caused by *Streptococcus intermedius*: two case reports. *Surg Neurol* 1999;51:219-222.
1083. Yamashita Y, Bowen WE, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen free rat model. *Infect Immun* 1997;61:3811-3817.
1084. Yancey MK, Arner T, Clark P, Duff P. Assessment of rapid identification tests for genital carriage of group B streptococci. *Obstet Gynecol* 1992;80:1038-1047.
1085. Yaniv LG, Potasman I. Iatrogenic meningitis: an increasing role for resistant viridian streptococci? Case Report and review of the last 20 years. *Scand J Infect Dis* 2000;32:693-696.
1086. Yen CC, Tang RB, Cher SJ, Chin TW. Pediatric lung abscess: a retrospective review of 23 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37:45-49.
1087. Yu PKW, Germer JJ, Torgerson CA, Anhalt JP. Evaluation of TestPack Strep A for the detection of group A streptococci in throat swabs. *Mayo Clin Proc* 1988;63:33-36.
1088. Yuen KY, Sato WH, Choi CH, et al. *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) septicemia in Hong Kong. *J Infect* 1990;21:241-250.
1089. Zachariadou L, Papaparaskevas J, Paraskakis I, et al. Predominance of two M-types among erythromycin-resistant group A streptococci from Greek children. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:310-314.
1090. Zaoutis T, Attia M, Gross R, Klein J. The role of group C and group G streptococci in acute pharyngitis in children. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:37-40.
1091. Zarkin BA, Lillemore KD, Cameron JL, et al. The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann Surg* 1990;211:786-791.
1092. Zbinden R, Satanam P, Hunziker L, et al. Endocarditis due to *Aerococcus urinae*: diagnostic tests, fatty acid composition, and killing kinetics. *Infection* 1999;27:122-124.
1093. Zhang GW, Kotiw M, Daggard G. A RAPD-PCR genotyping assay which correlates with serotypes of group B streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2002;35:247-250.
1094. Zhang Q, Kwok C, Attorri S, Clarridge JE III. *Aerococcus urinae* in urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:1703-1705.
1095. Zhu H, Willcox MDP, Knox KW. A new species of oral *Streptococcus* isolated from Sprague-Dawley rats. *Streptococcus orisratti* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:55-61.
1096. Zinner SH. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer with an emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Clin Infect Dis* 1999;29:490-494.

Bacilos grampositivos aerobios y facultativos

Especies de *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

Taxonomía del género *Listeria*
Factores de virulencia de *L. monocytogenes*
Epidemiología de *L. monocytogenes*
Importancia clínica de *L. monocytogenes*
Aislamiento de *L. monocytogenes* en muestras clínicas
Identificación de especies de *Listeria*
Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento de las infecciones por *Listeria*
Patogenicidad de otras especies de *Listeria*

Especies de *Erysipelothrix*: *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Erysipelothrix tonsiliarum*

Taxonomía del género *Erysipelothrix*
Factores de virulencia de *E. rhusiopathiae*
Importancia clínica de *E. rhusiopathiae*
Aislamiento e identificación de *E. rhusiopathiae*
Sensibilidad de *E. rhusiopathiae* a los antibióticos

Especies de *Bacillus* y géneros relacionados

Taxonomía y disección taxonómica del género *Bacillus*
Bacillus anthracis
Epidemiología del carbunco

Factores de virulencia de *B. anthracis*
Presentaciones clínicas del carbunco
Tratamiento del carbunco
Prevención del carbunco

Bacillus cereus

Factores de virulencia de *B. cereus*
Gastroenteritis por *B. cereus*

Infecciones oportunistas por especies de *Bacillus*

Bacteriemia y endocarditis
Infecciones en huéspedes inmunodeprimidos
Infecciones oculares
Infecciones musculoesqueléticas
Infecciones hospitalarias

Seguridad en el laboratorio, recolección de muestras y procesamiento

Aislamiento e identificación de especies de *Bacillus*: El "grupo *Bacillus cereus*" (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*)

Sensibilidad de las especies de *Bacillus* a los antibióticos

Especies de *Corynebacterium*

Introducción y taxonomía
Identificación de especies de *Corynebacterium* y bacterias corineformes
Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Corynebacterium* y bacterias corineformes

Miembros del género *Corynebacterium* aislados en seres humanos

*Corynebacterium amycolatum**Corynebacterium diphtheriae**Corynebacterium jeikeium**Corynebacterium pseudodiphtheriticum**Corynebacterium striatum**Corynebacterium urealyticum*Especies de *Corynebacterium* asociadas con animalesEspecies de *Corynebacterium* aisladas en los alimentos y el medioambiente

Otras bacterias corineformes

Especies de *Actinobaculum*Especies de *Actinomyces* aisladas en seres humanosEspecies de *Actinomyces* aisladas en animalesEspecies de *Arcanobacterium*Especies de *Arthrobacter*Especies de *Brevibacterium*Especies de *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium* y *Oerskovia*Especies de *Dermabacter*Especies de *Exiguobacterium*Especies de *Leifsonia*Especies de *Microbacterium* (*Aureobacterium*)Especies de *Rothia* y "similares a *Rothia*" (grupo 4 de los CDC)Especies de *Turiceila*

Gardnerella vaginalis

Taxonomía y morfología celular

Factores de virulencia de *G. vaginalis*Importancia clínica de *G. vaginalis*

Aislamiento e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Especies de *Lactobacillus*

Taxonomía y epidemiología

Importancia clínica

Aislamiento e identificación

Sensibilidad a los antibióticos

Los bacilos grampositivos aerobios/facultativos incluyen una amplia variedad de microorganismos que causan enfermedades "clásicas" como listeriosis, carbunco y difteria, y también de síndromes patológicos más nuevos, sobre todo en huéspedes inmunodeprimidos. También abarcan varios géneros recién reconocidos que son microorganismos ambientales o veterinarios no asociados antes con personas o infecciones humanas. El uso de técnicas moleculares para la caracterización de muchas especies nuevas ha requerido además una revisión de los patógenos clásicos. Por ejemplo, el reconocimiento de varias especies facultativas del género *Actinomyces* ha permitido reconocer la naturaleza facultativa de patógenos clásicos, como *A. israelii*, antes considerados microorganismos anaerobios estrictos. Estas técnicas nuevas han permitido la clasificación de bacterias sin nombre, como los grupos corineformes de los CDC (Centers for Disease Control and Prevention), en géneros nuevos o existentes, y han conducido a la disección taxonómica de los géneros conocidos para contener muchas especies no relacionadas (p. ej., el género *Bacillus*). El esquema de clasificación presentado en la próxima edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* refleja ahora relaciones genotípicas más que similitudes fenotípicas entre estos microorganismos. En el recuadro 14-1 se presenta la clasificación de los microorganismos que se explicarán en este capítulo.

Especies de *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

Taxonomía del género *Listeria*

El género *Listeria* consiste en bacterias con forma de bacilos regulares, grampositivas, no esporuladas, anaerobias facultati-

vas (véase lámina en color 14-1A). El género está definido por un contenido de DNA G + C del 36-38%, una pared celular típica de grampositivos con una capa de mureína de peptidoglucanos que contiene ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) fijada a la membrana celular por ácido lipoteicoico y ácidos teicoicos polirribitol asociados con la membrana.²⁷² Algunos estudios genéticos indican que los microorganismos *Listeria* muestran la relación filogenética más estrecha con el género *Brochothrix* (un microorganismo ambiental) y presentan una relación más distante con microorganismos del género *Bacillus*, géneros esporulados relacionados y el género *Lactobacillus*, más que con los microorganismos de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*.^{460,738} La relación entre las especies de *Listeria* y *Brochothrix* también es apoyada por datos quimiotaconómicos.¹⁷⁶ Aunque algunos taxonomistas han recomendado la inclusión de especies de *Listeria* en la familia *Lactobacillaceae*, Collins¹⁷⁶ y otros investigadores creen que las especies de *Listeria* merecen la inclusión en una nueva familia. En la próxima edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, las especies de *Listeria* y *Brochothrix* se incluyen en la familia propuesta "*Listeriaceae*" en el orden *Bacillales*, clase "*Bacilli*" en el filo *Firmicutes*.³²⁹ El género *Erysipelothrix* está incluido en el filo *Firmicutes* junto con especies de *Listeria*, pero se encuentra en una clase, un orden y una familia diferentes (recuadro 14-1). En el cuadro 14-1 se presentan las principales características que diferencian a *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* y *Brochothrix* entre sí.

Durante muchos años, el género *Listeria* consistió en ocho especies —*L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. denitrificans*.⁷⁸⁷ Sobre la base de la secuenciación de rRNA 16S de *L. denitrificans*, este microorganismo ha sido excluido del género *Listeria*

Recuadro 14-1 Clasificación de los bacilos grampositivos aerobios/facultativos en el dominio Bacterias³²⁹

Filo	Clase/subclase	Orden/suborden	Familia	Géneros
Firmicutes	Mollicutes "Bacilos"	Incertae sedis Bacillales	"Erysipelotrichaceae"	<i>Erysipelothrix</i>
			<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Amphibacillus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Gracilibacillus</i> , <i>Halobacillus</i> , <i>Salibacillus</i> , <i>Virgibacillus</i>
			"Listeriaceae"	<i>Listeria</i> , <i>Brochothrix</i>
			"Sporolactobacillaceae"	<i>Sporolactobacillus</i>
			"Paenibacillaceae"	<i>Paenibacillus</i> , <i>Aneurinibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Thermobacillus</i>
Actinobacterias	Actinobacterias/ Actinobacteridae	"Lactobacillales"	"Alicyclobacillaceae"	<i>Alicyclobacillus</i> , <i>Sulfobacillus</i>
			<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
			<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i> , <i>Actinobaculum</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Mobiluncus</i>
			<i>Actinomycetales</i> / <i>Actinomycineae</i>	<i>Rhotia</i>
			<i>Actinomycetales</i> / <i>Micrococcineae</i>	<i>Brevibacteriaceae</i> <i>Brevibacterium</i>
		Actinomycetales/ Micrococcineae	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Oerskovia</i>
			<i>Dermabacteriaceae</i>	<i>Dermabacter</i>
			<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Sanguibacter</i>
			<i>Jonesiaceae</i>	<i>Jonesia</i>
			<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i> (<i>Aureobacterium</i>), <i>Leifsonia</i>
			<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
		Actinomycetales/ Corynebacterineae		
		Bifidobacteriales	<i>Bifidogacteriaceae</i>	<i>Gardnerella</i>
			"Afiliación desconocida"	<i>Turicella</i>

y colocado en el género *Jonesia* como *Jonesia denitrificans*, que está ahora en su propia familia (*Jonesiaceae*) en el orden *Actinomycetales*, clase Actinobacteria, filo Actinobacteria (recuadro 14-1).^{329,703,740} Algunos datos de secuenciación adicionales sobre los otros miembros del género *Listeria* han identificado dos líneas de descendencia estrechamente relacionadas pero distintas: el "grupo *L. monocytogenes*" (que consiste en *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) y el "grupo *L. grayi*/*L. murrayi*". Desde entonces *L. grayi* y *L. murrayi* se han combinado en una especie única: *L. grayi*.⁷³⁹ Además, algunos estudios electroforéticos enzimáticos multilocus de cepas de *L. ivanovii* sugirieron que esta especie también podía ser dividida en dos grupos genómicos.⁹⁵ Con posterioridad, algunos estudios de homología de DNA mostraron que estos dos grupos representaban dos subespecies: *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londonien-*

sis.⁹⁴ Por lo tanto, el género *Listeria* incluye ahora seis especies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subespecie *ivanovii*, *L. ivanovii* subespecie *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. welshimeri*. *L. monocytogenes* puede ser dividida en 13 serotipos sobre la base de los antígenos somáticos (S) y flagelares (H). Entre los 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 7), la mayor parte de las enfermedades se debe a los tipos 4b, 1/2a y 1/2b.⁵⁵³

Factores de virulencia de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células de los mamíferos, incluidos los macrófagos y varias líneas celulares de cultivo tisular humano. Estos microorganismos tienen una proteína de superficie de 80 kDa denominada **internalina**.^{320,525,659} La

Cuadro 14-1 Características para la diferenciación de *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*

GÉNERO	RELACIÓN CON O ₂	CRECIMIENTO, 35 °C	CATA- LASA	PRODUC- CIÓN DE H ₂ S EN KIA/TSI	MOTI- LIDAD	ÁCIDO A PARTIR DE GLUCOSA	PEPTIDOGLUCANO DIAMINOÁCIDO	MOL% G + C
<i>Listeria</i>	Facultativa	+	+	-	+ ^a	+	meso-DAP	36-38
<i>Erysipelothrix</i>	Facultativa	+	-	+	-	+	L-lisina	36-40
<i>Lactobacillus</i>	Facultativa	+	-	-	- ^b	+	L-lisina, o meso-DAP o L-ornitina	34-53
<i>Brochothrix</i>	Facultativa	-	+	-	-	+	meso-DAP	35,6-36,1

^a Todas las cepas móviles a 20-25 °C. Poco móviles o inmóviles a 35-37 °C.

^b Mayoría de especies inmóviles, pero se han descrito algunas especies móviles.

KIA: agar hierro de Kligler; +: reacción positiva; -: reacción negativa.

internalina interactúa con un receptor de adhesión de la célula llamado **E-cadherina** sobre las células epiteliales humanas y conduce a la inducción de fagocitosis.⁶⁰² Las cadherinas son glucoproteínas transmembrana de 110 kDa que están estructuralmente relacionadas y son específicas de los tejidos. Algunos experimentos que utilizaron varias líneas celulares diferentes han establecido que la interacción internalina/E-cadherina promueve tanto la fijación específica como la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales.⁶⁰² La presencia de internalina sola es suficiente para la entrada del microorganismo en las células epiteliales si éstas tienen el receptor apropiado. Se describieron otras proteínas de superficie en la familia de las internalinas (p. ej., *inlB*, *inlC*) y parecen mediar la invasión de otros tipos celulares, como las células endoteliales y los hepatocitos.^{231,321,659} Una vez secuestrados dentro de los fagosomas, los microorganismos producen **listeriolisina O** y varias fosfolipasas que les permiten escapar del fagosoma antes de la fusión lisosómica, evitando así la destrucción intracelular. La **listeriolisina O** es codificada por el gen *hly* y es una hemolisina formadora de poros similar a la estreptolisina O de los estreptococos del grupo A.⁶⁸⁹ Actúa al unirse al colesterol de la membrana y luego insertarse en la membrana diana, lo que conduce a la formación de los poros transmembrana. Los mutantes que carecen del gen *hly* son avirulentos e incapaces de escapar de la vacuola internalizada.⁶⁸⁹ Además, la expresión de este gen en las bacterias avirulentas (p. ej., *B. subtilis*) promueve el escape de estos microorganismos al citoplasma.⁶⁹⁰ Asimismo, los mutantes que carecen de fosfolipasa de amplio espectro (*PlcB*) y fosfolipasa específica de fosfatidilinositol (*PlcA*) muestran alrededor del 50% de la eficiencia en el escape de los fagosomas de los macrófagos como cepas de tipo silvestre.⁸¹⁸ Una vez dentro del citosol, otra proteína de la superficie de la listeria, **ActA**, produce la polimerización intracelular de la actina.⁴⁹⁷ Esto conduce a la translocación de las bacterias hacia la superficie de la membrana de la célula diana para formar proyecciones similares a pseudópodos que brotan y son ingeridas por los macrófagos y otras células, como hepatocitos y enterocitos. Tanto las fosfolipasas bacterianas como una enzima metaloproteasa adicional funcionan también facilitando la propagación intercelular de las bacterias luego de la translocación mediada por la actina hacia la superficie celular.^{694,818} Estos mecanismos le permiten al microorganismo moverse directamente de una célula a otra sin exposición a factores inmunitarios solubles, como anticuerpos y complemento.

Epidemiología de *L. monocytogenes*

Aunque todas las especies de *Listeria* pueden ser aisladas en el medioambiente y en diversos animales como patógenos y como comensales, sólo *L. monocytogenes* es un patógeno animal y humano bien reconocido. Este microorganismo puede ser aislado en suelo, agua fresca, aguas residuales y vegetación y como parte de la flora fecal de una amplia variedad de animales.⁷⁸³ *L. monocytogenes* puede infectar numerosos animales domésticos, como roedores, conejos, ovejas y rumiantes, los cuales se infectan del medioambiente, donde el microorganismo contamina la vegetación y el suelo. Las infecciones en estos animales son sepsis, romboencefalitis, prematuridad y aborto.³¹⁵ *L. monocytogenes* también es un contaminante frecuente de los productos alimenticios. Puede crecer en biopelículas sobre la superficie de distintos alimentos y en realidad la refrigeración aumenta aún más su crecimiento debido a la capacidad de los microorganismos para crecer a 4 °C. Dada su ubicuidad en los alimentos, es probable que los seres humanos tengan

contacto diario con estos microorganismos y, en consecuencia, algunas personas se convierten en sus portadores fecales.⁵⁸⁷ El microorganismo es un componente transitorio de la flora intestinal humana y puede ser excretado en las heces en un 1-10% de las personas sanas.^{780,783} La listeriosis humana ocurre principalmente en los meses de primavera y verano, y hay casos esporádicos (fuera de los brotes de transmisión alimentaria) en tasas anualizadas de menos de 1 caso por 100 000 habitantes, aunque la infección es más frecuente en los lactantes (10 casos/100 000 habitantes) y los ancianos (1,4 casos/100 000 habitantes).³³⁴ Aunque la infección asintomática es bastante rara, siempre se debe sospechar en el caso de huéspedes inmunodeprimidos.

Importancia clínica de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes se asocia con diversos síndromes clínicos.^{553,599,600,621,669} El resultado más frecuente de la adquisición del microorganismo casi siempre como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados, es la aparición de un estado de portación gastrointestinal en individuos asintomáticos. Durante este estado el microorganismo puede ser excretado en las heces. La infección sintomática aguda ocurre a menudo durante el embarazo, habitualmente durante la última mitad de la gestación (segundo o tercer trimestre) y la enfermedad se presenta con síntomas similares a la gripe, con fiebre, odinofagia, mialgias, malestar general, dolor en hipogastrio y dorsalgia.⁸⁵⁶ En ocasiones, se observa secreción vaginal, diarrea y síntomas urinarios. Se puede presentar leucocitosis periférica y los hemocultivos recogidos durante la fase aguda de esta enfermedad transitoria pueden ser positivos. Durante la infección materna, puede ocurrir bacteriemia oculta y la transmisión transplacentaria del microorganismo, que conducen a la infección intrauterina del feto.⁸⁵⁶ La infección in utero puede inducir trabajo de parto y el nacimiento prematuro de un feto infectado o mortinato. En general, los síntomas en la madre ceden luego del parto y el alumbramiento. La supervivencia fetal está determinada en parte por la duración de la gestación: el aborto espontáneo ocurre cuando ésta se adquiere al comienzo del embarazo y se presenta una infección neonatal cuando la infección se adquiere más tarde.^{281,564}

La enfermedad en los neonatos puede ser categorizada como de "inicio temprano" o de "inicio tardío". En general, los recién nacidos infectados in utero presentan sepsis aguda, tienen una enfermedad diseminada y se observan lesiones cutáneas pustulosas y granulomas que contienen *L. monocytogenes* en el encéfalo, el hígado, los riñones, el pulmón y el bazo (enfermedad de inicio temprano). Los tejidos placentarios suelen mostrar pruebas de corioamnionitis aguda. La mortalidad de la listeriosis de inicio agudo es alta, pero las infecciones neonatales mortales son más frecuentes en los niños inmunodeprimidos.⁵⁸⁸ La listeriosis en los lactantes también puede presentarse como infecciones de inicio tardío, en las cuales el neonato se infecta a través de la portación gastrointestinal materna del microorganismo. El lactante es expuesto a los microorganismos durante el parto vaginal a través del canal de parto; la deglución o la aspiración de los microorganismos en este medio es el modo probable de adquisición del microorganismo y de la infección. Los lactantes con este cuadro tienen más de 3 a 5 días de vida, y la enfermedad aparece 7 a 14 días después del nacimiento.^{553,599} En general, la listeriosis de inicio tardío se presenta como una meningitis neonatal, con signos y síntomas de fiebre, irritabilidad y fontanelas hipertensas. En estos recién nacidos, la tinción de Gram del líquido cefalorraquídeo (LCR) muestra leucocitos polimorfonucleares junto con hiperproteinorraquia e

hipoglucorraquia; se observan los bacilos grampositivos de *L. monocytogenes* en más del 50% de los casos. En los casos de enfermedad de inicio tardío, el embarazo casi siempre transcurre sin complicaciones, signos de infección (p. ej., fiebre) ni sepsis (p. ej., hemocultivos positivos).

Las personas adultas también pueden infectarse con *L. monocytogenes*; estos pacientes presentan sepsis aguda, meningitis subaguda, meningoencefalitis o romboencefalitis.⁶⁰⁰ Los adultos que sufren una sepsis aguda por listeria suelen tener procesos malignos subyacentes o están inmunodeprimidos (p. ej., linfoma, trasplante de órganos, diabetes, enfermedad hepática/renal crónica, collagenopatías). En general, se observan hemocultivos positivos y un cuadro clínico similar a la sepsis asociada con la bacteriemia por gramnegativos. En algunos pacientes, los microorganismos atraviesan la barrera hematoencefálica e infectan las meninges y el encéfalo.⁸⁵⁷ La meningitis subaguda se desarrolla en varios días y se caracteriza por fiebre de bajo grado, cefaleas y rigidez de la nuca. En la presentación subaguda, los recuentos de células en LCR suelen ser más bajos y los microorganismos a menudo no se observan en las tinciones de Gram del LCR. La meningoencefalitis causada por *L. monocytogenes* se asocia con varias características singulares. La rigidez de nuca es menos frecuente y se observa en el 80-85% de los adultos. Los trastornos motores, como ataxia, temblores, parálisis de nervios craneales y actividad comicial, son más frecuentes con la infección por listeria que por otros agentes etiológicos de meningoencefalitis.^{35,790} Otra característica clínica de estos pacientes es la fluctuación del estado mental. En algunos casos, la infección del sistema nervioso central por listerias puede progresar y afectar el tronco encefálico (romboencefalitis), y los estudios por imágenes por lo general muestran microabscesos en el diencéfalo y en el cerebelo.⁷⁹⁰

Los abscesos encefálicos, tanto únicos como múltiples, pueden producirse como complicación de la meningoencefalitis por listerias.^{210,920} El diagnóstico de meningoencefalitis y de romboencefalitis se establece por el cultivo de las muestras de LCR y sangre.

Las infecciones focales causadas por *L. monocytogenes* abarcan infecciones cutáneas, abscesos, artritis, peritonitis (que incluye peritonitis bacteriana espontánea), abscesos hepáticos y esplénicos, colecistitis, endoftalmítis, infecciones de articulaciones protésicas y de injertos vasculares, osteomielitis, miocarditis y endocarditis.^{108,149,217,241,332,351,452,453,472,544,812,837,844,915} La mayoría de estas complicaciones se asocian con la diseminación hematogena y suelen ocurrir en huéspedes inmunodeprimidos. Se han comunicado casos en pacientes inmunodeprimidos debido a enfermedades agudas o crónicas de fondo caracterizadas por inmunodeficiencia celular o humoral (p. ej., neoplasias, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, trasplante de órganos, colitis ulcerosa, diabetes, nefropatía, cirrosis alcohólica e infección por HIV) y en los que son tratados con agentes quimioterápicos citotóxicos o esteroides por sus trastornos subyacentes.^{24,73,147,343,393,540,551,594} Se observaron infecciones cutáneas en individuos antes sanos que tuvieron contacto directo con animales infectados o tejidos animales (tejidos placentarios, líquido amniótico). Estas infecciones ocurren en veterinarios, individuos con ocupaciones asociadas con animales y, en ocasiones, en el personal de laboratorio. Las infecciones cutáneas se caracterizan por lesiones papulares o pustulosas y han ocurrido infecciones diseminadas luego de la inoculación cutánea primaria.^{125,819} La endocarditis por *L. monocytogenes* es resultado de la bacteriemia y suele afectar las válvulas aórtica o mitral nativas dañadas o las válvulas protésicas. Es frecuente la

embolización séptica y la formación ulterior de abscesos en sitios distantes. Se observan abscesos hepáticos y esplénicos, hepatitis, granulomas hepáticos y peritonitis espontánea causados por *L. monocytogenes* diseminada en pacientes con trasplantes, en diabéticos y en aquellos con cirrosis u otras hepatopatías.¹⁰² Se han documentado infecciones de líquido pleural por *L. monocytogenes* en pacientes con cáncer, en los cuales la infección pleural ocurrió por siembra hematogena de derrames pleurales malignos más que en forma secundaria a un proceso paraneumónico.⁵⁹¹ *L. monocytogenes* también puede causar infecciones en pacientes que se encuentran en diálisis peritoneal ambulatoria continua y en aquellos que tienen derivaciones ventriculoperitoneales.^{228,558,812,956} Algunos estudios mostraron que los individuos con infección por HIV tienen un riesgo 500 a 1 000 veces mayor de sufrir una infección por HIV que la población general.⁴⁷⁰ En los casos típicos, las infecciones por listerias en individuos infectados por HIV se presentan como meningitis o como bacteriemia sin una fuente identificable.^{73,209,252,475}

L. monocytogenes está presente como contaminante en muchos tipos de productos alimenticios, como leche y verduras crudas, peces, aves de corral y carnes frescas y procesadas.^{683,775,781} En los alimentos contaminados, los recuentos de colonias del microorganismo pueden exceder 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC)/g de alimento. En los últimos años, se han reconocido con frecuencia creciente brotes de gastroenteritis febril por alimentos debidos a *L. monocytogenes*.^{44,120,141,142,198,724,759} En las vacas lecheras puede producir encefalitis, meningitis, septicemia y mastitis. La siembra del microorganismo desde la ubre o la contaminación del medioambiente puede conducir a su presencia en la leche cruda.¹⁹⁸ Algunas encuestas han indicado que *L. monocytogenes* puede estar presente en alrededor del 4% de las muestras de leche cruda examinadas en los Estados Unidos.⁷⁸¹ El microorganismo ha sido aislado en leche y quesos no pasteurizados preparados con productos lácteos también sin pasteurizar. El rastreo de otro brote logró que se estableciera que la contaminación provenía de repollos y ensaladas de repollos, zanahorias, cebolla y mayonesa contaminados.⁷⁷⁵ En estos casos, el repollo creció en suelo contaminado con excrementos de ovejas infectadas. En 1985, un brote grande en el condado de Los Ángeles, California, afectó a más de 181 personas, incluidos 93 casos perinatales, y condujo a una tasa de mortalidad del 33%.¹⁴¹ El alimento implicado fue un queso blando de estilo mexicano que había sido preparado con leche no pasteurizada. También se ha implicado en algunos brotes el helado contaminado; las carnes crudas y los productos procesados preparados con carnes y pescado pueden también alojar a los microorganismos.¹⁴² En 1994, ocurrió un brote transmitido por alimentos en 10 de 36 personas (incluidas dos mujeres embarazadas) que asistieron a una fiesta en la ciudad de Nueva York.⁷²⁴ En este brote, los camarones fueron los alimentos contaminados. La investigación de otro brote entre 45 concurrentes de un picnic en Illinois indicó que la leche de chocolate estaba contaminada.^{198,774} Como corolario del reconocimiento de los brotes de transmisión alimentaria de listeriosis, se describió un síndrome de gastroenteritis febril causado por *L. monocytogenes*. Este síndrome incluye diarrea no sanguinolenta, náuseas y vómitos acompañados por fiebre, fatiga, escalofríos y mialgias.^{724,759,774} El análisis serológico retrospectivo de pacientes con gastroenteritis febril ha podido demostrar respuestas inmunitarias a la listeriolisina, un presunto factor de virulencia de *L. monocytogenes*.¹⁹⁸ La gastroenteritis febril suele ser autolimitada, pero puede ocurrir enfermedad invasora en pacientes inmunodepri-

midos y en aquellos con otras infecciones gastrointestinales bacterianas o virales subyacentes.⁵⁵²

Junto con el reconocimiento y la documentación de brotes de transmisión alimentaria debidos a *L. monocytogenes*, los CDC han establecido pautas para su prevención.¹⁴³ Las pautas, que se aplican a todos los individuos, son cocinar con cuidado los alimentos crudos de origen animal; lavar en forma minuciosa las verduras crudas antes de comerlas; mantener las carnes crudas separadas de las verduras, los alimentos cocidos y los "alimentos listos para comer" y evitar el consumo de leche cruda (no pasteurizada) o de alimentos elaborados con ella. Se deben lavar con cuidado las manos, los cuchillos y las planchas para cortar después de la manipulación de alimentos crudos. En las personas con alto riesgo de listeriosis (personas inmunodeprimidas, embarazadas, ancianos), se deben evitar los quesos blandos (p. ej., queso de estilo mexicano, queso fresco, queso cremoso, Camembert y Roquefort), aunque no hay ninguna necesidad de evitar los quesos duros (p. ej., queso gruyere, queso Colby), el queso crema, el requesón o el yogur.³³⁹ Los alimentos sobrantes o "listos para comer" (p. ej., "perros calientes") deben ser recalentados con vapor hasta que estén calientes antes de ingerirlos. Los alimentos "del mostrador de charcutería" (p. ej., fiambres, salames) deben evitarse o calentarse con cuidado. A mediados de la década de 1990, la industria alimentaria introdujo una iniciativa denominada Análisis de riesgos en puntos de control críticos (Hazard Analysis at Critical Control Points, HACCP) para mejorar la vigilancia y el control de *L. monocytogenes* y otros patógenos transmitidos por alimentos en el medioambiente de la planta procesadora de alimentos. La Food and Drug Administration (FDA) ha exigido un enfoque de "cero tolerancia" para el control de la listeriosis, con incrementos tanto en la cantidad de inspecciones en los centros de procesamiento de alimentos como el retiro del mercado de los alimentos sospechosos de albergar patógenos.⁸⁷³

También se han documentado infecciones intrahospitalarias por listerias. En junio de 1989, ocurrió un brote de listeriosis hospitalaria en Costa Rica en recién nacidos de 4 a 8 días de vida luego del parto de un lactante con infección por listeria de inicio temprano.⁷⁸² La investigación de posibles fuentes del microorganismo para los nueve casos mostró que todos los lactantes habían sido bañados con vaselina de un recipiente de múltiples dosis. Se aisló una cepa de *L. monocytogenes* que era idéntica a la de los lactantes mediante electroforesis enzimática multilocus del frasco de vaselina mediante enriquecimiento en frío. El rastreo de otro brote de listeriosis hospitalaria en recién nacidos detectó como frente de infección el uso frecuente de un termómetro rectal limpiado en forma incorrecta.⁶⁷⁴ También han ocurrido casos agrupados de infecciones hospitalarias por *L. monocytogenes* en adultos inmunosuprimidos en varios hospitales. Muchas veces no pudo determinarse la fuente de microorganismos de estos brotes.

Aislamiento de *L. monocytogenes* en muestras clínicas

L. monocytogenes puede ser aislado en sangre, LCR, muestras genitales, líquido amniótico y muestras de biopsia de tejidos materno-fetales. La inoculación directa tanto en medios de agar como en caldo con una incubación durante toda la noche suele dar como resultado el desarrollo del microorganismo. En las tinciones de Gram de muestras clínicas y de hemocultivos, el microorganismo puede aparecer como bacilos grampositivos comunes o como cocobacilos plétóricos y cortos. Si se presentan células polimorfonucleares o mononucleares, los microor-

ganismos se encuentran tanto en forma intracelular como extracelular. Debido a las variaciones en la morfología de la coloración de Gram que se observan con este microorganismo, los morfotipos de *L. monocytogenes* pueden ser confundidos con difteroides o con ciertos estreptococos, sobre todo *S. pneumoniae*, enterococos y algunos estreptococos viridans.

Los métodos para el aislamiento de *L. monocytogenes* en los alimentos difieren significativamente de los utilizados para el de muestras clínicas humanas. Estos métodos comprenden el enriquecimiento en caldo y el subcultivo en distintos tipos de medios selectivos, entre ellos Chromagar (París, Francia). El reconocimiento de *L. monocytogenes* se logra por la presencia de sustancias químicas en los medios que producen colonias coloreadas. Estos métodos se mencionan en publicaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y del Servicio de Inspección de Alimentos de Holanda.^{401,914}

Identificación de especies de *Listeria*

L. monocytogenes crece bien en agar sangre de carnero (SBA) y produce colonias blanco grisáceas que se asemejan estrechamente a las de los estreptococos β -hemolíticos del grupo B. Después de 18-24 horas de incubación, las colonias pueden mostrar una zona estrecha de β -hemólisis que no se extiende mucho más allá del borde de la colonia (véase lámina en color 14-1B y C). Antes de ese momento, la β -hemólisis sólo se puede observar directamente debajo de la colonia luego de eliminar el crecimiento de ésta de la superficie de agar con un hisopo. En la incubación más prolongada o en zonas de la placa que han sido inoculadas con cortes, la β -hemólisis del microorganismo se torna más obvia. Entre las otras especies, las subespecies de *L. ivanovii* producen zonas anchas o incluso múltiples zonas de β -hemólisis en medios que contienen sangre o sangre de caballo, mientras que *L. seeligeri* produce zonas hemolíticas que son más estrechas que las de *L. monocytogenes*. Fujisawa y Mori evaluaron varios medios basales y sangre de diferentes especies animales para la detección de β -hemólisis producida por *L. monocytogenes* y observaron que la base de agar sangre n° 2 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) con suplemento de sangre desfibrinada de caballo al 5% proporcionaba la detección más definida de la actividad de hemolisina.²⁸⁷ Debido a la semejanza de las colonias de *L. monocytogenes* con las de los enterococos y los estreptococos β -hemolíticos del grupo B, no se recomienda la utilización de procedimientos abreviados de identificación en el laboratorio. Siempre se deben realizar tinciones de Gram y pruebas de catalasa.

L. monocytogenes es un bacilo grampositivo catalasa positivo, facultativo (cuadro 14-2). El microorganismo es móvil y muestra unos movimientos "tambaleantes" sobre todo en frotis de "gota gruesa" preparados con cultivos de caldo después de la incubación durante una noche a 25 °C. Esta mayor motilidad luego de la incubación a temperatura ambiente también es evidente en un medio semisólido para motilidad, donde el microorganismo muestra un "paraguas" característico de motilidad cerca de la superficie del medio que contiene agar al 0,2-0,4% después de la incubación a 25 °C (véase lámina en color 14-1E).¹⁷ El microorganismo también crece en presencia de bilis al 40% e hidroliza la esculina; por lo tanto, se pueden usar medios de agar inclinado (pico de flauta) con bilis esculina, como los que se utilizan para el diagnóstico presuntivo de estreptococos del grupo D (*Streptococcus bovis*) y enterococos para demostrar hidrólisis de esculina. El microorganismo es fermentativo, produce ácido a partir de glucosa y produce acetoina, lo que conduce a una reacción de Voges-Proskauer positiva. Todas las

Cuadro 14-2 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Listeria*

ESPECIES	HEMÓLISIS, SBA	REDUCCIÓN DE NO ₃	HIDRÓLISIS DE HIPURATO	PRUEBA DE CAMP, <i>S. AUREUS</i>	PRUEBA DE CAMP, <i>R. EQUI</i>	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE:						
						Manitol	α-metil- D-manósido	L-ramnosa	D-xilosa	Ribosa	N-acetil-β- D-manosamina	Almidón soluble
<i>L. monocytogenes</i>	β	—	+	+	V	—	+	+	—	—	ND	—
<i>L. ivanovii</i> subespecie <i>ivanovii</i>	β ^a	—	+	—	+	—	—	—	+	+	V	—
<i>L. ivanovii</i> subespecie <i>londoniensis</i>	β ^a	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+	—
<i>L. innocua</i>	Ninguna	—	+	—	—	—	+	V	—	—	ND	—
<i>L. grayi</i>	Ninguna	V	—	—	—	+	+	V	—	V	ND	+
<i>L. seeligeri</i>	β	ND	ND	+	—	—	—	—	+	—	ND	ND
<i>L. welshimeri</i>	Ninguna	ND	ND	—	—	—	+	V	+	—	ND	ND

^a Zonas amplias o múltiples de β-hemólisis.

+, reacción positiva; —, reacción negativa; V, reacción variable; ND, datos no disponibles.

cepas de *L. monocytogenes* fermentan el α -metil-D-manósido y no fermentan la D-xilosa. La reacción β -hemolítica, la prueba de catalasa positiva, la falta de producción de H_2S en agar triple azúcar hierro (TSI), la motilidad a temperatura ambiente y la hidrólisis de esculina diferencian *L. monocytogenes* de *Erisipelothrix rhusiopathiae*. Este microorganismo se diferencia de todas las especies de *Corynebacterium* por la motilidad. *Leifsonia aquatica*, el ex "*Corynebacterium aquaticum*", también es un bacilo grampositivo, catalasa positivo y móvil, pero este microorganismo es no hemolítico, crece como colonias con pigmentación amarilla y muestra una reacción de Voges-Proskauer negativa (véase la sección sobre especies de *Leifsonia*). Aunque las características de *L. monocytogenes* suelen ser uniformes y poco ambiguas, se han aislado cepas aberrantes que carecen en actividad de catalasa en pacientes con sepsis y meningitis por listeria típicas.^{119,242,857} En el cuadro 14-2 se presentan las características bioquímicas para la identificación de las especies de *Listeria*.

La prueba de CAMP también se ha utilizado para identificar *L. monocytogenes*.¹¹⁷ Con las especies de *Listeria*, la prueba CAMP se realiza con una cepa de *S. aureus* productora de β -lisina y con una cepa de *Rhodococcus equi*. Se observa hemólisis sinérgica entre *S. aureus* y cepas presuntas de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri*, mientras que se observa hemólisis aumentada entre *R. equi* y cepas presuntas de *L. ivanovii*. Con *L. monocytogenes*, está indicada una prueba de CAMP positiva con *S. aureus* por una mayor hemólisis en la región que se encuentra entre las dos estrías de crecimiento que están en ángulo recto entre sí y no se intersecan, mientras que la observada entre *R. equi* y *L. ivanovii* aparece como un área de hemólisis aumentada con forma de pala. Puede ser difícil interpretar esta prueba, ya que algunos investigadores han comunicado reacciones hemolíticas sinérgicas entre *L. monocytogenes* y *R. equi*.¹⁷

También existen sistemas comerciales para la identificación de especies de *Listeria*. Los sistemas API Coryne® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y RapID CB-Plus® (Remel, Lenexa, KS) contienen especies de *Listeria* en sus bases de datos y al menos identifican en forma confiable el género de estos microorganismos. En una evaluación de este sistema para la identificación de especies de *Listeria*, el API Coryne identificó las 72 cepas de *L. monocytogenes* que fueron evaluadas como *L. monocytogenes/innocua* y la identificación de la especie fue dependiente de la presencia de β -hemólisis y de una reacción de CAMP positiva (véase lámina en color 14-1F).⁴⁸⁵ Otros investigadores han comunicado resultados similares tanto para API Coryne como para RapID CB-Plus.^{283,305,310,333,438,833} API *Listeria* (BioMérieux) y Micro-ID *Listeria* (Remel, Lenexa, KS) están diseñados específicamente para la identificación de especies de *Listeria*. El primero es un sistema de sustratos enzimáticos cromogénicos de 10 pruebas que identifica de modo fiable varias especies en el género, entre ellas *L. monocytogenes*, dentro de las 24 horas.^{84,287,671} Este panel incluye una prueba para glicil arilamidasa (prueba DIM) que diferencia *L. monocytogenes* (prueba DIM negativa) de *L. innocua* (prueba DIM positiva) sin necesidad de evaluar la actividad hemolítica en SBA. También se pueden utilizar las pruebas autónomas para la detección de alanil arilamidasa que utilizan D,L-alanina- β -naftilamida o D,L-alanina-*p*-nitroanilida para identificar especies de *Listeria*.¹⁶⁰ *L. monocytogenes* no hidroliza estos compuestos debido a la ausencia de arilamidasa específicas, mientras que todas las otras especies, que incluyen *L. innocua*, son alanil o glicil arilamidasa positivas. Esta prueba es muy útil para identificar cepas de *L. monocytogenes* que son poco

hemolíticas o no hemolíticas. El Micro-ID *Listeria* de 15 pruebas también identifica correctamente a estos microorganismos, pero al igual que API Coryne, requiere una evaluación de hemólisis para la diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. innocua*.⁵⁴ También se han utilizado ciertos sustratos en el panel de asimilación de hidratos de carbono API 50CH (BioMérieux) para la identificación de especies de *Listeria*.⁴⁸⁶

Se han desarrollado además métodos moleculares para la identificación de especies de *Listeria*. También existe un ensayo con sonda quimioluminiscente de DNA altamente sensible y específico -AccuProbe® *Listeria* (Gen-Probe, San Diego, CA) y un ensayo con sonda espectrofotométrica de DNA -GeneTrak *Listeria*® (GeneTrak Systems, Framingham MA)- para la identificación rápida de *L. monocytogenes* de colonias que crecen en medios de aislamiento primario.^{638,651} La última prueba se creó y utilizó fundamentalmente para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos. Volohov y cols., en la Food and Drug Administration, idearon un ensayo de micromatrices moleculares para la identificación de las seis especies de *Listeria*.⁹²⁴ Este ensayo involucraba la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de seis genes diana y la hibridación de sondas de DNA monocatenario marcadas con fluorescencia específicas para cada una de las seis especies.

Se han utilizado varios métodos para la caracterización molecular de las cepas de *L. monocytogenes* del medioambiente y tanto de infecciones humanas como animales. Los métodos electroforéticos enzimáticos multilocus han sido útiles en los estudios taxonómicos de listerias, pero no son suficientemente discriminatorios para fines epidemiológicos.^{93,95,358} La ribotipificación, la determinación de huellas dactilares del DNA (*fingerprinting*) sobre base de PCR, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, la electroforesis en gel de campo pulsado y PCR con cebado aleatorio han sido muy útiles para la identificación de especies de *Listeria*, en investigaciones de brotes de listeriosis por transmisión alimentaria, en la diferenciación entre la recaída y la reinfección, y en la determinación de la diferencia de cepas entre las cepas ambientales y aquellas provenientes de animales con listeriosis.^{195,338,518,534,554,640,655,901,909} Se han utilizado métodos similares para la vigilancia de *Listeria* en mataderos y para la caracterización de cepas aisladas en distintos productos alimenticios.^{342,692} La electroforesis en gel de campo pulsado parece ser el método más sólido de subtipificación de algunos serotipos de listerias como los serotipos 4b, que no son subtipificados fiablemente mediante otros métodos moleculares, como la ribotipificación y el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. El sistema automático RiboPrinter® (Qualicon, Wilmington, DE) facilita el rápido reconocimiento (8 horas) de cepas relacionadas y puede ser útil como primer paso para caracterizar cepas aisladas durante los brotes, utilizándose otros métodos (electroforesis en gel de campo pulsado) para una mayor caracterización. Cai y cols. describieron un método de tipificación que involucraba la secuenciación multilocus de genes específicos (genes de mantenimiento -housekeeping genes-, genes asociados con la virulencia) y regiones espaciadoras intergénicas de los que se observó que son reproducibles y altamente discriminatorios para diferenciar las cepas de *L. monocytogenes* humanas, animales y transmitidas por alimentos.¹²⁴ La serotipificación, método clásico de caracterización de especies, no ha sido muy útil, dado que sólo una pequeña cantidad de serotipos (específicamente los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b) ha sido vinculada con brotes y con la aparición de enfermedad. Más aún, algunos antígenos de *L. monocytogenes*

utilizados en el esquema de tipificación son compartidos con *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. También existen grupos de bacteriófagos para la tipificación de fagos de *L. monocytogenes* utilizados por muchas plantas procesadoras de alimentos en Europa. La tipificación de fagos no es muy eficiente porque algunas cepas son no tipificables con los conjuntos de fagos existentes. Algunos estudios han mostrado que las cepas del mismo serotipo provenientes de diferentes áreas geográficas pueden no ser igualmente sensibles a la lisis por el mismo conjunto de bacteriófagos.¹²⁸

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento de las infecciones por *Listeria*

Excepto en el caso de las mujeres que dan a luz a lactantes con enfermedad de inicio temprano, la infección por *L. monocytogenes* suele ser mortal si no se trata. *L. monocytogenes* es en general sensible a penicilina, ampicilina, aminoglucósidos, eritromicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e imipenem.⁵⁸² Las cefalosporinas (de primera, segunda y tercera generación) y las fluoroquinolonas no son activas contra *L. monocytogenes*.^{254,421} La ampicilina con un aminoglucósido (p. ej., gentamicina) o sin él se considera el tratamiento de elección para las infecciones sistémicas.^{421,463,553} En los pacientes alérgicos a la penicilina, se cree que trimetoprim-sulfametoxazol con rifampicina o sin ella es la mejor alternativa.^{603,835,955} En un estudio retrospectivo también se observó que amoxicilina con trimetoprim-sulfametoxazol era un régimen terapéutico eficaz.⁶⁰³ Los pacientes deben ser tratados por lo menos durante 3 semanas, según su estado inmunitario. Los que tienen una enfermedad avanzada por HIV pueden requerir tratamiento durante toda la vida para evitar las recaídas. Es interesante señalar que el uso de trimetoprim-sulfametoxazol como agente profiláctico para las infecciones por *Pneumocystis jiroveci* en pacientes HIV positivos puede ser parcialmente responsable de proteger a estos individuos de las infecciones por *Listeria*, aunque las pautas alimentarias ampliamente aceptadas también pueden tener cierta repercusión sobre la incidencia de enfermedad en esta población.²⁵² La vancomicina es un agente terapéutico apropiado contra la bacteriemia primaria por *L. monocytogenes*, pero no atraviesa bien la barrera hematoencefálica como para ser útil en el tratamiento de la meningitis. Nunca se ha comunicado una resistencia natural alta a la vancomicina entre las listerias, pero se han transferido genes *vanA* que codifican la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus faecium* a *L. monocytogenes* y otras cuatro especies de *Listeria* en laboratorios de investigación.⁸² Para evaluar la sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Listeria*, el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) de los Estados Unidos recomienda utilizar un método de microdilución en caldo de Mueller-Hinton con suplemento de cationes y sangre de caballo lisada al 2-5% sólo para las pruebas con penicilina y ampicilina.⁶²⁶

Patogenicidad de otras especies de *Listeria*

En modelos de cultivo de ratón y tisulares, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* muestran propiedades patógenas, mientras que las otras especies del género se consideran no patógenas.⁴²⁰ Gouin y cols. observaron que el conjunto de genes asociados con la virulencia de *L. monocytogenes* también se encuentra en *L. ivanovii* y *L. seeligeri*.³⁵³ Aunque tanto *L. monocytogenes* como *L. ivanovii* pueden invadir las células de mamíferos en cultivo tisular y propagarse de una célula a otra, la última espe-

cie carece de la citotoxina asociada con *L. monocytogenes*, lo que sugiere que la falta de citotoxina puede explicar la menor virulencia de *L. ivanovii*.⁴⁸¹ Esta última es una causa contagiosa de aborto tanto en ovejas como en ganado bovino.^{15,788} Cummins y cols. aislaron *L. ivanovii* en hemocultivos de un paciente con SIDA complicado con un linfoma no Hodgkin.¹⁹³ Lessing y cols. también lo aislaron en un hemocultivo de un alcohólico de 26 años consumidor de drogas intravenosas.⁵³³ En 2003, *L. innocua* fue comunicado por primera vez como causa de bacteriemia mortal en un paciente de 62 años no inmunodeprimido con colangitis y shock séptico.⁶⁷⁸ El microorganismo fue identificado mediante métodos convencionales y confirmado por API *Listeria* y secuenciación de rDNA 16S.

Especies de *Erysipelothrix*: *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Erysipelothrix tonsillarum*

Taxonomía del género *Erysipelothrix*

En la edición de 1984 del *Manual de Bergey*, se incluye el género *Erysipelothrix* con los bacilos grampositivos, no esporulados habituales de condición familiar incierta.⁴⁵⁹ Algunos estudios de secuenciación de rRNA 16S indican que este género está estrechamente relacionado con el micoplasma, mientras que el análisis de la pared celular sugiere una afiliación con los clostridios y los actinomicetos. En la siguiente edición del *Manual de Bergey*, el género *Erysipelothrix* es clasificado en el nuevo filo Firmicutes en la clase Mollicutes (recuadro 14-1). Dentro de esta clase, los órdenes I a IV incluyen a los micoplasmas y microorganismos relacionados, mientras que el orden V (*incertae sedis*) incluye los géneros *Erysipelothrix* y *Holdemania* en la familia propuesta "Erysipelotrichaceae".³²⁹ Desde el punto de vista serológico, las cepas de *Erysipelothrix* pueden ser subdivididas en serotipos, y el más recientemente descrito es el serotipo 26. Existen también algunas cepas, denominadas "cepas N", que no producen ningún anticuerpo precipitante contra extractos termoestables homólogos o heterólogos en conejos. Los estudios de hibridación de DNA-DNA realizados con estos distintos serotipos indican que el género *Erysipelothrix* contiene dos especies: *E. rhusiopathiae* (compuesta por los serotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 4-6, 8, 9, 11, 12, 15-17, 19, 21 y tipo N) y *E. tonsillarum* (compuesta por los serotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 y 23).^{864,870} Las cepas que representan el primer grupo de serotipos mostraron una hibridación mayor del 73% con la cepa tipo de *E. rhusiopathiae*, pero una hibridación inferior al 24% con la cepa tipo de *E. tonsillarum*.⁸⁶¹ Por el contrario, las cepas pertenecientes al segundo grupo de serotipos mostraron una hibridación mayor del 66% con la cepa tipo *E. tonsillarum* y menor del 27% con la cepa tipo *E. rhusiopathiae*.⁸⁶¹ Estos datos genéticos también han sido apoyados por exámenes de patrones proteicos de células enteras en SDS-PAGE.^{152,870} Las cepas de *E. tonsillarum* son fenotípicamente idénticas a *E. rhusiopathiae*, salvo en que la primera especie puede fermentar sacarosa (cuadro 14-3). Algunos estudios de genes rRNA 16S de *E. rhusiopathiae* y *E. tonsillarum* han mostrado que las secuencias de nucleótidos tienen una concordancia del 99,8% y sólo se presenta una diferencia de tres nucleótidos entre las dos secuencias.⁴⁹⁰ Dos serotipos (13 y 18) se distinguen de los otros mediante hibridación de DNA y pueden representar especies genómicas separadas sin nombre. Se ha aislado *E. tonsillarum* en tejido de amígdalas porcinas y en la sangre de perros con endocarditis; pero no en infecciones humanas.⁸⁶⁰⁻⁸⁶² Las cepas pertenecientes al mismo serotipo

Cuadro 14-3 Características fenotípicas para la identificación de especies de *Erysipelothrix*

CARACTERÍSTICA	<i>E. RHUSIOPATHIAE</i>	<i>E. TONSILLARUM</i>
Hemólisis, SBA	Ninguna, α	Ninguna, α
Catalasa	—	—
Reducción de nitrato	—	—
H ₂ S en agar hierro de Kligler (KIA)	+	+
Acetoina	+	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+	+
Producción de ácido a partir de sacarosa	—	+
Serotipos incluidos ^a	1a, 1b, 2a, 2b, 4–6, 8, 9, 11, 12, 15–17, 19, 21, tipo N	3, 7, 10, 14, 20, 22, 23

^a Los serotipos 13 y 18 son distintos de los otros por hibridación de DNA y pueden representar otras especies genómicas separadas.

representan cepas diversas, como lo demostró la ribotipificación y la secuenciación de rDNA 16S.¹¹ Se han desarrollado métodos basados sobre PCR para la detección directa del microorganismo en tejidos de cerdos provenientes de mataderos.^{572,798,865}

Factores de virulencia de *E. rhusiopathiae*

E. rhusiopathiae produce varios factores que pueden aumentar la virulencia de estos microorganismos.⁷⁹⁶ La neuraminidasa, enzima que libera residuos de ácido siálico terminal de glucolípidos y glucoproteínas, al parecer funciona promoviendo la fijación de las bacterias y la ulterior invasión celular de *E. rhusiopathiae*.⁶²⁴ Su mayor propagación en los tejidos puede deberse a la producción de hialuronidasa por el microorganismo, aunque el papel de esta enzima en la patogenia de la enfermedad no es todavía muy claro.⁷⁹⁶ *E. rhusiopathiae* también produce una cápsula de polisacárido, la cual tiene un peso molecular de 14 a 22 kDa y funciona ayudando al microorganismo a resistir la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares.⁸⁰⁰ En presencia de suero normal, los macrófagos pueden fagocitar a estos microorganismos, pero la cápsula les permite sobrevivir y reproducirse intracelularmente por la inhibición de la explosión oxidativa dentro de los macrófagos y una producción reducida de metabolitos oxidativos reactivos.⁷⁹⁹ La opsonización con anticuerpos anticapsulares y complemento promueve la fagocitosis y la destrucción intracelular de los microorganismos. También se demostró que algunas estructuras de la superficie celular distintas de la cápsula influyen en la reducción de la inmunidad protectora contra la infección por *E. rhusiopathiae*. Los antisueros dirigidos contra SpaA purificada, una proteína de superficie de 69 kDa que se extiende desde la superficie celular a través de la cápsula, pueden proteger a los ratones de la exposición a una cepa virulenta de *E. rhusiopathiae*, y la administración de SpaA purificada a cobayos induce la formación de anticuerpos opsonicos protectores.^{442,797} También se sugirió un papel similar para una proteína de superficie de 64–66 kDa, aunque esta proteína, y tal vez otras, pueden ser causa de la inducción de inmunidad celular más que de inmunidad humoral.³⁶⁸

Importancia clínica de *E. rhusiopathiae*

E. rhusiopathiae se distribuye ampliamente en la naturaleza, donde se encuentra en distintas especies de animales, principalmente cerdos y vacas. Como también en peces, aves y otros mamíferos salvajes y domésticos.⁷³⁷ En cerdos y vacas, causa

una enfermedad de importancia económica conocida como **erisipela**, pero puede provocar una enfermedad importante en otras especies de animales salvajes y domésticos. La erisipela del cerdo es el resultado de la ingestión de alimentos y agua contaminados. Los microorganismos se multiplican en las amígdalas y los tejidos linfoides en el intestino y ganan acceso al torrente circulatorio. En estos animales, *E. rhusiopathiae* causa una septicemia aguda o una enfermedad crónica con el desarrollo de poliartritis y endocarditis. También se lo encuentra en materia orgánica en descomposición y puede ser aislado en el suelo. En general, los seres humanos adquieren el microorganismo a través del contacto con los tejidos de animales y sus productos infectados. De ahí que la infección habitualmente, pero no siempre, está limitada a individuos de ciertas ocupaciones, como carniceros, veterinarios, granjeros y pescadores.^{182,413,709}

En los seres humanos, *E. rhusiopathiae* puede causar una infección cutánea localizada y leve o, pocas veces, una infección sistémica con septicemia.^{115,709} La primera forma, denominada **erisipeloide**, aparece luego de la inoculación cutánea del microorganismo y suele encontrarse sobre los dedos o la mano.⁷⁰⁸ En los casos típicos, hay dolor localizado, tumefacción y un eritema violáceo que puede propagarse hasta la muñeca y el antebrazo. Las lesiones aparecen 2 a 7 días después de la infección y se caracterizan por un borde elevado y eritematoso que avanza y un área central que ha perdido color. Una manifestación cutánea más grave incluye la formación de ampollas hemorrágicas junto con linfadenitis o linfangitis regional. Como el microorganismo se ubica en las regiones perivasculares de la dermis, se necesitan muestras de biopsia del borde de la lesión que avanza para aislarlo en las infecciones localizadas. Esta forma de infección suele ser autolimitada y cicatrizar en 2 a 4 semanas.

Las infecciones sistémicas ocurren pocas veces y se caracterizan por sepsis y bacteriemia.^{115,324,464,785} En estos pacientes, es frecuente la endocarditis por *E. rhusiopathiae* (sobre todo del lado izquierdo) que causa un daño extenso de las válvulas y los tejidos cardíacos sanos, y tiene una mortalidad elevada.^{115,413,565,899,916} Se ha comunicado tanto endocarditis de válvula nativa como de válvula protésica (que incluye las válvulas protésicas de Starr-Edwards y las válvulas de xenoinjertos porcinos) causadas por *E. rhusiopathiae*.⁴⁰⁰ A menudo, los individuos con infección sistémica no tienen antecedentes de infección cutánea primaria.⁸⁹⁹ Estos pacientes están casi siempre debilitados por el tratamiento inmunosupresor (p. ej., administración de corticosteroides) o trastornos subyacentes que conducen a estados de inmunosupresión, como cáncer, diabetes,

alcoholismo o lupus eritematoso sistémico.^{324,793,890} También se ha comunicado una enfermedad multisistémica que se manifiesta por shock e insuficiencia renal, sobre todo en los pacientes con endocarditis.^{264,340,916} Las manifestaciones y las complicaciones inusuales de la sepsis y la bacteriemia por este microorganismo incluyen abscesos paravulvares y miocárdicos, artritis séptica, fascitis necrosante e infartos intracraneales.^{38,496,750,808}

Aislamiento e identificación de *E. rhusiopathiae*

E. rhusiopathiae puede aislarse en muestras de biopsia de lesiones de erisipeloide y ocasionalmente en hemocultivos. Las muestras de elección para el aislamiento son las obtenidas de los bordes en progresión de lesiones cutáneas con celulitis mediante la inyección de solución salina fisiológica estéril seguida de aspiración o mediante la obtención de biopsias en sacabocados de las mismas zonas. El microorganismo crece bien en los medios de hemocultivo comercialmente disponibles. *E. rhusiopathiae* se desarrolla en forma adecuada en agar sangre de carnero y forma colonias pequeñas (0,1 a 0,5 mm de diámetro), circulares, convexas, lisas (véase lámina en color 14-1H). Puede notarse una débil reacción de α -hemólisis en el medio, en particular donde el crecimiento presenta más zonas confluentes. En la tinción de Gram el microorganismo aparece en forma de bacilos delgados; también pueden observarse cadenas no ramificadas de bacilos (cuadro 14-3). La propiedad más útil para identificar a este microorganismo es la producción de H_2S en la profundidad del agar triple azúcar hierro o del agar hierro de Kligler (KIA) en pico de flauta (agar inclinado). Cuando en cepas sospechosas no se investiga la producción de H_2S se puede concluir erróneamente que estos microorganismos son especies de *Lactobacillus*.²³⁵ La inoculación apropiada por estría y punción en el pico de flauta del medio KIA pondrá en evidencia un agar inclinado ácido y una zona profunda ácida debido a la producción de ácido a partir de glucosa y lactosa; el H_2S puede notarse en toda la profundidad o sólo a lo largo de la línea de estración en profundidad (véase lámina en color 12-2A). Esta reacción es útil para diferenciar *E. rhusiopathiae* de otros bacilos gramnegativos como *Arcanobacterium haemolyticum*; esta especie presenta también β -hemólisis en agar sangre de carnero. Una reacción de catalasa negativa, la falta de hemólisis o una α -hemólisis débil en el agar sangre de carnero y la producción de H_2S en el medio KIA o en agar triple azúcar hierro también ayudan a diferenciar *E. rhusiopathiae* de *L. monocytogenes*. La inoculación por punción en un tubo de agar gelatina y la incubación a 22 °C lleva al crecimiento en forma de "cepillo limpiatubos", en el cual los microorganismos se propagan en líneas perpendiculares a la inoculación por punción, lo que da una apariencia "vellosa" (véase lámina en color 14-1G). Se ha comunicado que *E. rhusiopathiae* produce una enzima coagulasa que puede coagular el plasma bovino o de conejos.⁸⁸¹ No obstante, se estableció que esta característica se debía al uso de citrato, hallado en el plasma; no se observó actividad de coagulasa cuando se utilizaron preparados con oxalato, EDTA o heparina.⁸⁶³

E. rhusiopathiae es débilmente fermentador, produce ácido a partir de glucosa, galactosa, fructosa, lactosa, maltosa y *N*-acetilglucosamina. No produce ácido a partir de glicerol, arabinosa, xilosa, adonitol, inositol, manitol, sorbitol, amigdalina, melibiosa, trehalosa, celobiosa, inulina, melezitosa, rafinosa ni glucógeno.⁴⁵⁹ No produce acetoina ni indol y no reduce los nitratos a nitritos. Las bases de datos de los sistemas de identificación API Coryne® y RapID CB-Plus® incluyen a *E. rhusiopathiae*. Las cepas de *E. tonsillarum* son fenotípicamente

idénticas a *E. rhusiopathiae*, excepto en que la primera especie también produce ácido a partir de la sacarosa. Las características bioquímicas de identificación de especies de *Erysipelothrix* se muestran en el cuadro 14-3.

Sensibilidad de *E. rhusiopathiae* a los antibióticos

En general, las cepas de *E. rhusiopathiae* son sensibles a penicilina, cefotaxima, imipenem, piperacilina, clindamicina y ciprofloxacina.^{271,565,917} Se han comunicado sensibilidades variables para eritromicina, tetraciclinas y cloranfenicol. Trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina y netilmicina tienen escasa actividad contra *E. rhusiopathiae*. Es de importancia terapéutica considerable el hecho de que las cepas de *E. rhusiopathiae* sean intrínsecamente resistentes a vancomicina, teicoplanina y otros glucopéptidos.^{271,666} Se observó que penicilina, imipenem y fluoroquinolonas son los agentes más activos contra este microorganismo. Aun con un tratamiento antibiótico apropiado, la mortalidad asociada con la enfermedad diseminada puede ser de hasta un 35-40%. Esta alta mortalidad es atribuible en gran parte a las complicaciones de la endocarditis.

Especies de *Bacillus* y géneros relacionados

Taxonomía y disección taxonómica del género *Bacillus*

El género *Bacillus* está formado por un grupo grande de bacilos grampositivos, catalasa positivos y facultativos caracterizados por la capacidad para formar esporas en condiciones aerobias (véase lámina en color 14-2B). También se describió un segundo género esporulado, *Sporolactobacillus*, en la edición de 1986 del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*.¹⁶³ Este género contiene una sola especie —*S. inulinus*— bacilo grampositivo esporulado que es catalasa negativo, carece de citocromos y tiene menaquinonas. En 1990, Nimura y cols. describieron un tercer género formador de endosporas, *Amphibacillus*, que contiene la especie *A. xylanus*.⁶³⁷ El género *Amphibacillus* incluye bacilos facultativos que forman endosporas en condiciones aerobias o anaerobias y carecen de citocromos, menaquinonas y actividad de catalasa.

Dado que la descripción del género *Bacillus* pone un énfasis especial en la formación de endosporas como criterio taxonómico, se ha asignado al género durante varias décadas un conjunto extremadamente diverso de especies. Aun dentro de este criterio, también se utilizan como descriptores taxonómicos la forma de las endosporas (esféricas, ovaladas, elipsoides, cilíndricas), su localización dentro de la célula (central, subterminal, terminal) y los cambios inducidos por ellas en la forma celular (células tumefactas o no tumefactas por la espora intracelular). Hasta hace poco, los miembros del género *Bacillus* abarcaban microorganismos aerobios y facultativos que también eran acidófilos, alcalifílos, psicrofílos, mesófilos y termófilos, lo que reflejaba el crecimiento y el metabolismo en un amplio espectro de temperaturas y pH. Algunas especies pueden metabolizar una gran colección de fuentes de carbono, que incluyen metanol, celulosa y quitina. También se observa una variación importante en los aminoácidos que comprenden las uniones cruzadas dentro del peptidoglucano de la pared celular. A nivel genético, la diversidad dentro del género está ejemplificada por el contenido de G + C, que varía de 33 a 69 mol%. Esta heterogeneidad genética es incompatible con la inclusión en un único género según lo definen los métodos taxonómicos bacterianos actuales. No es sorprendente que algunos estudios de secuen-

ciación de rRNA 16S demuestran que el “género *Bacillus*” sea filogenéticamente heterogéneo, representado al menos con ocho líneas filéticas altamente divergentes.^{41,42,632,702,745}

La disección taxonómica polifásica del género *Bacillus* ha conducido a la descripción de muchos géneros nuevos desde 1990. En 1992, las especies que eran termófilas y acidófilas y que contenían ácidos grasos cicloheptanos/ciclohexanos únicos en la membrana celular (*B. acidoterrestris*, *B. cyclohepatnicus* y *B. acidocaldarius*) fueron colocadas en el nuevo género *Alicyclobacillus* (como *A. acidoterrestris*, *A. cyclohepatnicus* y *A. acidocaldarius*) en la familia *Bacillaceae*; se describieron otras especies de *Alicyclobacillus* en 2000 y 2002.^{14,352,590,895,957} En 1993-1994, se propuso el género *Paenibacillus* para incluir ciertas especies de *Bacillus* facultativos, con la transferencia ulterior de otras distintas especies de *Bacillus* y especies “presuntivas de *Bacillus*” al género *Paenibacillus* desde ese momento.^{42,409-411,795} En 1996, Shida y cols. demostraron que dos grupos relacionados dentro del género *Bacillus* —el “grupo *Bacillus brevis*” (10 especies de *Bacillus* existentes) y el “grupo *Bacillus aneurolyticus*” (dos especies de *Bacillus*)— representaban taxones filogenéticamente distintos entre sí y de otros géneros, que incluyen *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Paenibacillus*, *Amphibacillus* y *Alicyclobacillus*.⁷⁹⁴ Estos dos “grupos de *Bacillus*” se convirtieron en el género *Brevibacillus* (que contiene 10 especies) y el género *Aneurinibacillus* (que contiene tres especies), respectivamente. Desde 1996, el examen genético y la reevaluación de otras cepas esporuladas aerobias han conducido a la creación de otros géneros, que incluyen *Virgibacillus*, *Ureibacillus*, *Thermobacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus*, *Filobacillus*, *Geobacillus*, *Sulfobacillus*, *Paralibacillus*, *Salibacillus* y *Lentibacillus*.^{33,234,279,280,318,349,408,412,445,627,642,688,777,836,854,892,932,981} La caracterización fenotípica de estos géneros nuevos es metodológicamente compleja y no es pasible de las técnicas de identificación de rutina. Varias especies familiares se mantienen en el género *Bacillus*, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* y *B. circulans*. Con toda probabilidad, el género *Bacillus* seguirá sufriendo una disección sistemática, lo que conduce a nuevos géneros y especies de bacterias esporuladas (véase lámina en color 14-11).

El género *Bacillus sensu stricto* está compuesto por bacilos grampositivos aerobios que produjeron endosporas en condiciones aerobias. Todas las especies son aerobias o facultativas salvo *B. infernus*, que es estrictamente anaerobia y que fue hallada en el suelo.⁹⁷ Con raras excepciones, las especies de *Bacillus* son mesófilas. El patógeno primario en este grupo es *Bacillus anthracis*, el agente causal del carbunco. Estos microorganismos son catalasa positivos y, con excepción de *B. anthracis* y *B. mycoides*, casi todas las otras especies son móviles a través de flagelos peritricos (antígenos H). La mayoría de las especies distintas de *Bacillus anthracis* son ubicuas en el medioambiente (polvo, suelo, agua, materiales de origen vegetal y animal). Algunas son patógenos reconocidos de animales e insectos. Algunas especies de *Bacillus* se utilizan en la elaboración y producción de antibióticos y vitaminas, en bioensayos y como microorganismos indicadores para la monitorización de la eficacia de desinfectantes y procedimientos de esterilización (p. ej., tratamiento en autoclave, esterilización mediante calor y radiación). Cada vez más especies dentro de este grupo, particularmente *B. cereus*, se reconocen sobre todo en los huéspedes inmunodeprimidos por su potencial para producir importantes infecciones humanas, sobre todo entre los huéspedes inmunodeprimidos. *B. anthracis* pertenece al “grupo *B. cereus*”, que incluye *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*,

pero está más estrechamente relacionado con *B. cereus* sobre la base de la hibridación de DNA, el análisis de secuencias de rRNA 16S y 23S y la presencia de algunas secuencias intergénicas de DNA.^{40,394}

Bacillus anthracis

EPIDEMIOLOGÍA DEL CARBUNCO

El carbunco, la enfermedad clásica causada por *B. anthracis*, es fundamentalmente una afección de los animales herbívoros; los seres humanos se infectan por contacto con animales y productos animales infectados.⁸⁷⁷ En los Estados Unidos, se la erradicó por el uso amplio de vacunas humanas y animales eficaces desde fines de la década de 1930, los adelantos de los procedimientos higiénicos utilizados en las fábricas que procesan productos animales, y el mayor uso de fibras sintéticas como alternativas a los cueros, pieles y pelos animales. Sin embargo, como las esporas de *B. anthracis* son altamente resistentes a las condiciones ambientales adversas y como es muy difícil asegurarse de que el microorganismo ha sido verdaderamente erradicado de regiones que antes eran endémicas, se debe mantener un alto índice de sospecha ante la aparición súbita de una enfermedad clínicamente compatible. El agente causal, *B. anthracis*, se mantiene en el suelo como endosporas resistentes y, así, puede seguir siendo infeccioso durante años. Tradicionalmente, el carbunco suele definirse en términos de su modo de adquisición. El **carbunco industrial** se refiere a la adquisición del microorganismo por los individuos empleados en el procesamiento de cueros, lana, pelo o hueso de animales. El **carbunco no industrial** alude a la adquisición de los microorganismos por el contacto estrecho con animales infectados o sus esqueletos. La adquisición industrial se asocia con las formas cutánea y pulmonar de la enfermedad, mientras que la no industrial se vincula a carbunco orofaríngeo y gastrointestinal y a carbunco cutáneo.

Varios países, como Japón, la ex Unión Soviética, el Reino Unido, Irak y los Estados Unidos también han explotado y desarrollado el uso de *B. anthracis* como agente de guerra biológica.^{156,514} En 1992, los soviéticos admitieron sus esfuerzos continuos para transformar el carbunco en un arma en las décadas anteriores y divulgaron que en 1979 la liberación accidental de esporas de un laboratorio militar en Sverdlovsk produjo más de 77 casos de carbunco inhalatorio, con más de 66 muertes.¹⁴⁶ La utilización potencial de *B. anthracis* para bioterrorismo fue constatada en los Estados Unidos durante los últimos cuatro meses de 2001, cuando se entregaron esporas de *B. anthracis* en cartas y paquetes despachados a localidades del interior de ese país. Estos incidentes condujeron a 11 casos de carbunco inhalatorio y 11 casos de carbunco cutáneo.

Los incidentes llevaron a la promulgación de la legislación antiterrorista en los Estados Unidos y al desarrollo de la Iniciativa de Preparación para el Bioterrorismo. A través de esta iniciativa, los CDC, junto con la Association of Public Health Laboratories (APHL), varias agencias federales (el Federal Bureau of Investigation [FBI] y el Departamento de Defensa) y los laboratorios de salud pública de varios estados, establecieron la Laboratory Response Network (LRN). En la LRN están integrados los laboratorios de microbiología clínica de todo el país en una red de cuatro niveles —desde el nivel A hasta el nivel D— de acuerdo con la capacidad de exámenes diagnósticos e instalaciones de seguridad de los laboratorios. La mayoría de los laboratorios clínicos hospitalarios que tienen capacidad de microbiología son miembros de nivel A de la LRN.¹⁴⁵ En este nivel, los laboratorios participan en la detección temprana de los agentes microbianos de bioterrorismo y

pueden realizar e interpretar las pruebas bioquímicas observacionales y simples para descartar agentes potenciales de bioterrorismo. Si las pruebas de detección sistemática sugieren que una cepa dada es un posible patógeno de bioterrorismo, se la remite a un laboratorio de nivel B o más alto. En el cuadro 14-5 se detallan las pruebas de detección sistemática de nivel A para *B. anthracis* que se tratan en la sección "Aislamiento e identificación" más adelante.

FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. ANTHRACIS*

B. anthracis produce toxinas compuestas por tres proteínas distintas: antígeno protector (PA), factor de edema (EF) y factor letal (LF). Las cepas virulentas también están encapsuladas. Los genes estructurales de PA, EF y LF –*pagA*, *cya* y *lef*, respectivamente– residen en un plásmido denominado pXO1. Estos genes son no contiguos dentro de un área de 30 kb sobre el plásmido pXO1. Otro gen pXO1 denominado *atxA* codifica una proteína reguladora de acción *trans* que activa la transcripción de *pagA*, *cya* y *lef*.^{196,612} PA es sintetizada y secretada por el microorganismo y se une a receptores no identificados sobre células diana, donde sufre escisión proteolítica. Se libera un fragmento aminoterminal de 20 kDa y el fragmento de 63 kDa restante se polimeriza con otros fragmentos similares para formar un heptámero de forma anular, que forma un poro a través de la membrana celular.^{257,948} Cada monómero en el heptámero se une a EF o LF, lo que les permite entrar en la célula diana. Estas tres proteínas actúan luego en combinaciones binarias; ninguna tiene actividad tóxica por sí misma. Cada monómero de PA de 63 kDa puede unirse a una molécula de EF o LF.³⁹¹ EF y PA forman un complejo denominado **toxina de edema (ET)**, que tiene actividad de adenilato ciclasa. LF y PA forman un complejo llamado **toxina letal (LT)**, que es el principal factor de virulencia de *B. anthracis*. En conjunto, ET y LT aumentan las concentraciones intracelulares de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP), inhiben la fagocitosis bacteriana y bloquean la explosión oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares. En los macrófagos, LT inhibe la síntesis macromolecular, promueve la apoptosis y actúa como una proteasa al hidrolizar proteincinasas involucradas en la transducción de señales intracelulares. La interrupción de esta vía de señalización conduce a la inactivación de factores de transcripción en el núcleo celular. La expresión de los genes de las toxinas y la producción de toxinas son aumentados específicamente a nivel genético por CO₂ y el crecimiento a 35-37 °C.⁴⁹⁸ El crecimiento del microorganismo en estas condiciones provoca aumentos de cuatro a seis veces en la transcripción de genes de toxina y en la síntesis de toxinas.^{612,811}

Las cepas virulentas de *B. anthracis* también están encapsuladas. Los genes para la producción de la cápsula residen en un segundo plásmido denominado pXO2 y consiste en tres genes que codifican tres proteínas vinculadas con la síntesis capsular (*capB*, *capC*, *capA*) y un cuarto gen regulador (*acpA*). Las proteínas tienen pesos moleculares de 44, 16 y 46 kDa, respectivamente, y están asociadas con la membrana. Un quinto gen pXO2, *dep*, codifica otra proteína de 51 kDa que hidroliza el material capsular y genera péptidos de menor peso molecular.⁸⁹⁸ La cápsula propiamente dicha es un polímero de cadenas de α -péptido con uniones γ de 50-100 residuos de ácido D-glutámico y contribuye a la virulencia al inhibir la fagocitosis de los microorganismos.^{573,612} Al igual que la producción de toxina, la síntesis de material capsular en *B. anthracis* aumenta por las concentraciones elevadas de CO₂ y bicarbonato atmosféricas tanto in vivo como in vitro.⁶¹²

PRESENTACIONES CLÍNICAS DEL CARBUNCO

El carbunco humano puede ser dividido en cuatro formas clínicas, según el modo de adquisición del microorganismo.^{510,612} El **carbunco cutáneo** representa el 95-99% de casos en todo el mundo y es el resultado del contacto mucoso directo con animales infectados o sus productos (p. ej., pelo o cueros), suelo que contiene el microorganismo o exposición a esporas. En general, las lesiones ocurren en áreas expuestas de la piel (p. ej., manos, brazos, cuello y rostro). Después de un período de incubación de 2 a 5 días, aparece una pápula inicial en el sitio de inoculación. Esta lesión está rodeada por un área de edema y eritema debido al crecimiento del microorganismo y a la elaboración local de toxina de edema.⁵⁷⁵ La lesión evoluciona con rapidez a una vesícula o ampolla que tiene 1 a 3 cm de diámetro y el líquido dentro de la vesícula se torna negro por la hemorragia dentro del área. Finalmente la lesión se ulcera y aparece una escara central de fondo negro con edema circundante. A menudo, pueden aparecer pequeñas lesiones satélites similares a perlas que rodean la escara central. Las escaras características del carbunco cutáneo son indolores, aunque la reacción edematosa circundante puede ser dolorosa. Se puede observar una linfadenopatía dolorosa localizada o generalizada, según la extensión y la gravedad de la infección inicial y también pueden presentarse síntomas generales (p. ej., fiebre, malestar general, cefalea). La mortalidad asociada con el carbunco cutáneo no tratado es de alrededor del 10-20%.

El **carbunco pulmonar o inhalatorio** es el resultado de la inhalación de endosporas. Las esporas alcanzan los pulmones, donde son eliminadas por los macrófagos del sistema reticulo-endotelial que se encuentran en los ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos. La infección activa ocurre en los ganglios linfáticos que drenan los pulmones más que en los pulmones propiamente dichos.⁶⁷⁶ Las esporas germinan para formar células bacterianas vegetativas dentro de los macrófagos. Esto conduce a edema y necrosis hemorrágica del mediastino, que se aprecia en las radiografías de tórax como un ensanchamiento mediastínico pronunciado. Desde el área subesternal, los microorganismos invaden el espacio pleural y provocan derrame pleural hemorrágico. Los macrófagos que albergan los microorganismos son destruidos y las bacterias vegetativas salen a la circulación general, donde siguen multiplicándose. La diseminación hematogena siembra los sitios distantes del cuerpo, entre ellos el tubo digestivo y el sistema nervioso central. La mayoría de los pacientes no sobreviven el tiempo suficiente como para manifestar signos y síntomas de meningitis; los pacientes suelen estar lúcidos hasta que ocurre el shock sistémico, lo que conduce a coma y muerte.^{508,859} El período de incubación del carbunco inhalatorio es de 1 a 3 días, seguido del inicio súbito de síntomas. Estos son fiebre y escalofríos, tos seca no productiva, dolor subesternal, disnea y náuseas con vómitos. En las radiografías de tórax se pueden observar infiltrados, derrames pleurales y ensanchamiento mediastínico. La afectación gastrointestinal produce dolor abdominal, hemoatemesis y melenas. La mortalidad asociada con esta forma de la enfermedad excede el 80-90% si se deja sin tratamiento.

El **carbunco orofaríngeo** y el **carbunco gastrointestinal** se adquieren por la ingestión de alimentos mal cocidos que contienen esporas o bacilos vegetativos. Ambas formas de infección pueden volverse sistémicas y, al igual que la forma pulmonar, tienen una mortalidad elevada si no son tratadas. El período de incubación del carbunco gastrointestinal es de 2 a 7 días. Los síntomas comienzan con fiebre y náuseas con vómitos sanguinolentos. Luego aparece dolor abdominal y diarrea

sanguinolenta, seguidos de toxemia fulminante, cianosis, shock y muerte (véase lámina en color 14-2C). En los casos mortales, la muerte suele producirse dentro de los 2 a 5 días del inicio. La afectación orofaríngea es sugerida por dolor y edema cervical y bucal. Se pueden observar escaras en la faringe posterior, las áreas amigdalinas o el paladar duro. La progresión de la infección conduce a disfagia, dolor faríngeo intenso y linfadenopatía cervical. La muerte es el resultado de una sepsis fulminante.

TRATAMIENTO DEL CARBUNCO

Se pueden utilizar distintos agentes para el tratamiento del carbunco. La penicilina en altas dosis (4 millones de unidades cada 4-6 horas) es el fármaco de elección. En los pacientes alérgicos a la penicilina, se puede utilizar ciprofloxacina (400 mg por vía intravenosa cada 8-12 horas) o doxiciclina (200 mg por vía intravenosa cada 8-12 horas). Ante brotes y durante los acontecimientos recientes de 2001, relacionados con bioterrorismo, se administró profilaxis con ciprofloxacina (500 mg por vía oral, dos veces por día) o doxiciclina (100 mg por vía oral, dos veces por día) a individuos potencialmente expuestos durante 6 semanas. Aunque la mayoría de los casos de carbunco inhalatorio son mortales, el tratamiento de las infecciones cutáneas casi siempre es eficaz.

PREVENCIÓN DEL CARBUNCO

Existen vacunas para el carbunco animal y humano.^{260,388} La vacuna animal es en realidad un preparado de esporas de una cepa atenuada de *B. anthracis* que produce las tres proteínas de la toxina, pero carece de la cápsula debido a la ausencia del plásmido pXO2. La vacuna humana autorizada para uso en los Estados Unidos es BioThrax® (antes Vacuna contra el Carbunco Adsorbida [Anthrax Vaccine Adsorbed, AVA], Bioport, Lansing, MI), una fórmula acelular preparada del filtrado de un cultivo de una cepa toxigénica, no encapsulada y avirulenta de *B. anthracis* (cepa V770-NP-1-R). Este filtrado de cultivo contiene PA, LF y EF, y PA es el componente principal. La protección de los seres humanos contra el carbunco por esta vacuna requiere múltiples dosis iniciales (tres inoculaciones subcutáneas a intervalos de 2 semanas seguidas de inyecciones adicionales a los 6, 12 y 18 meses), e inmunizaciones anuales de refuerzo para mantener un nivel de anticuerpos protector. En general, la vacuna para animales produce títulos más altos y más duraderos de anticuerpos protectores que la vacuna humana. Esto puede deberse al aumento de la respuesta inmunitaria por la producción continua de PA y otros antígenos protectores por la cepa atenuada o por la participación de la inmunidad celular en respuesta a los microorganismos atenuados pero no al PA purificado hallado en la vacuna humana.³⁹² La vacuna AVA se recomienda para quienes trabajan directamente con *B. anthracis* en el laboratorio, los que trabajan con productos animales (p. ej., cueros y pieles) importados de áreas de endemidad del carbunco, los que trabajan con animales y sus productos dentro de las regiones endémicas y el personal militar desplegado a regiones de alto riesgo del mundo. Además, la vacuna puede utilizarse como profilaxis preexposición para las personas con riesgos cuantificables de exposición como el personal de laboratorio que maneja muestras ambientales, por ejemplo, polvos, los que realizan pruebas confirmatorias para *B. anthracis* en laboratorios LRN de nivel B y superiores y los que trabajan en áreas contaminadas luego de un ataque terrorista.¹⁴⁶

Bacillus cereus

FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. CEREUS*

Al igual que otras especies de *Bacillus*, *B. cereus* se encuentra en el suelo y también puede aislarse en la paja y el arroz. Esta especie es fenotípica y genotípicamente similar a las especies de *Bacillus* relacionadas, que incluyen *B. anthracis*, *B. mycoides* y *B. thuringiensis*. Algunos estudios genéticos y quimi-taxonómicos han sugerido que *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* pertenecen a la misma especie, con las características diferenciadoras que las separa funcionalmente de ellas de ser transmitidas por plásmidos y transmisibles.^{39,40,402} Por ejemplo, la única diferencia entre *B. cereus* y *B. thuringiensis* es la presencia de plásmidos que codifican las toxinas insecticidas en la última. *B. cereus* produce varios factores de virulencia potenciales, además de las toxinas asociadas con infecciones gastrointestinales (véase más adelante) y se cree que estos factores desempeñan un papel en las infecciones no gastrointestinales. Estos factores de virulencia incluyen tres hemolisinas y tres fosfolipasas.^{48,356,801} Las hemolisinas son cereolisina, hemolisina II y hemolisina III, respectivamente. La **cereolisina** es similar a la estreptolisina O por ser una proteína termolábil que es activada por tioles e inhibida por colesterol. La **hemolisina O** es una toxina hemolítica que también es una toxina letal en ratones y la **hemolisina III** produce lisis osmótica de eritrocitos por la formación de poros transmembrana. Las fosfolipasas incluyen fosfatidilinositol hidrolasa, fosfatidilcolina hidrolasa y una esfingomielinasa. Las fosfolipasas escinden las porciones lipídicas que sirven para fijar las proteínas de la superficie celular, comprometen la integridad de la membrana celular y defienden las capacidades regenerativas de las células lesionadas. Las cepas de *B. cereus* también producen tres β -lactamasas, colagenasas extracelulares y proteasas ligadas a la membrana.^{569,571,653,806}

GASTROENTERITIS POR *B. CEREUS*

B. cereus es responsable de la enfermedad transmitida por alimentos debido a la formación de exotoxinas. Como esta enfermedad no es comunicable, no se cuenta con cifras exactas sobre incidencia y prevalencia para la mayor parte del mundo. Entre 1973 y 1985, los porcentajes de enfermedad transmitida por alimentos asociada con *B. cereus* variaron del 0,7% en Inglaterra y Gales hasta el 17,8% en Finlandia.⁵⁰⁰ La incidencia en los Estados Unidos parece ser mucho más baja, y sólo el 1,3% de los casos de intoxicación alimentaria bacteriana fueron atribuibles a *B. cereus* entre 1972 y 1982. Los productos alimenticios se contaminan desde el medioambiente y las esporas altamente resistentes pueden superar la pasteurización y la exposición a radiación γ . La capacidad de algunas cepas de *B. cereus* para crecer a bajas temperaturas (4-7 °C) explica parcialmente su presencia en productos lácteos pasteurizados y refrigerados. Diversos productos alimenticios pueden ser contaminados con células vegetativas o esporas de *B. cereus*, como pastas, arroz, lácteos, granos, especies, verduras, carne, pollo y mariscos. Los alimentos, los productos lácteos y los suplementos y fórmulas para lactantes preparados en el hospital o la farmacia contaminados representan un riesgo para los pacientes hospitalizados, sobre todo los niños y los enfermos inmunosuprimidos.

Se sabe que las cepas de *B. cereus* productoras de enterotoxina causan gastroenteritis aguda autolimitada en los seres humanos, casi siempre luego de la ingestión de alimentos contaminados.⁵⁰⁰ Este síndrome sigue dos formas clínicas, según el tipo de toxina producida por los microorganismos presentes en el alimento sospechoso. La enfermedad de corta incubación (o

la enfermedad emética) se caracteriza por el inicio de los síntomas 1 a 6 horas después de la ingestión del alimento contaminado, con vómitos y cólicos abdominales. En general, los síntomas ceden 10-24 horas después del comienzo. La exotoxina termoestable responsable de estas cepas de *B. cereus* es un dodecadepsipéptido denominado **cereulida**, que tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa.^{4,6,7} Esta molécula es estable en presencia de ácidos, álcalis, proteasas y calor; es no antigénica y requiere el uso de bioensayos o espectrometría de masa para la detección de la toxina.^{27,380} La cereulida, que se produce durante la fase estacionaria de crecimiento y se asocia principalmente con el serotipo flagelar H-1,⁶ provoca hinchazón de las mitocondrias y desacople de la fosforilación oxidativa.⁶⁰⁷ Los alimentos incriminados asociados con el tipo emético de enfermedad incluyen platos de arroz oriental frito, crema y productos lácteos, pastas y fórmulas para lactantes reconstituidas.

La intoxicación alimentaria por *B. cereus* de incubación prolongada ocurre 8 a 16 horas luego de la ingestión y se caracteriza predominantemente por el inicio de diarrea acuosa profusa, náuseas, tenesmo y cólicos abdominales hipogástricos. En general, los síntomas ceden después de 12 a 36 horas. Cuatro enterotoxinas termolábiles diferentes se asocian con esta presentación clínica, que incluyen dos complejos proteicos (hemolisina BL [HBL] y enterotoxina no hemolítica [NHE]) y dos proteínas enterotóxicas (enterotoxina T y citotoxina K).^{5,70,357,560,752} HBL y NHE están compuestas por tres proteínas cada una, y los loci genéticos que codifican HBL o NHE se organizan en operones individuales y separados. HBL es una exotoxina que tiene actividad hemolítica y está compuesta por tres proteínas: un componente de fijación de 35 kDa y dos proteínas (L1, 36 kDa y L2, 45 kDa) que tienen propiedades citolíticas y dermonecroticas.⁶⁹ El principal componente de NHE es una proteína antigénica de 45 kDa que se asocia con proteínas de 39 y 105 kDa. Esta toxina tripartita es dermonecrotica y citotóxica, y altera la permeabilidad de la membrana.⁵⁶¹ Otros investigadores han caracterizado y comunicado sobre otras enterotoxinas de distintas cepas de *B. cereus*, pero HBL y NHE se consideran las toxinas responsables de la enfermedad diarreica por *B. cereus* resultante de intoxicación alimentaria.⁸⁰² Los alimentos asociados con este tipo de enfermedad incluyen carne y platos de verduras, tortas, salsas y productos lácteos. Algunas cepas de *B. cereus* pueden producir tanto la toxina emética como los complejos de enterotoxinas. La intoxicación asociada con *B. cereus* y sus toxinas puede evitarse mediante la cocción suficiente de los alimentos, sobre todo las carnes y el almacenamiento refrigerado correcto. *B. thuringiensis* también ha sido aislado en asociación con brotes de gastroenteritis y su citotoxicidad es similar a la causada por *B. cereus* enterotoxigénico.⁴⁴⁸ En raras ocasiones, otras especies de *Bacillus* (p. ej., *B. subtilis*, *B. licheniformis*) también causan gastroenteritis e intoxicación alimentaria.⁵⁵⁹

Infecciones oportunistas por especies de *Bacillus*

Debido a su ubicuidad en el medioambiente, el aislamiento de especies de *Bacillus* en muestras clínicas se ha considerado muy a menudo una contaminación importante. Sin embargo, la frecuencia creciente de comunicaciones en la bibliografía de especies de *Bacillus* como agentes de enfermedad en huéspedes inmunodeprimidos sugiere que estos microorganismos no deben ser descartados como contaminantes en todos los casos. Las infecciones graves por especies de *Bacillus* se han asociado con procedimientos quirúrgicos, inmunosupresión, heridas traumáticas, quemaduras, hemodiálisis y abuso de drogas parenterales. Las cepas aisladas en infecciones no gastrointes-

tinales producen distintos factores presuntivos de virulencia, como hemolisinas, exotoxinas necrosantes y fosfolipasas. Los análisis de grandes series de casos que involucran infecciones importantes por *Bacillus* indican su participación en los síndromes clínicos explicados antes.

BACTERIEMIA Y ENDOCARDITIS

Muchos de los pacientes en estos estudios eran consumidores de drogas intravenosas, tenían colocados catéteres vasculares centrales o periféricos permanentes o estaban inmunosuprimidos por cáncer o quimioterapia.^{52,330,620} La endocarditis causada por especies de *Bacillus* es una afección rara, pero en casos de abuso de drogas parenterales (habitualmente heroína) es una complicación bien reconocida.^{134,815,845} En estos casos, es notable que los microorganismos provengan de agujas y jeringas contaminadas o de la heroína propiamente dicha. En estos pacientes, la infección suele comprometer la válvula tricúspide, y se observan embolias pulmonares sépticas en las radiografías de tórax. Los consumidores de drogas que tienen una endocarditis por *Bacillus* presentarán hallazgos clínicos compatibles y múltiples hemocultivos positivos por especies de *Bacillus* poco tiempo después de la administración de drogas parenterales. También se puede presentar esta endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas protésicas o marcapasos.¹³⁴ La bacteriemia por *Bacillus* también puede reflejar contaminación hospitalaria de catéteres intravasculares implantados.^{91,406} En estos casos, la extracción del material duro del catéter suele eliminar los microorganismos del torrente circulatorio. La bacteriemia por especies de *Bacillus* también puede ocurrir en pacientes con neutropenia grave.

INFECCIONES EN HUÉSPEDES INMUNODEPRIMIDOS

Se observaron infecciones graves por *Bacillus* en pacientes inmunodeprimidos, entre ellas infecciones del sistema nervioso central (meningitis, meningoencefalitis, absceso encefálico), infecciones de las vías respiratorias bajas con empiema, bacteriemia primaria, infecciones de heridas penetrantes, infecciones posquirúrgicas, sepsis refractaria y quemaduras.^{13,36,155,331,414,579,617,695,757,888,896} Las infecciones del sistema nervioso central pueden ocurrir como resultado de anestesia espinal, reparación de fistulas, propagación desde un foco contiguo de infección (p. ej., otitis media, mastoiditis) o por derivaciones ventriculoperitoneales contaminadas.⁵⁸⁰ Las infecciones pulmonares, que incluyen neumonitis necrosante, traqueobronquitis pseudomembranosa, neumonía e insuficiencia respiratoria aguda con sepsis ocurrieron sobre todo en pacientes con leucemia y cáncer hepático, y en recién nacidos prematuros.^{71,186,454,847} También se han comunicado infecciones cutáneas no producidas por *Bacillus anthracis* en pacientes inmunodeprimidos.⁵⁶⁶ Las razones para la inmunosupresión en estos pacientes fueron alcoholismo importante, leucemia, linfoma, quimioterapia de inducción, meningioma, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, quemaduras graves, diabetes, enfermedad grave por inmunodeficiencia y SIDA.^{132,341,654,847} En general, la evolución de los pacientes que presentan infecciones sistémicas por *Bacillus* es mala y refleja una inmunosupresión generalizada a causa de la enfermedad subyacente y la quimioterapia citotóxica utilizada para el tratamiento. Las infecciones por *Bacillus* en los individuos inmunocompetentes son raras. Por ejemplo, Latsios y cols. describieron un caso de peritonitis debido a *Bacillus cereus* como resultado de la rotura de un absceso hepático en una mujer de 72 años antes sana.⁵¹⁹

INFECCIONES OCULARES

La endoftalmitis (una infección del humor acuoso y el vítreo del ojo) por especies de *Bacillus* ocurre luego de heridas oculares penetrantes o como consecuencia de la siembra bacteriana durante episodios bacteriémicos.^{16,90,205,404,772,885} En aquellos que tienen heridas penetrantes o cuerpos extraños retenidos dentro de la órbita, el edema periorbitario y la inflamación corneal conducen a una infección del vítreo que se propaga hasta la retina, lo que provoca pérdida de la agudeza visual 12 a 24 horas después de la lesión. En general, se presenta fiebre y leucocitosis. La endoftalmitis debida a especies de *Bacillus* puede complicarse por la propagación de los microorganismos hasta sitios anatómicos contiguos, como el encéfalo y el sistema nervioso central.⁸⁰ Los pacientes con endoftalmitis de origen hematógeno a menudo tienen antecedentes de uso de drogas parenterales. También se han comunicado raros casos luego de la cirugía de cataratas.⁷⁴⁷ Este síndrome sigue una evolución clínica rápida que conduce a la pérdida de la visión y la enucleación del ojo. Como estas infecciones son rápidamente destructivas, se requiere un alto índice de sospecha y una terapia intensiva (p. ej., clindamicina y gentamicina administradas por vía sistémica e intraocular). En el laboratorio clínico, las tinciones de Gram de material aspirado de muestras de humor acuoso y vítreo deben interpretarse con cuidado, y el aislamiento de una especie de *Bacillus* en estas muestras debe comunicarse al médico y no debe ser descartado como contaminante. Además de la endoftalmitis, se han comunicado otras infecciones oculares (p. ej., queratitis) asociadas con especies de *Bacillus* vinculadas al uso de lentes de contacto.^{230,682} La evolución rápidamente destructiva de las infecciones intraoculares por *Bacillus* ha sido atribuida a la producción de toxinas y enzimas destructivas por los microorganismos causales.¹²⁶

INFECCIONES MUSCULOESQUELÉTICAS

Algunas especies de *Bacillus* también pueden causar distintas infecciones musculoesqueléticas, como osteomielitis aguda y crónica, fascitis necrosante y celulitis crepitante.^{201,617,779} Nuevamente, los individuos infectados a menudo han sido consumidores de drogas intravenosas, presentaron neoplasias hematológicas subyacentes o recibieron tratamientos inmunosupresores. En los adictos a drogas intravenosas, se informó una osteomielitis vertebral aguda como resultado de la propagación hematógena; las drogas o las jeringas contaminadas son las fuentes probables de los microorganismos. Se ha comunicado fascitis necrosante en los pacientes con leucemia, drepanocitosis y síndrome mielodisplásico.^{617,815} Esta infección puede ser bastante destructiva para los tejidos, se asemeja a la gangrena gaseosa por clostridios y a menudo requiere la amputación de las extremidades afectadas. Se han informado infecciones graves (infección de heridas postraumáticas y posoperatorias, infección de tejidos blandos, fascitis necrosante, osteomielitis) causadas por especies de *Bacillus* en individuos que habían sufrido un traumatismo grave por accidentes automovilísticos y de motocicleta o heridas por armas de fuego.^{502,960} Las especies de *Bacillus* también pueden producir infecciones importantes en los pacientes quemados. La destrucción tisular que se observa con las infecciones graves de heridas causadas por especies de *Bacillus* puede estar relacionada en parte con la producción de distintas enzimas extracelulares nocivas que tienen propiedades histológicas e histotóxicas (p. ej., hemolisinas, fosfolipasas, proteasas).

INFECCIONES HOSPITALARIAS

Se han comunicado brotes de gastroenteritis por *Bacillus* en instituciones sanitarias y en otras circunstancias institucionales. En estos casos, los alimentos implicados han sido estofados de vaca, arroz frito, pollo y pavo procesado. Otros brotes hospitalarios de infecciones por *Bacillus* han involucrado una propagación de fuente común desde reservorios contaminados en el medioambiente.⁸⁸⁴ Estas fuentes han incluido hemodializadores contaminados, broncoscopios, reservorios de Omayá, balones de ventilación manual, inyectables de múltiples unidades, y pañales, guantes y vendajes quirúrgicos contaminados.^{194,323,346,723,908,983} En 2001, la pesquisa epidemiológica de unaseudobacteriana en una unidad de cuidados intensivos neonatales causada por *Paenibacillus macerans* condujo al hallazgo de frascos de hemocultivo contaminados.⁶⁴³ También se han aislado especies de *Bacillus* en líquidos peritoneales en casos de peritonitis asociada con diálisis peritoneal intrahospitalaria.⁶⁸¹ La investigación de pseudobacteriemias causadas por especies de *Bacillus* también estableció que la contaminación provenía de agujas de instrumentos radiométricos para hemocultivos y su secuencia temporal ha sido relacionada con modificaciones ambientales, como la construcción de un hospital.⁵⁴⁸

Seguridad en el laboratorio, recolección de muestras y procesamiento

Si se sospecha carbunco, se debe notificar de inmediato al laboratorio de salud pública y a los CDC. Las muestras que pueden ser recogidas son material de lesiones cutáneas, hemocultivos y cualquier otro tejido potencialmente infectado. La seguridad del laboratorio es de suma importancia cuando se trabaja con cualquier material que se considera que contiene *B. anthracis*. Todas las muestras y los cultivos deben ser examinados y procesados con cuidado en un gabinete de seguridad biológica (cuadro 14-5). Se deben tomar todas las precauciones para reducir al mínimo la formación de aerosoles desde el material potencialmente infectante. El personal debe utilizar sacos o batas protectores, máscaras y guantes cuando manipula las muestras. Este material debe ser descartado o esterilizado en autoclave antes de su reutilización. Después de completar el procesamiento de las muestras y la inoculación de los medios en placa y tubo, se deben desinfectar todas las superficies del gabinete de seguridad biológica y de las áreas expuestas con hipoclorito de sodio al 5% y todos los instrumentos utilizados para el procesamiento de las muestras deben ser esterilizados en la autoclave. Además, el personal que trabaja con suspensiones de esporas o esqueletos y tejidos animales contaminados debe estar inmunizado apropiadamente.

Las muestras para el aislamiento de *B. anthracis* deben reflejar el modo de adquisición y la anatomía patológica consiguiente de la infección. Para el diagnóstico de carbunco cutáneo, se deben recoger muestras con hisopo de los líquidos serosos obtenidos de la parte inferior de la superficie de la escara junto con los hemocultivos. Cuando se sospecha carbunco inhalatorio se requiere la recolección de muestras de esputo y hemocultivos para el diagnóstico. Las muestras de aspiración gástricas y de heces deben remitirse como auxiliares para el diagnóstico del carbunco gastrointestinal, junto con los hemocultivos.

Ante la sospecha de gastroenteritis por *B. anthracis*, se deben recoger alimentos que estén vinculados epidemiológicamente con la enfermedad. Como el microorganismo puede estar presente en las deposiciones de los individuos sanos y no existe ningún sistema fácil de tipificación en los laboratorios clínicos, el aislamiento de *B. cereus* de las deposiciones de pacientes enfermos no proporciona las pruebas suficientes para

adjudicarles un papel etiológico. Sin embargo ante brotes puede ser útil aislar el microorganismo en las heces de los individuos siempre que se demuestre que las muestras similares de controles adecuados apareados no contienen el microorganismo. Se pueden enviar muestras de los alimentos implicados y de las heces de los pacientes a un laboratorio de referencia (p. ej., el laboratorio del departamento de salud pública o a los CDC) para la confirmación de la identidad y la tipificación de la cepa. Se debe recoger una muestra de heces de volumen suficiente (25-50 g) en un recipiente estéril con tapa hermética. Se deben enviar los alimentos, las muestras de heces o las cepas aisladas al departamento de salud estatal o a los CDC después de la notificación previa de los casos de brotes y de las aclaraciones correspondientes a las mismas oficinas.

Aislamiento e identificación de especies de *Bacillus*: el "grupo *Bacillus cereus*" (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*)

Los miembros del género *Bacillus* aislados en muestras clínicas suelen crecer bien y esporular en agar sangre de carnero y agar chocolate incubados a 37 °C en condiciones aerobias. La esporulación puede ser estimulada mediante el subcultivo en agar nutrientes con suplemento de MnSO_4 (concentración final de 5 µg/mL) e incubación ulterior. En las tinciones de Gram de los hemocultivos, otros medios de caldo y en ocasiones medios sólidos, las especies de *Bacillus* y otras especies relacionadas pueden aparecer como bacilos gramnegativos, lo que conduce a la impresión errónea de que el microorganismo es un bacilo gramnegativo no fermentador.⁸⁹ La inoculación de medios de caldo y la preparación de un frotis teñido con Gram después de algunas horas de crecimiento pueden poner en evidencia su naturaleza grampositiva. Las esporas intracelulares y libres de células no se tiñen con la técnica de Gram, pero pueden visualizarse con la tinción de verde de malaquita. Se hace un frotis del microorganismo en un portaobjetos, se lo fija con calor y se lo tiñe con verde de malaquita al 10% durante 45 minutos. Se lo lava, se lo contratiñe con safranina durante 30 segundos y se lo observa al microscopio con objetivo de inmersión en aceite. Las esporas aparecen verdes, mientras que las células vegetativas se tiñen de rosa a rojo (véase lámina en color 14-2D).

En SBA, las colonias de *B. cereus* y *B. thuringiensis* suelen ser grandes, con una textura mate o granular, y la mayoría de las cepas son β -hemolíticas (véase lámina en color 14-2H). Estas colonias tienen una consistencia untuosa con bordes lisos, festoneados o fimbriados. Por el contrario, las colonias de *B. anthracis* suelen ser más pequeñas, blanco grisáceas, de superficie rugosa, no hemolíticas y tienen una consistencia viscosa, de modo que cuando las colonias son tocadas con un ansa de inoculación, forman picos permanentes semejantes a claras de huevo batidas (véase lámina en color 14-2E, F y G). Bajo el microscopio de disección, muchas excrecencias que consisten en cadenas filamentosas de bacilos rodean a la colonia de *B. anthracis*, lo que le da el aspecto de una "cabeza de Medusa" de la mitología griega. Las colonias de *B. mycoides* son planas, no hemolíticas y tienen un aspecto sinuoso o rizoide que se asemeja a algunos clostridios. En los frotis teñidos con Gram, las células del grupo de *B. cereus* (incluido *B. anthracis*) son bacilos grampositivos de 1,2 a 1,4 µm de ancho que se presentan solos o en cadenas. Las células individuales tienen extremos cuadrados o cóncavos. Se pueden observar esporas ovaladas central o subterminalmente, y las células no están tumefactas en las áreas donde se localiza la espora. Con el microscopio de contraste de fase de los frotis de *B. thuringiensis* pueden observarse cristales adyacentes a la espora (cristales paraespora).

Estos cristales, que consisten en la toxina insecticida de producción natural, también pueden observarse mediante la tinción de un frotis del microorganismo con verde de malaquita. Todos los miembros del grupo de *B. cereus* producen lecitinasa en agar yema de huevo e hidrolizan la caseína, el almidón y la gelatina. *B. thuringiensis* y algunas cepas de *B. cereus* y *B. mycoides* son arginina dihidrolasa positivas; *B. anthracis* es arginina dihidrolasa negativa. No se produce indol y la mayoría de las cepas reducen nitrato a nitrito. *B. anthracis* también es inmóvil en los preparados de gota gruesa o en medios semisólidos para evaluar motilidad, mientras que *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides* son móviles. Además, las cepas de *B. anthracis* a menudo son encapsuladas en los tejidos infectados, como se demuestra con un preparado húmedo en tinta china o con la tinción de la cápsula de M'Fadyean. La formación del material capsular puede ser estimulada mediante el subcultivo del microorganismo en agar nutrientes que contiene NaHCO_3 al 0,7% e incubación a 37 °C durante toda la noche. *B. anthracis* también puede ser identificado y diferenciado en forma definitiva de otras especies de *Bacillus* mediante análisis de ácidos grasos cromatográficos de células enteras o mediante la detección de susceptibilidad al γ -bacteriófago.⁵²¹ En el cuadro 14-4 se presentan las características bioquímicas para la identificación de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*.

Como se mencionó, *B. anthracis* es uno de varios posibles agentes de bioterrorismo. Los CDC y los miembros de la LRN han determinado que todas las especies de *Bacillus* aisladas en el laboratorio clínico deben ser evaluadas para la detección del posible *B. anthracis*. Los agentes que se ajustan a los criterios de detección sistemática son remitidos a los laboratorios de salud pública para la identificación definitiva. En general, estas características incluyen la tinción de Gram y la morfología de las colonias, la presencia o ausencia de hemólisis, la producción de catalasa y la determinación de motilidad. En los laboratorios de derivación, la identidad de las cepas presuntivas de *B. anthracis* se confirma mediante análisis de ácidos grasos de células enteras, sensibilidad a γ -bacteriófagos o métodos de PCR en tiempo real. En el cuadro 14-5 se presentan las características de laboratorio de nivel A para la detección sistemática de cepas de *Bacillus* para posible *B. anthracis*. Otras características que pueden ser útiles son la tinción de la cápsula (realizada directamente en el material clínico) y una prueba de β -lactamasa. La mayoría de las especies de *Bacillus* que no producen carbunco son no encapsuladas y son resistentes a la penicilina debido a la producción de β -lactamasas. Se puede utilizar la prueba cromogénica con disco de cefalosporinas (Nitrocefín®; BD Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ) como última prueba.

La identificación de especies de *Bacillus* en grupos distintos de *B. cereus* y especies relacionadas en los géneros recién descritos se puede lograr por la observación de la morfología celular; la forma, la posición y la aparición de endosporas, y la determinación de las características bioquímicas utilizando pruebas convencionales (cuadro 14-6) (véase lámina en color 14-1J).⁷¹⁹ En general, las formas y las localizaciones de las esporas son determinadas por la tinción de Gram o una tinción de las esporas, y la motilidad celular se establece mediante inoculación por punción del medio semisólido para motilidad. Se puede evaluar la acidificación de hidratos de carbono con medio semisólido CTA (agar cistina triptícas digerida) que contiene hidratos de carbono al 1%. Se detecta reducción de nitratos y producción de indol mediante la inoculación de caldo de nitrato de indol y el desarrollo con los reactivos apropiados, respectivamente. Se determina la hidrólisis de gelatina, caseína y almi-

Cuadro 14-4 Identificación del “Grupo *Bacillus cereus*”–*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*

CARACTERÍSTICA	<i>B. ANTHRACIS</i>	<i>B. CEREUS</i>	<i>B. THURINGIENSIS</i>	<i>B. MYCOIDES</i>
Diámetro celular	1,3 µm	1,4 µm	1,4 µm	1,3 µm
Células en cadenas	+	+	+	+
Forma de las esporas	Ovalada	Ovaladas, cilíndricas	Ovaladas, cilíndricas	Ovaladas
Localización de las esporas	Subterminal	Subterminal, central	Subterminal	Subterminal
Células con tumefacciones de esporas	–	–	–	–
Crecimiento anaerobio	+	+	+	+
Motilidad	–	+	+	–
Lecitinasa (agar yema de huevo)	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa ^a	–	V	+	V
Reducción de nitrato ^a	+	V+	+	V+
Hidrólisis de gelatina ^a	V+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de: ^b				
Arabinosa	–	–	–	–
Manitol	–	–	–	–
Salicilina	–	+	V+	V+
Trehalosa	+	+	+	+
Inulina	–	–	–	–
Glicerol	–	+	+	+
Glucógeno	+	+	+	+
Producción de β-lactamasa	–	+	+	ND
^a Reacción determinada con API 20E.				
^b Reacción determinada con API 50CHB.				
+, reacción positiva; –, reacción negativa; V+, reacción variable, mayoría de cepas positivas; ND, datos no disponibles.				

dón por la inoculación de medios convencionales en tubo o en placa. Los sistemas comerciales miniaturizados como API 20E® (incluye cúpulas para arginina dihidrolasa [ADH], indol, reducción de nitrato e hidrólisis de gelatina) y el API 50CHB® también pueden ser útiles para la diferenciación de *B. anthracis* de otros microorganismos del grupo de *B. cereus* y para la identificación de otras especies de *Bacillus* y especies relacionadas (cuadros 14-5 y 14-6).⁵⁴⁹ El sistema Vitek® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) tiene una tarjeta de identificación de *Bacillus* autónoma y el sistema Biolog® (Biolog, Hayward, CA) tiene una completa base de datos de especies de *Bacillus*.⁴⁹ Existe un análisis de metilésteres de ácidos grasos que utiliza el sistema de identificación microbiano (MIDI) (Microbial ID, Newark, DE) para la identificación de estos microorganismos. Se han identificado especies de *Bacillus* utilizando distintos métodos quimiotaxonómicos, entre ellos espectrometría de masa por pirólisis, espectroscopia infrarroja por transformación de

Fourier y electroforesis en gel de poliacrilamida. También se han utilizado métodos moleculares para la identificación y la tipificación de cepas de *B. cereus* asociados con brotes de transmisión alimentaria y casos agrupados de infecciones de aparente transmisión hospitalaria.^{546,589,878}

Sensibilidad de las especies de *Bacillus* a los antibióticos

Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son resistentes a la penicilina a causa de la producción de una enzima β-lactamasa de amplio espectro, *B. anthracis* casi siempre es sensible a la penicilina.⁷²⁰ Además, la mayoría de las cepas de *B. anthracis* también son sensibles a fluoroquinolonas, tetraciclinas, eritromicina, gentamicina y cloranfenicol.^{227,943} Es interesante señalar que la mayoría de las cepas de *B. anthracis* son resistentes a las cefalosporinas. *B. cereus* y *B. thuringiensis* producen una enzima β-lactamasa que hidroliza penicilina,

Cuadro 14-5 Guía de laboratorio de nivel A para la identificación de *Bacillus anthracis*

CATEGORÍA	CARACTERÍSTICAS
Seguridad	Bioseguridad de nivel 2 para el procesamiento de muestras clínicas Prácticas de laboratorio de bioseguridad de nivel 3 para las manipulaciones de todos los cultivos que podrían producir aerosoles (corte, picado, torbellinos, etc.) Realice todo el trabajo en un gabinete de seguridad biológica
Características de las colonias	Colonias de rápido crecimiento, de 2-5 mm de diámetro después de una incubación toda la noche a 35-37 °C Superficie "en vidrio esmerilado", seca, no pigmentada, plana o ligeramente convexa Bordes irregulares con proyecciones en "forma de coma" (colonia en cabeza de Medusa) Consistencia pegajosa y viscosa; cuando se tocan las colonias con un ansa, el crecimiento de las colonias se eleva como clara de huevo batida No hemolíticas en SBA
Características microscópicas	Bacilos grampositivos grandes, únicos o en cadenas. Pueden volverse gramvariables después de 72 horas Puede estar encapsulado en el material clínico y en los medios para hemocultivos Las esporas terminales/subterminales no edematizan la célula vegetativa (se pueden observar las esporas en la tinción de Gram, la tinción de verde de malaquita o mediante microscopio de contraste de fase) No se presentan esporas en material clínico a menos que estén expuestos a concentraciones bajas de CO₂, como las halladas en la atmósfera Las concentraciones más altas de CO₂ inhiben la esporulación
Características claves	Bacilos grampositivos No hemolíticos Inmóviles Catalasa positivos Se presentan esporas cuando se cultiva en condiciones aerobias sin CO₂

ampicilina y cefalosporinas, pero la mayoría de las cepas de estas especies son sensibles a clindamicina, eritromicina, clo-ranfenicol, aminoglucósidos y vancomicina.

Especies de *Corynebacterium*

Introducción y taxonomía

El género *Corynebacterium* está compuesto por muchas especies, que incluyen el patógeno clásico *C. diphtheriae*, el agente causal de la difteria. Aunque la difteria es bastante infrecuente en los países desarrollados debido a la amplia vacunación de los individuos susceptibles, es una causa de morbilidad importante, y, en ocasiones, se comunican brotes esporádicos en los Estados Unidos. Muchos de los microorganismos del género *Corynebacterium* constituyen parte de la flora normal de la piel y las vías respiratorias altas.⁹²⁸ Estas mismas especies, así como otras especies de *Corynebacterium* y bacterias corineformes relacionadas, han comenzado a ser reconocidas como agentes importantes de enfermedad humana, sobre todo en huéspedes inmunodeprimidos.^{315,925} La aplicación de técnicas moleculares a la caracterización de los bacilos grampositivos ha conducido a la descripción de varias especies nuevas de *Corynebacterium* aisladas en muestras clínicas humanas. Estos métodos incluyen análisis genéticos (secuenciación de rRNA y rDNA 16S, hibridación de ácidos nucleicos, etc.),

métodos quimiotaxonómicos (detección de ácidos micólicos, análisis de peptidoglucanos, estudios de ácidos grasos celulares, caracterización de menaquinona, espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier) y técnicas fenotípicas (pruebas fenotípicas convencionales, sistemas de identificación, pruebas de asimilación de compuestos orgánicos, detección de las enzimas preformadas glucosidasa o aminopeptidasa).^{75,207,646,665,706,749,872,911,926,927,973} El análisis de varias cepas corineformes sin nombre ha llevado a la asignación a géneros ya descritos (p. ej., *Corynebacterium*, *Arcanobacterium* y *Actinomyces*) y a géneros nuevos (p. ej., *Turicella*, *Cellulomicrobium* y *Dermabacter*). Se ha observado que cepas de grupos corineformes nuevos y de grupos de los CDC antes reconocidas pertenecen a géneros de los que se pensaba que no incluían patógenos humanos (p. ej., *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*). Los géneros que están relacionados con las especies de *Corynebacterium* comprenden los microorganismos nocardiformes (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Oerskovia*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Gordona*, *Dietzia*, *Tsukamurella*), los actinomicetos facultativos y anaerobios (*Actinomyces*, *Arachnia*), los "difteroides" anaerobios (*Propionibacterium*, *Propioniferax*) y los bacilos ácido-alcohol resistentes (*Mycobacterium*). En el cuadro 14-7 se encuentran descripciones quimiotaxonómicas y fenotípicas del género *Corynebacterium* y de géneros corineformes relacionados en muestras clínicas humanas. Algunos de estos géneros serán explicados en este

Cuadro 14-6 Características bioquímicas de las especies de *Aneurinibacillus*, grupo *Bacillus* no *Bacillus cereus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus* y *Paenibacillus* aisladas en muestras clínicas humanas

ESPECIE	FORMA DE LAS ESPORAS	LOCALIZA- CIÓN DE LAS ESPORAS	CÉLULA CON TUMEFACCIÓN DE ESPORAS	MOTI- LIDAD	LECI- TINASA, EYA	ADH	INDOL	REDUC- CIÓN DE NITRATO	HIDRÓ- LISIS DE GELATINA	HIDRÓ- LISIS DE CASEÍNA	HIDRÓ- LISIS DE ALMIDÓN	GAS A PARTIR DE GLUCOSA	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE:						
													ARABI- NOSA	GLI- CEROL	GLUCÓ- GENO	INU- LINA	MANI- TOL	SALI- CINA	TREHA- LOSA
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	Ovaladas	C/ST	+	+	ND	ND	ND	+	—	—	ND	ND	ND	+	ND	ND	—	ND	—
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ovaladas	C/T	—	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
<i>Bacillus badius</i>	Ovaladas	C/ST/T	—	+	ND	ND	ND	—	+	+	ND	ND	ND	—	ND	ND	—	ND	—
<i>Bacillus circulans</i>	Ovaladas	ST/T	+	+	—	V—	—	V	—	—	+	—	—	V	+	V+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i>	Ovaladas	ST/T	+	+	—	V	—	V—	—	V	+	—	—	+	—	—	V	+	+
<i>Bacillus firmus</i>	Ovaladas	ST	V	+	—	—	—	V+	V	+	+	—	—	—	—	—	V	—	V
<i>Bacillus lentus</i>	Ovaladas	ST/C	V	+	—	—	—	V+	V	V	+	—	—	V	V	V—	V+	+	V+
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ovaladas	ST/C	—	+	—	+	—	+	+	+	+	—	—	+	+	V	+	+	+
<i>Bacillus megaterium</i>	Ovaladas/esféricas	ST/C	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilis</i>	Esféricas/ovaladas	ST/C	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i>	Esféricas/ovaladas	ST/T	+	+	ND	ND	ND	—	—	V	ND	—	ND	—	ND	ND	—	ND	—
<i>Bacillus subtilis</i>	Ovaladas	ST/C	—	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	V+	+	+	+
<i>Brevibacillus agri</i>	Ovaladas	ST/C	+	+	ND	ND	ND	—	+	+	ND	ND	ND	—	ND	ND	+	ND	V
<i>Brevibacillus brevis</i>	Ovaladas	ST/C	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	V	ND	ND	V	ND	—
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Ovaladas	ST/C	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	+
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ovaladas	ST/T	+	+	—	—	—	V	+	V+	+	—	—	V+	+	—	—	V—	+
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Ovaladas	ST	—	—	—	—	—	V	+	V—	+	—	—	V	—	—	V	V	+
<i>Paenibacillus alvei</i>	Ovaladas	ST/C	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	—	+	V	—	—	V	V
<i>Paenibacillus macerans</i>	Ovaladas	ST/T	+	+	—	—	—	—	V	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Ovaladas	ST/C	+	+	—	—	—	V	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>Paenibacillus validus</i>	Ovaladas	ST/T	+	+	—	—	—	V	—	—	+	—	—	+	V	V	+	—	+
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	Ovaladas/esféricas	ST/T	+	+	—	V—	—	V	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+

C, espora de localización central; ST, espora de localización subterminal; T, espora de localización terminal; +, positiva; —, negativa; V, reacción variable; V+, variable, mayoría de cepas positivas; V—, variable, mayoría de cepas negativas; ND, no disponibles; EYA, agar yema de huevo; ADH, arginina dihidrolasa.

Cuadro 14-7 Características del género *Corynebacterium* y otros bacilos grampositivos corineformes

GÉNERO	MORFOLOGÍA CELULAR	CATALASA	MOTILIDAD	PIGMENTACIÓN	CRECIMIENTO	METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO	ÁCIDOS MICÓLICOS	PEPTIDOGLUCANO DIAMINOÁCIDO	MENA-QUINONAS	ÁCIDOS GRASOS CELULARES	COMENTARIOS
<i>Actinobaculum</i>	Bacilos delgados rectos a ligeramente curvos; pueden mostrar cierta ramificación	—	—	Ninguna	Facultativo/Anaerobio	Fermentativo	Ausentes	L-lisina, L-ornitina	MK-10(H ₂)	C16:0, C18:1(9C, ciclo), C18:0	Cuatro especies, que incluyen el ex <i>Actinomyces suis</i>
<i>Actinomyces</i>	Bacilos, filamentosos, ramificación	V	—	Ninguna; ocasionalmente rosa/roja	Facultativo/Anaerobio	Fermentativo	Ausentes	L-lisina, L-ornitina	MK-10(H ₂)	C16:0, C18:1(9C, ciclo), C18:0	Cepas grupo 1, grupo 2, "similar grupo 1" y grupo E de los CDA, más otras especies de <i>Actinomyces</i> descritas antes
<i>Arcanobacterium</i>	Bacilos irregulares y cortos	V	—	Ninguna	Facultativo	Fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-9(H ₂)	C16:0, C18:1(9C, ciclo), C18:0	Cinco especies, que incluyen el ex <i>Actinomyces bernardiae</i>
<i>Arthrobacter</i>	Ciclo bacilo-coco	+	V	Variable	Aerobio	Oxidativo	Ausentes	L-lisina	MK-8, MK-9, MK-9(H ₂)	C15:0ai, C17:0ai, C15:0i	Algunas cepas grupos B-1 y B-3 de los CDC
<i>Brevibacterium</i>	Ciclo bacilo-coco	+	—	Blanca levemente grisácea, amarilla, anaranjada, violeta	Aerobio	Oxidativo (inerte)	Ausentes	meso-DAP	MK-8(H ₂), MK-7(H ₂)	C15:0ai, C17:0ai, C16:0i	Algunas cepas grupos B-1 y B-3 de los CDC
<i>Cellulomonas</i>	Bacilos irregulares; formas cócicas	+	V	Amarilla	Facultativo	Fermentativo/oxidativo	Ausentes	L-ornitina	MK-9(H ₂)	C15:0ai, C16:0	Grupo A-3 de los CDC (<i>C. hominis</i>); en la actualidad es poco clara la clasificación de <i>O. turbata</i> como <i>C. cellulans</i>
<i>Cellulosimicrobium</i>	Bacilos irregulares; ciclo bacilo-coco	+	—	Blanco amarillento	Facultativo	Fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-9(H ₂)	C15:0ai, C16:0i, C16:0, C16:0i	Incluye <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> , antes <i>Oerskovia xanthinolytica</i>
<i>Corynebacterium</i>	Bacilos, bacilos con forma de palos	+	—	Ninguna, gris/blanca	Facultativo	Fermentativo/inerte	V (C22-C38)	meso-DAP	MK-9(H ₂), MK-8(H ₂)	C18:1, C16:0, C18:0	Especies de <i>Corynebacterium</i>
<i>Dermabacter</i>	Bacilos cortos o cocobacilos	+	—	Ninguna	Facultativo	Fermentativo	Ausentes	meso-DAP	MK-9, MK-8, MK-7	C17:0ai, C15:0ai, C16:0i	Grupos 3 y 5 de los CDC
<i>Exiguobacterium</i>	Bacilos irregulares y cortos con ciclo bacilo-coco	+	+	Anaranjada pálida, amarilla	Facultativo	Fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-7	C17:0i, C15:0i, C16:0	Incluye <i>E. acetylicum</i> ; se asemeja a las cepas grupo A-4 de los CDC

GÉNERO	MORFOLOGÍA CELULAR	CATALASA	MOTILIDAD	PIGMENTACIÓN	CRECIMIENTO	METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO	ÁCIDOS MICÓLICOS	PEPTIDOGLUCANO DIAMINOÁCIDO	MENA-QUINONAS	ÁCIDOS GRASOS CELULARES	COMENTARIOS
<i>Leifsonia</i>	Bacilos pleomorfos que se fragmentan en bacilos y cocos más cortos; móviles a través de flagelos peritricos	+	+	Amarillenta a amarilla intensa con el envejecimiento	Aerobio	Oxidativo, fermentativo (de hidratos de carbono)	Ausentes	DL-ácido diaminobutírico	MK-11, MK-10	C15:0ai, C17:0ai, C16:0i	Incluye <i>L. aquatica</i> (antes " <i>Corynebacterium aquaticum</i> ") y otras bacterias ambientales
<i>Microbacterium</i>	Bacilos irregulares y delgados; algunas formas cócicas	+	V	Entre incolora y amarilla	Aerobio	Oxidativo/débilmente fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-12, MK-11, MK-10	C15:0ai, C17:0ai, C16:0i	Algunas cepas grupos A-4 y A-5 de los CDC; incluye las ex especies <i>Aureobacterium</i>
<i>Oerskovia</i>	Filamentos cocoides a rudimentarios; vegetativos pero sin "hifas" aéreas	+	V	Amarillo	Facultativo/aerobio	Fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-9(H ₂)	C15:0, 16:0, C15:0i, C17:0ai	Incluye <i>Oerskovia turbata</i> (<i>Cellulomonas cellulans</i>); <i>O. jenensis</i> (de los insectos) y <i>O. pauromebola</i> (del suelo)
<i>Propionibacterium</i>	Bacilos irregulares con ramificación o extremos "bifidos"; algunas formas cócicas	V	—	Blanca/blanco grisácea	Anaerobio/facultativo	Fermentativo	Ausentes	LL-DAP	MK-9(H ₂)	C15:0, C15:0ai, C17:0ai	Suelen crecer mejor en condiciones anaerobias, sobre todo en aislamiento primario; producen una cantidad importante de ácido láctico a partir de glucosa
<i>Propioniferax</i>	Bacilos irregulares	+	—	Ninguna	Aerobio	Fermentativo	Ausentes	LL-A ₂ pm	MK-9(H ₂)	C15:0ai, C16:0i	Incluye las especies únicas <i>Propioniferax innocua</i> (antes <i>Propionibacterium innocuum</i>)
<i>Rothia</i>	Bacilos irregulares con ramificación rudimentaria	+	—	Blanca, blanco grisácea	Facultativo	Fermentativo	Ausentes	L-lisina	MK-7	C15:0ai, C17:0ai, C16:0	Incluye variantes de colonias blancas y negras y grupo 4 de los CDC de corineformes fermentativos; otra cepa humana del género es <i>R. mucilaginosa</i>
<i>Turicella</i>	Bacilos irregulares	+	—	Ninguna	Aerobio	Inerte	Ausentes	meso-DAP	MK-10(H ₂), MK-11(H ₂)	C18:1, C16:0, C18:0	Especies únicas (<i>T. otitidis</i>) fenotípicamente similares a <i>C. auris</i> y <i>C. afermentans</i>

capítulo, mientras que otros (p. ej., especies de *Propionibacterium*) se describen en capítulos ulteriores.

El género *Corynebacterium* está compuesto por bacilos grampositivos pleomorfos con forma de porra o maza que son catalasa positivos, inmóviles, no esporulados y no ácido-alcohol resistentes. La mayoría de las especies de *Corynebacterium* contienen ácidos micólicos, arabinosa y galactosa en sus paredes celulares.⁹⁷³ El peptidoglucano de las especies de *Corynebacterium* contiene **ácido meso-diaminopimélico** (meso-DAP) como el diaminoácido componente. También se encuentran distintos ácidos grasos celulares y menaquinonas en sus membranas celulares (cuadro 14-5). Las descripciones clásicas de este género incluyen su tendencia a formar disposiciones en "cerca" y en "letras chinas" sobre los extendidos teñidos con Gram (lámina en color 14-3A). La mayoría de las especies son facultativas y son fermentativas en su metabolismo de hidratos de carbono, aunque algunas son no fermentativas o utilizan los hidratos de carbono en forma oxidativa. Algunas especies también requieren lípidos para un crecimiento óptimo (lipofilia). Esta necesidad es sugerida por el crecimiento en medios que contienen lípidos (p. ej., SBA) y por un crecimiento escaso o nulo en agar chocolate disponible en el comercio, que contiene polvo de hemina en lugar de eritrocitos lisados. El lipofilismo se demuestra mejor por el mayor crecimiento de estas especies en el medio que contiene Tween 80 al 0,1-1% en comparación con el mismo medio que carece de ese compuesto.

La aplicación de técnicas de "investigación" a la caracterización de los microorganismos corineformes también ha creado problemas para el laboratorio clínico, donde los recursos de métodos de identificación genéticos y quimiotaxonómicos son limitados y la identificación fenotípica es la norma. Dos cepas clínicas pueden producir resultados idénticos en las pruebas fenotípicas (p. ej., un API Coryne), pero cuando se aplican métodos genéticos y quimiotaxonómicos pueden ser diferentes (p. ej., diferentes ácidos grasos celulares, diferentes diaminoácidos en el peptidoglucano, etc.). Debido a la caracterización fenotípica limitada de muchos géneros ambientales (p. ej., especies de *Mycobacterium*), la asignación de las cepas clínicas a estos géneros es más difícil y, lamentablemente, menos precisa. Como resultado del progreso científico, la interpretación de las comunicaciones de los casos clínicos en relación con *Corynebacterium* o especies corineformes individuales se ha vuelto problemática porque las cepas descritas en estas comunicaciones no han sido rigurosamente caracterizadas.

Identificación de especies de *Corynebacterium* y bacterias corineformes

La identificación de especies de *Corynebacterium* y otras bacterias corineformes se realizaba originariamente con pruebas fenotípicas de la misma forma que para otras bacterias facultativas. Con la aplicación de los métodos moleculares, ha aumentado mucho la cantidad de especies en el género *Corynebacterium* y géneros relacionados. Por lo tanto, el número de pruebas fenotípicas necesarias para la identificación aumentó también. Se realizan pruebas convencionales como para otros microorganismos (p. ej., bacilos gramnegativos entéricos), con ciertas modificaciones. Los requerimientos de lípidos se determinan por la inoculación en superficie del microorganismo en un medio que no contiene lípidos (p. ej., agar de Mueller-Hinton, agar BHI, agar tripticasa soja) y colocando una gota de Tween 80 al 0,1% en el inóculo. Después de la incubación, las cepas lipofílicas muestran mayor crecimiento en el área de depósito de Tween y crecimiento escaso o nulo en las áreas alejadas del

lípido. Las cepas no lipofílicas crecen en toda la superficie de agar (véase lámina en color 14-3B). Los medios de identificación convencionales (pruebas de utilización de hidratos de carbono) también pueden requerir el suplemento con tres a cuatro gotas de Tween 80 al 0,1-1% (por 5 mL de medios de caldo) para la identificación de las cepas lipofílicas.

La cromatografía gas-líquido para la detección de productos volátiles y no volátiles de la fermentación de la glucosa también es útil para identificar especies de *Corynebacterium*. Todos los taxones producen cantidades pequeñas a moderadas de ácidos acético, láctico y succínico a partir de la glucosa, pero algunas especies también producen una cantidad importante de ácido propiónico a partir de glucosa. Esta característica a menudo es útil para separar cepas que tienen perfiles bioquímicos muy similares (p. ej., separación de *C. amycolatum* [propionato positivas] de *C. striatum* [propionato negativas]). En el recuadro 14-2 se enumeran las especies que producen ácido propiónico a partir de glucosa según se determine por cromatografía gas-líquido.

Dos sistemas que tratan la identificación de bacilos grampositivos corineformes son el **API Coryne**[®] (BioMérieux, La-Balme-les-Grottes, Francia) y el **RapID CB Plus**[®] (Remel Laboratories, Lenexa, KS). El API Coryne[®] es un sistema de identificación que consta de un panel o galería de microcúpulas con once pruebas enzimáticas, ocho pruebas de fermentación de hidratos de carbono y una cúpula de control de fermentación. Se prepara una suspensión concentrada de microorganismos (estándar de McFarland #6 o mayor) en agua y se la coloca en las cúpulas de prueba de enzima (nitrato [NIT] a través de gelatina [GEL]). Se coloca luego una alícuota de 0,5 mL de esta suspensión en el medio GP (medio enriquecido con indicador de rojo fenol) provisto; esto se utiliza para llenar el control de hidratos de carbono y las cúpulas de prueba (O a GLYG). Se cubre cada una de las últimas cúpulas con vaselina estéril. Se incuba la tira durante 24-48 horas en una incubadora sin CO₂. Se agregan los reactivos A y B a la cúpula de nitrato y los reactivos ZYM A y ZYM B a las cúpulas de enzimas (pirazinamidasa [PYZ] a β-N-acetilglucosaminidasa [β-NAG]); estas reacciones se leen después de 10 minutos. Las pruebas de esculina (ESC), ureasa (URE), GEL e hidratos de carbono se leen directamente sin el agregado de reactivos. A partir del patrón de reacciones en la tirita, se genera un biocódigo que se interpreta consultando el API Coryne Analytical Profile Index o haciendo entrar el biocódigo en el API Computer Service por teléfono.

Las evaluaciones del API Coryne versión 1 en 1991 observaron que desde el 65% al 86,5% de las especies de *Corynebacterium* eran identificadas correctamente sólo con el sistema. Desde el 21,8% hasta el 31,8% de las cepas eran identificadas con pruebas adicionales (p. ej., producción de pigmento, motilidad, crecimiento en NaCl al 6,5%, prueba CAMP, hemólisis, crecimiento a 42 °C).^{282,833} Esta versión identificó sólo el 36,4% de 22 bacterias corineformes de los CDC caracterizadas sin pruebas adicionales.³³³ La base de datos API Coryne fue actualizada en 1997 para incluir algunos taxones recién descritos y para reflejar los cambios en la taxonomía. Funke y cols. evaluaron el API Coryne versión 2,0 con 390 cepas que representaban los 49 taxones incluidos en la nueva base de datos más 17 cepas pertenecientes a taxones no incluidos.³¹⁰ El sistema identificó el 90,5% de las cepas pertenecientes a los taxones incluidos, y se requieren pruebas adicionales para la identificación correcta del 55,1% de todas las cepas evaluadas. Sólo 5,6% de las cepas no fueron identificadas y 3,8% fueron mal interpretadas. El API Coryne requiere un inóculo

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium*

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium accolens</i>	<i>C. accolens</i>, descrito por Neubauer y cols. en 1991, ha sido aislado en muestras clínicas humanas, que incluyen secreción de heridas, muestras endocervicales, esputo e hisopados de fauces.²⁹ Las cepas similares remitidas a los CDC de muestras clínicas fueron denominadas antes corineformes grupo 4 de los CDC. Este microorganismo fue observado inicialmente por su crecimiento satélite alrededor de una estría de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sangre, pero el subcultivo repetido del microorganismo condujo a la adaptación al crecimiento lejos de la estría del estafilococo. No se observó ningún crecimiento alrededor de los discos impregnados con factor X o factor V o entre ellos. El crecimiento satélite probablemente se debió al cumplimiento del requerimiento líquido por la acción de los estafilococos sobre los eritrocitos en el agar sangre de carnero (SBA). Se ha comunicado un solo caso de endocarditis de válvula mitral y aórtica nativas causado por <i>C. accolens</i>.¹⁵⁹ <i>C. accolens</i> es una especie lipofílica que forma colonias pequeñas (< 0.5 mm de diámetro), grises, lisas, transparentes, no hemolíticas en SBA después de 48 horas de incubación. Reduce el nitrato pero no hidroliza la esculina ni produce ureasa. Al igual que la mayoría de las otras corinebacterias, la mayoría de las cepas de <i>C. accolens</i> dan positiva la reacción de pirazinamidasas; sin embargo, no se produce fosfatasa alcalina. Fermentan glucosa y ribosa, y algunas cepas también producen ácido a partir de sacarosa o manitol. Las cepas de esta especie son sensibles a penicilina, cefalosporinas, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y aminoglucósidos, y son resistentes al sulfametoxazol.^{159,629}
<i>Corynebacterium afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> , <i>Corynebacterium afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i>	Los microorganismos pertenecientes al grupo ANF-1 de los CDC fueron descritos por primera vez en 1981. Estos microorganismos son bacilos grampositivos pleomorfos que no producen ácido a partir de ningún hidrato de carbono, de ahí el nombre ANF, que significa "no fermentador absoluto". Han sido aislados en hemocultivos y muestras del oído; sin embargo, su importancia clínica no es clara. Riegel y cols. examinaron las características genéticas y bioquímicas de 11 cepas de ANF-1 y propusieron una nueva especie, <i>Corynebacterium afermentans</i>, que contiene dos subespecies, <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> y <i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i>.⁷²⁶ La primera subespecie crece igualmente bien tanto en ausencia como en presencia de Tween 80 al 1%, aunque las colonias adquieren una pigmentación marrón clara en medios que contienen Tween. Las últimas subespecies forman colonias muy pequeñas en SBA después de 24 horas, pero producen grandes colonias de color marrón claro en SBA con suplemento de Tween 80. Fuera de los requerimientos de líquido, estos microorganismos son bioquímicamente inertes excepto por las reacciones de pirazinamidasas (PYZ) y de fosfatasa alcalina (PAL) positivas. Desde el punto de vista fenotípico, <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> se asemeja a las otras dos especies de corineformes—<i>Corynebacterium auris</i> y <i>Turicella otitidis</i>—ambas asociadas con otitis media. Todas producen el mismo biocódigo en el API Coryne (biocódigo 2100004). Estos tres microorganismos pueden ser diferenciados sobre la base de la morfología de las colonias, la prueba de CAMP, las actividades de DNAsa y leucina arilamidasa (LAP). <i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i> también produce el mismo biocódigo API y es la única especie lipofílica que puede ser prueba de CAMP positiva. Sewell y cols. comunicaron el primer caso de endocarditis de válvula protésica por <i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i> en un hombre de 76 años.⁷⁸⁹ El microorganismo fue aislado en 5 de 15 hemocultivos BACTEC y de un absceso perivalvular. La cepa era sensible a penicilina, ampicilina, vancomicina, cefazolina, ceftriaxona, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina e imipenem, y era resistente a clindamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. <i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i> también ha sido descrito como causa de un absceso encefálico y otro hepático en un hombre de 39 años antes sano.²³⁷ <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> también ha sido documentado como causa de sepsis luego de neurocirugía.⁵⁰⁵
<i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Corynebacterium appendicis</i>	Véase el texto. <i>C. appendicis</i> es una especie recién descrita que fue aislada en una herida posquirúrgica en un paciente con apendicitis.⁹⁷⁷ Desde el punto de vista genotípico, esta nueva especie está más estrechamente relacionada con <i>C. afermentans</i>, <i>C. coyleae</i> y <i>C. lipophiloflavum</i>. Esta especie lipofílica da reacciones positivas de pirazinamidasas, fosfatasa alcalina y ureasa y produce ácido a partir de glucosa y maltosa sólo dentro de los 7 días (reacciones API Coryne). El lactato es el principal producto de la fermentación de la glucosa.
<i>Corynebacterium argenteratense</i>	<i>C. argenteratense</i> fue denominado así por <i>Argentoratium</i>, nombre latino de Strasbourg, Francia, donde se lo aisló.⁷³² Las cuatro cepas originales fueron aisladas en cultivos faríngeos humanos en pacientes con amigdalitis, pero no se conoce el papel de estas bacterias en la enfermedad. Esta especie está estrechamente relacionada con miembros del "grupo de <i>C. diphtheriae</i>" (<i>C. diphtheriae</i>, <i>C. pseudotuberculosis</i> y <i>C. ulcerans</i>) y con <i>C. kutscheri</i>. Debido a la similitud genética con el "grupo de <i>C. diphtheriae</i>", estas cepas fueron examinadas para detectar la presencia del gen del β-corinefago, pero no se lo detectó en ninguna de las cepas. <i>C. argenteratense</i> es no lipofílico, forma colonias no hemolíticas, blanco grisáceas cremosas en SBA y produce rápidamente ácido a partir de glucosa, fructosa y, ocasionalmente, ribosa.⁷³² No reduce el nitrato y no hidroliza la urea, la esculina ni la gelatina. Da positiva la reacción de pirazinamidasas, pero la mayoría de las cepas dan pruebas de fosfatasa alcalina negativas. Este microorganismo se asemeja a <i>C. coyleae</i> salvo que este último es fuertemente prueba de CAMP positiva y acidifica ribosa, mientras que <i>C. argenteratense</i> es prueba de CAMP negativa y es variable en la fermentación de ribosa. Al igual que <i>C. amycolatum</i>, <i>C. argenteratense</i> produce ácido propiónico a partir de la fermentación de la glucosa.
<i>Corynebacterium atypicum</i>	La descripción de <i>C. atypicum</i> corresponde a una única cepa obtenida de una fuente humana no descubierta.³⁸⁵ La cepa era no lipofílica, no hemolítica y no hidrolizaba esculina, gelatina ni almidón, y era leucina aminopeptidasa positiva. A diferencia de la mayoría de las especies de <i>Corynebacterium</i>, las pruebas de pirazinamidasas y de fosfatasa alcalina fueron negativas. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y ribosa. Esta nueva especie, al igual que <i>C. amycolatum</i> y <i>C. kroppenstedtii</i>, carece de los ácidos micólicos de la pared celular. Al igual que <i>C. glucuronolyticum</i>, esta especie produce β-glucuronidasa (β-GUR), y otras pruebas enzimáticas en el API Coryne son negativas. El código API singular para esta especie atípica es 0200365.

(Continúa)

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Esta especie ha sido aislada en muestras clínicas humanas, que incluyen hemocultivos de un paciente con bronquitis.⁹⁷⁶ El microorganismo crece como colonias pegajosas y ligeramente amarillas en SBA. En el API Coryne, las pruebas de pirazinamidasa y fosfatasa alcalina son positivas y se produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa, lo que conduce al biocódigo API Coryne 2100125. El ácido láctico es el principal producto de la fermentación de la glucosa. Desde el punto de vista genotípico y fenotípico, <i>C. aurimucosum</i> se asemeja estrechamente a <i>C. minutissimum</i>. El perfil API Coryne, 2100125 es el mismo para ambas especies, excepto que <i>C. aurimucosum</i> produce colonias amarillas y es hidrólisis de hipurato positivo, mientras que <i>C. minutissimum</i> crece como colonias blanco grisáceas y es hipurato negativo. En 2004, Daneshvar y cols. comunicaron sobre cepas con pigmento negro carbón de muestras del aparato genital que fueron designadas provisoriamente como grupo corineforme fermentativo 4 de los CDC.²⁰² Estas cepas fueron relacionadas a nivel de especie con <i>C. aurimucosum</i> y <i>C. nigricans</i>, las cuales fueron aisladas originariamente en muestras del aparato genital femenino. Debido a estas cepas y su estrecha relación con <i>C. aurimucosum</i>, la descripción de este microorganismo ha sido enmendada para incluir no sólo los tipos originales de colonias ("pegajosas, ligeramente amarillentas") sino también estas variantes con pigmento negro carbón. <i>C. nigricans</i> se considera actualmente un "pro sinónimo" de <i>C. nigricans</i>.
<i>Corynebacterium auris</i>	Algunas bacterias del grupo ANF-1 de los CDC aisladas en pacientes pediátricos con infecciones óticas han sido caracterizadas y asignadas al género <i>Corynebacterium</i> como subespecies de <i>C. afermentans</i> (véase antes).⁷²⁶ Otras cepas corineformes aisladas en muestras óticas que se asemejan fenotípicamente a los microorganismos del grupo AFN-1 de los CDC, pero que son genética y quimiotaxonómicamente distintos (bacterias "similares a AFN-1"), han recibido el nombre <i>Turicella otitidis</i>.^{298,809} Funke y cols. también informaron sobre el aislamiento de 10 cepas identificadas como grupo "similar a AFN-1" de los CDC, pero que eran distintas tanto de las subespecies de <i>C. afermentans</i> como de <i>T. otitidis</i> por la morfología celular y el aspecto de las colonias.²⁹⁸ Las colonias eran secas, débilmente adherentes al agar y se volvieron ligeramente amarillas con el tiempo, mientras que las colonias de <i>C. afermentans</i> y de <i>T. otitidis</i> eran cremosas, lisas y blanco grisáceas. Estas cepas eran fenotípicamente similares tanto a <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> como a <i>T. otitidis</i> utilizando pruebas bioquímicas comunes. Sin embargo, pudieron ser diferenciadas por distintos sustratos en el sistema de identificación BIOLOG. El análisis genético confirmó que las 10 cepas eran una nueva especie de <i>Corynebacterium</i> y se propuso el nombre <i>Corynebacterium auris</i> ("auris" se refiere al oído). <i>C. auris</i> crece como colonias no lipofílicas, no hemolíticas, secas, adherentes y amarillentas en SBA y, como mencionamos, produce reacciones en pruebas fenotípicas comunes que son idénticas a <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> y <i>T. otitidis</i>. Sin embargo, tanto <i>C. auris</i> como <i>T. otitidis</i> son fuertemente prueba de CAMP positivos, mientras que <i>C. afermentans</i> es prueba de CAMP variable.²⁹⁸ Además, las especies de <i>C. afermentans</i> y <i>C. auris</i> son DNasa negativas, mientras que <i>T. otitidis</i> es DNasa positivo. Se puede detectar actividad de leucina arilamidasa (LAP) en <i>T. otitidis</i> y <i>C. auris</i>, mientras que <i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i> es LAP negativo.⁷¹⁸ En el API Coryne, el biocódigo numérico para <i>C. auris</i> es 2100004. Un estudio de 48 cepas de <i>C. auris</i> mostró que todas eran resistentes a la penicilina y la CIM 50% era de 1 µg/mL.³⁰⁶ Estas cepas también fueron más sensibles a cefalotina que a ceftriaxona. Todas las cepas de <i>C. auris</i> eran sensibles a cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina y tetraciclina. Se observó resistencia simultánea a la clindamicina y la tetraciclina en el 30% de las cepas.
<i>Corynebacterium bovis</i>	Esta especie lipofílica se asocia principalmente con ganado bovino, aunque se han documentado raras infecciones humanas.^{77,315} <i>C. bovis</i> es una especie lipofílica que es pirazinamidasa negativa, fosfatasa alcalina y ureasa positiva, y produce ácido sólo a partir de glucosa. Algunas cepas raras son también débilmente maltosa positivas, aunque esta reacción es negativa en API Coryne. El perfil API Coryne para <i>C. bovis</i> es 0101104.⁷⁷
<i>Corynebacterium confusum</i>	<i>C. confusum</i> es una especie nueva que ha sido aislada en un absceso plantar, osteomielitis del calcáneo y sangre.³⁰² La cepa de los hemocultivos fue aislada en un hombre no inmunodeprimido de 20 años durante un episodio febril luego de una cirugía del dorso. Este microorganismo es no lipofílico y produce una reacción ácida retardada a partir de glucosa (la cúpula GLU en el API Coryne fue positiva sólo después de 48-72 horas de incubación). La falta de prolongación de la incubación de la banda API Coryne luego de 24 horas condujo a la identificación de estas cepas como <i>C. propinquum</i> (véase más adelante), pero estas cepas no hidrolizaban tirosina (<i>C. propinquum</i> es hidrólisis de tirosina positivo). <i>C. confusum</i> reduce nitrato a nitrito, produce pirazinamidasa y fosfatasa alcalina, no hidroliza esculina ni urea y es prueba de CAMP negativo. Todas las pruebas enzimáticas API son negativas. En el API Coryne, los códigos generados por este microorganismo son 3100304 o 3100104, lo que indica que algunas cepas son también ribosa positivas. En la comunicación original, las cepas de <i>C. confusum</i> fueron sensibles a penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos, tetraciclinas, quinolonas y glucopéptidos, y tenían una sensibilidad variable a rifampicina y macrólidos.³⁰² Todas las cepas eran resistentes al aztreonam.
<i>Corynebacterium coyleae</i>	<i>C. coyleae</i> ha sido aislado en muestras de líquido pleural, abscesos mamarios, muestras del aparato genitourinario y hemocultivos de pacientes con fiebres de origen desconocido secundarias a trastornos subyacentes (p. ej., SIDA, cirugía).³⁰⁸ Las colonias de <i>C. coyleae</i> son no lipofílicas, no hemolíticas en SBA, de consistencia cremosa a pegajosa y tienen aproximadamente 1 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. El microorganismo es pirazinamidasa, fosfatasa alcalina y prueba de CAMP positivo, y produce ácido a partir de glucosa, ribosa, fructosa y manosa. La mayoría de las cepas producen números de biocódigos 2100304 o 6100304. El último biocódigo es el mismo que para <i>C. jeikeium</i>, pero <i>C. coyleae</i> es no lipofílico y no muestra resistencia múltiple a los antibióticos. Las seis cepas de <i>C. coyleae</i> descritas en la comunicación original eran sensibles a ampicilina, amoxicilina clavulanato, cefalotina.

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium durum</i>	ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, imipenem, penicilina G, rifampicina, tetraciclina, vancomicina y teicoplanina. Cuatro de las seis cepas fueron sensibles a la clindamicina. Véase el texto. <i>C. durum</i> es una especie recién descrita que ha sido aislada en cultivos faríngeos de individuos sanos y en esputo y muestras de lavado de huéspedes inmunodeprimidos (neoplasias, leucemia, insuficiencia renal).^{728,928} En cultivo, este microorganismo no lipofílico produce pequeñas colonias de color marrón claro que son adherentes al agar, aunque no todas tienen este aspecto. En las tinciones de Gram, las células son largas, pleomorfas y a veces filamentosas, y se asemejan algo a la morfología celular de <i>C. matruchotii</i>, pero carecen del aspecto de "látigo" característico de las últimas especies. La mayoría de las cepas de <i>C. durum</i> son fosfatasa alcalina y PYR negativas. La esculina es hidrolizada débilmente y la hidrólisis de urea es lentamente positiva o negativa. <i>C. durum</i> también es una de las pocas especies de <i>Corynebacterium</i> que fermenta fuertemente tanto manitol como galactosa, lo que ayuda a diferenciarlo de <i>C. matruchotii</i>, que no fermenta a estos hidratos de carbono. En la tira de API Coryne, <i>C. durum</i> produce perfiles numéricos singulares (3000135, 3001135, 3040135, 3400115, 3400135, 3400305, 3400325, 3400335, 3040325, 3040335, 3440335, 3441335) aun cuando este microorganismo no está incluido en la base de datos de ese sistema.⁶¹ Los datos sobre la sensibilidad a los antibióticos de esta nueva especie no se encuentran disponibles.
<i>Corynebacterium falsenii</i>	<i>C. falsenii</i> fue descrito en 1998 por Sjoden y cols. en la Universidad de Goteborg, Suecia.⁸¹³ Las cepas fueron obtenidas de hemocultivos (tres) y cultivos de líquido cefalorraquídeo (una). Dos de las muestras de hemocultivos provinieron de pacientes con linfoma maligno y leucemia linfática, respectivamente. Estas cepas eran no lipofílicas y desarrollaron una pigmentación amarilla definida después de 72 horas; la incubación prolongada más allá de este tiempo condujo a una pigmentación más intensa. No reducían el nitrato y no hidrolizaban la esculina. Las cuatro cepas fermentaban lentamente la glucosa, mientras que una cepa única también produjo una reacción ácida lenta con maltosa. La urea convencional fue hidrolizada después de una incubación de toda la noche y la cúpula de ureasa del API Coryne se volvió positiva sólo después de 48 horas de incubación. Estas cepas fermentativas no lipofílicas eran genética y quimiotaxónicamente distintas, y se propuso el nombre <i>C. falsenii</i>. Desde la descripción de <i>C. falsenii</i> en muestras clínicas humanas, también se han aislado cepas similares en las bocas de águilas, junto con una segunda cepa no lipofílica (<i>C. aquilae</i>).²⁶⁷ En el API Coryne, los biocódigos para <i>C. falsenii</i> incluyen 2101104 y 2101304. Algunos biocódigos API Coryne para este microorganismo son idénticos a aquellos para <i>C. jeikeium</i> (2100304, 2100324), pero las cepas de <i>C. falsenii</i> serán amarillentas y no lipofílicas. Las cepas de <i>C. falsenii</i> son sensibles a cefalotina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, imipenem, rifampicina, tetraciclina, cefetamet y ceftibuteno y resistentes al aztreonam. Las CIM para penicilina variaron desde 0,25 hasta 0,50 µg/mL.
<i>Corynebacterium freneyi</i>	Esta nueva especie comprende cinco muestras clínicas de sangre, heridas, abscesos y una muestra de semen.^{46,716} Las cepas de <i>C. freneyi</i> están relacionadas genéticamente con <i>C. xerosis</i> y <i>C. amycolatum</i> y pueden ser diferenciadas desde el punto de vista fenotípico de ellos por asimilaciones de fuentes de carbono y algunas características bioquímicas. Las colonias son blancas, secas, tienen 0,5 a 1 mm de diámetro después de 24 horas de crecimiento, son no hemolíticas y no lipofílicas. Al igual que <i>C. xerosis</i>, las cepas de <i>C. freneyi</i> son α-glucosidasa positivas. <i>C. freneyi</i> puede crecer a 20 °C, fermenta la glucosa a 42 °C y no acidifica el etilenglicol, mientras que las cepas de <i>C. xerosis</i> no crecen a 20 °C y no fermentan glucosa a 42 °C; algunas acidifican el etilenglicol. La capacidad de <i>C. freneyi</i> para crecer a 20 °C también ayuda a diferenciarlo de <i>C. amycolatum</i>, que no es capaz de crecer a 20 °C. <i>C. striatum</i> y <i>C. minutissimum</i> también pueden asemejarse a <i>C. freneyi</i>, pero <i>C. striatum</i> crece a 20 °C, fermenta la glucosa a 42 °C y acidifica el etilenglicol. <i>C. minutissimum</i> fermenta la glucosa a 42 °C, pero no crece a 20 °C y no acidifica el etilenglicol. En el API Coryne, <i>C. freneyi</i> proporciona un biocódigo de 3110325, que corresponde a una identificación cruzada <i>C. striatum/C. amycolatum</i>; estas especies pueden ser separadas mediante las pruebas descritas antes.
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> ("Corynebacterium seminale")	Esta especie es un corineforme no lipofílico que ha sido aislado en pacientes varones con infecciones genitourinarias y de muestras de semen de pacientes con prostatitis.^{289,733} También se halló en el semen de cerdos y en secreciones uterinas y vaginales de cerdas.²¹⁸ El análisis filogenético de estas cepas definió un taxón distinto estrechamente relacionado con <i>T. otitidis</i>. Este microorganismo produce colonias blanco grisáceas a ligeramente amarillas y no hemolíticas en SBA (véase lámina en color 14-4G y H). Aunque algunos resultados de las pruebas fenotípicas son variables (reducción de nitrato, hidrólisis de esculina, ureasa), la mayoría de las cepas son fuertemente prueba de CAMP positivas y β-glucuronidasa (β-GLU) positivas (véase lámina en color 14-5A y B). En cromatografía gas-líquido de los medios de cultivo enviados, esta especie también produce ácidos propiónico, láctico y succínico a partir de glucosa. En general, las cepas suelen ser sensibles a β-lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina y vancomicina; algunas cepas son resistentes a tetraciclina, doxiciclina, eritromicina, clindamicina y algunas quinolonas (p. ej., ciprofloxacina, norfloxacina).^{289,396,733} Otro grupo de investigadores también describió este microorganismo y lo denominó "<i>Corynebacterium seminale</i>", pero se ha dado precedencia al nombre <i>C. glucuronolyticum</i>.⁷³³
<i>Corynebacterium imitans</i>	<i>C. imitans</i> ha sido aislado en cultivos faríngeos de pacientes con sospecha de difteria en Polonia.²⁹¹ Además del caso inicial, un varón de 5 meses de edad, se comunicaron luego otros siete casos, todos los cuales tuvieron contacto con el caso inicial. Se aisló un microorganismo "similar a <i>C. diphtheriae</i>" del caso inicial y de tres de los otros casos. Todas las cepas fueron negativas para la toxina diftérica tanto por pruebas con animales como por el método de Elek. Dos métodos de PCR independientes no pudieron demostrar la presencia de ninguna porción del gen <i>tox</i> en ninguna de las cepas. Como éstas no producían toxina diftérica, los autores creyeron que no eran la causa de la enfermedad y que

(Continúa)

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	habían equivocado el diagnóstico, aunque había ocurrido probablemente la transmisión persona a persona. <i>C. imitans</i> no es una especie lipofílica que pueda ser distinguida fácilmente de <i>C. diphtheriae</i>. A diferencia de esta última, <i>C. imitans</i> da pruebas débilmente positivas de pirazinamida, negativa de α-glucuronidasa y prueba de CAMP positiva, mientras que <i>C. diphtheriae</i> da pirazinamida negativa, α-glucuronidasa positiva y prueba de CAMP negativa. Las cuatro cepas de la comunicación inicial produjeron números de perfil idénticos en el API Coryne (2100324).²⁹¹ <i>C. imitans</i> pudo ser diferenciado de <i>C. striatum</i> y de <i>C. minutissimum</i>/<i>C. amycolatum</i> por la fermentación de la maltosa y la prueba de CAMP, respectivamente. Lactato y succinato son los únicos productos de la fermentación de la glucosa por <i>C. imitans</i>, mientras que tanto <i>C. amycolatum</i> como <i>C. diphtheriae</i> producen principalmente ácido propiónico. Las cuatro cepas descritas en la comunicación inicial fueron sensibles a los antibióticos, salvo aztreonam, clindamicina, eritromicina y azitromicina.²⁹¹ Véase el texto.
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	La descripción de <i>C. kroppenstedtii</i> se basa sobre una sola cepa humana que aislada en el esputo de una mujer de 82 años con enfermedad pulmonar.¹⁶⁷ El análisis de la pared celular puso de manifiesto la presencia de <i>meso</i>-DAP y arabinogalactano, y el análisis de secuencia de rRNA 16S apoyó la inclusión de este microorganismo en el género <i>Corynebacterium</i>. Sin embargo, esta especie carece de los ácidos micólicos de la pared celular, lo que la convierte junto con <i>C. amycolatum</i> en los únicos dos miembros del género que carecen de los ácidos micólicos de la pared celular. Los estudios recientes sugieren que este microorganismo tiene vinculación con la patogenia de la mastitis granulomatosa femenina.^{670,678} <i>C. kroppenstedtii</i> es una especie lipofílica que produce colonias grises, no pigmentadas, ligeramente secas o lisas en agar sangre. Las colonias suelen tener menos de 0,5 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. Este microorganismo da una prueba de esculina positiva, de ureasa y nitrato reductasa negativas, y la prueba de CAMP negativa. Se produce ácido a partir de glucosa, sacarosa y maltosa (reacción débil). Los biocódigos API Coryne para esta cepa son 2040105 o 2040125, según la interpretación de la reacción de maltosa. <i>C. kroppenstedtii</i> no crece a 42 °C. Las pruebas in vitro de la única cepa mostraron sensibilidad a penicilina, cefuroxima, clindamicina, eritromicina y vancomicina.¹⁶⁷
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	Durante una investigación de microorganismos involucrados en la patogenia de la vaginosis bacteriana. Funke y cols. aislaron un microorganismo corineforme antes no descrito en la vagina de una mujer de 32 años con este diagnóstico clínico.²⁹⁶ Esta cepa cumplía los criterios iniciales de ser miembro del género <i>Corynebacterium</i>, tenía una pigmentación amarilla intensa y mostró requerimientos de lípidos para su crecimiento. El metabolismo del microorganismo era oxidativo, no producía ácido a partir de hidratos de carbono y era ureasa positivo después de 24 horas en caldo de ureasa. El API Coryne produjo el mismo número de perfil que <i>C. urealyticum</i> (perfil #2101004). Sin embargo, <i>C. urealyticum</i> da rápidamente una reacción de ureasa positiva (el agar urea, las porciones en pico de flauta de Christianson se vuelven notablemente positivos en minutos) y no es pigmentado. Además, esta nueva cepa era ampliamente sensible a β-lactámicos, macrólidos, clindamicina y aminoglucósidos, mientras que <i>C. urealyticum</i> suele ser multirresistente a estos antibióticos. El papel de esta cepa, si es que existe alguno, en la patogenia de la vaginosis bacteriana es poco claro. Se ha propuesto el nombre <i>C. lipophiloflavum</i> para esta corinebacteria atípica.
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	Esta especie fue propuesta luego del examen genético de 51 cepas corineformes lipofílicas (13 cepas de referencia y 38 cepas clínicas) que mostraban patrones bioquímicos heterogéneos.⁷³¹ Se han aislado cepas de <i>C. macginleyi</i> principalmente en muestras oculares de pacientes con conjuntivitis y úlceras corneales.^{303,335,468} También se lo aisló en la orina de un paciente con un catéter permanente y en hemocultivos obtenidos de un paciente con sepsis relacionada con el catéter.^{226,918} Las cepas de <i>C. macginleyi</i> son similares a algunas cepas lipofílicas corineformes del grupo G-1 de los CDC. En SBA, el microorganismo forma colonias puntiformes después de 48 horas; en SBA con suplemento de Tween 80 al 0,1%, se producen grandes colonias marrón rojizas. Las concentraciones más altas de Tween 80 (1% frente a 0,1%) pueden ser algo inhibitorias del crecimiento de algunas cepas. <i>C. macginleyi</i> es fosfatasa alcalina positivo, pero es pirazinamidasa negativo (al igual que <i>C. diphtheriae</i>, <i>C. pseudotuberculosis</i> y <i>C. ulcerans</i>). Se produce ácido a partir de glucosa, sacarosa y manitol, y no se produce ácido propiónico a partir de la fermentación de la glucosa. En general, las cepas son susceptibles a una amplia gama de antibióticos.
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	Este microorganismo fue denominado antes <i>Bacterionema matruchotii</i> y trasladado al género <i>Corynebacterium</i> en 1983.¹⁶⁴ <i>C. matruchotii</i> es parte de la flora normal de los seres humanos y de los animales y ha sido aislado en raras ocasiones en casos de endoftalmítis y úlceras corneales en pacientes inmunodeprimidos.⁹⁵⁰ Aunque pueden aparecer en la tinción de Gram como bacterias corineformes típicas, también pueden aparecer con forma de "látigo" en la tinción y mostrar una ramificación rudimentaria.¹⁸⁸ Las colonias de <i>C. matruchotii</i> también son atípicas en comparación con otros corineformes, pequeñas y planas. <i>C. matruchotii</i> es no lipofílico, produce pirazinamidasa pero no fosfatasa alcalina, reduce nitrato a nitrito y suele ser esculina positivo. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y ribosa. El análisis reciente de varias cepas ATCC de <i>C. matruchotii</i> puso en evidencia que algunas eran en realidad miembros de la especie recién descrita <i>C. durum</i>.⁶¹ Aunque no están incluidas en la base de datos API Coryne, se ha observado que las cepas de <i>C. matruchotii</i> genuinas producen biocódigos API Coryne 7000325, 7010325 o 7050325. La cepa ATCC original de <i>C. matruchotii</i> (ATCC #43833) es distinta de las cepas de <i>C. matruchotii</i> verdaderas por análisis de secuencia de rDNA 16S. Esta cepa se denomina ahora "cepa similar a <i>C. matruchotii</i>" y arroja el biocódigo 2140325 en el API Coryne.⁶¹

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	<i>C. minutissimum</i> es una especie no lipofílica de importancia clínica incierta porque la mayoría de los casos comunicados no contienen suficientes datos fenotípicos como para descartar otras especies, sobre todo <i>C. amycolatum</i>.⁹⁴⁰ Desde el punto de vista histórico, <i>C. minutissimum</i> se asocia con eritrasma, una infección cutánea superficial caracterizada por pequeños parches maculares rojo parduscos, por lo general en las zonas intertriginosas. Las lesiones pueden ser pruriginosas y escamosas o la infección puede ser asintomática. Las comunicaciones de casos que implican a "<i>C. minutissimum</i>" como agente etiológico incluyen abscesos profundos recurrentes del tejido mamario, bacteriemia asociada con mieloma múltiple, infección de heridas quirúrgicas posdiscectomía/posfusión vertebral, pielonefritis pediátrica, absceso costochondral, sepsis polimicrobiana relacionada con catéter venoso central y peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{53 74 140 189 268 348 751} Van Bosterhaut y cols. comunicaron el aislamiento de cepas multirresistentes de "<i>C. minutissimum</i>" de hemocultivos en un hombre de 60 años sometido a tratamiento por una leucemia linfocítica, un paciente en hemodiálisis de 50 años y una mujer de 77 años en diálisis peritoneal por insuficiencia renal crónica.⁹⁰⁴ Era muy probable que estas cepas fueran <i>C. amycolatum</i>, dado que se produjo ácido propiónico a partir de la fermentación de la glucosa y el microorganismo era multirresistente a los antibióticos. Las verdaderas cepas de <i>C. minutissimum</i> crecen como colonias lisas, húmedas, blanco grisáceas y no hemolíticas en SBA, al contrario de las colonias cerosas de <i>C. amycolatum</i>.⁹⁸⁸ Desde el punto de vista fenotípico, este microorganismo se asemeja estrechamente a <i>C. aurimucosum</i>.⁹⁷⁶ Se produce ácido a partir de glucosa y maltosa; la mayoría de las cepas acidifican también la sacarosa. No se produce ácido a partir de glucógeno, inulina, lactosa, manosa, ribosa, sorbitol, trehalosa o xilosa. Las pruebas de pirazinamidasa, fosfatasa alcalina y leucina arilamidasa son positivas. Las cepas de <i>C. minutissimum</i> también producen acetoina, son PYR negativas y pocas veces son prueba de CAMP positivas. También son DNasa positivas y producen ácido láctico y succínico a partir de glucosa, mientras que las cepas de <i>C. amycolatum</i> son DNasa negativas y producen ácido láctico y propiónico a partir de glucosa.^{940,988}
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	<i>C. mucifaciens</i> ha sido aislada en muestras de sangre, heridas y líquido articular humanos.²⁹⁹ Las colonias de esta especie son inusuales ya que son no lipofílicas, brillantes, ligeramente amarillentas y muy mucoides, una característica infrecuente entre las corinebacterias, pero que se observa en los miembros del género <i>Rhodococcus</i>. En el API Coryne, estos microorganismos producen números de perfil que corresponden a varias especies lipofílicas (<i>C. jeikeium</i>, <i>C. bovis</i>, grupo G de los CDC) o a la especie fermentativa no lipofílica <i>C. striatum</i> (cuadro 14-10). <i>C. mucifaciens</i> produce pirazinamidasa y fosfatasa alcalina y no hidroliza esculina, urea ni gelatina. Es probable que el metabolismo oxidativo que muestra esta especie sea responsable de la falta de acidificación rápida de los hidratos de carbono presente en el panel ("galería") API Coryne. <i>C. mucifaciens</i> produce ácido en forma oxidativa a partir de glucosa y en ocasiones de sacarosa; la producción de ácido a partir de fructosa, manosa y glicerol ayuda a diferenciarla de <i>R. equi</i>. El análisis de la pared celular confirmó la relación con el género <i>Rhodococcus</i>. También se examinaron las ocho cepas de <i>C. mucifaciens</i> descritas en la comunicación original para sensibilidad a los antibióticos.²⁹⁹ Siete de las ocho eran sensibles a los β-lactámicos (cefazolina, penicilina) y todas eran sensibles a los glucopéptidos (teicoplanina y vancomicina) y los aminoglucósidos. Las sensibilidades de estas cepas a las tetraciclinas, los macrólidos (eritromicina, azitromicina, claritromicina), la clindamicina y las quinolonas fueron variables. Las ocho cepas fueron resistentes a aztreonam, cefetamet, ceftibuteno y fosfomicina.
<i>Corynebacterium nigricans</i>	<i>C. nigricans</i> es una especie de <i>Corynebacterium</i> inusual con pigmento negro que ha sido aislado en el aparato genital femenino humano. Estas cepas se han asociado con complicaciones del embarazo, como aborto espontáneo y trabajo de parto prematuro.^{803,804} Desde el punto de vista morfológico, las colonias de <i>C. nigricans</i> son negras, adherentes y tienden a "cavar en" el agar. Este microorganismo debe ser diferenciado de las cepas con pigmento negro grisáceo del grupo 4 de los CDC, que se asemejan a especies de <i>Rothia</i> más estrechamente que las corinebacterias. Las colonias de <i>C. nigricans</i> miden unos 2-3 mm de diámetro después de 48 horas de incubación y son no lipofílicas. Esta especie fermenta glucosa, maltosa y sacarosa; algunas cepas fermentan glucógeno o ribosa. Aunque las reacciones de pirazinamidasa y fosfatasa alcalina son variables, la reducción de nitrato y la hidrólisis de esculina, urea y gelatina son negativas. En el API Coryne, <i>C. nigricans</i> produce los biocódigos 0000125, 2000125 y 2100327. Estos códigos se corresponden con identificaciones de baja coincidencia para <i>C. striatum</i>, <i>C. amycolatum</i>, <i>C. minutissimum</i> y grupos G y F-1 de los CDC, pero la morfología de las colonias de <i>C. nigricans</i> es suficientemente diferente como para que la identificación no constituya un problema. Las cepas de bacterias del grupo 4 de los CDC reducen el nitrato e hidrolizan esculina y gelatina.⁸⁰³ <i>C. nigricans</i> también está relacionado a nivel de especie con variantes de pigmentación negra de <i>C. aurimucosum</i>.²⁰²
<i>Corynebacterium propinquum</i>	Esta especie nueva incluye cepas que antes pertenecían al grupo ANF-3 de los CDC.⁷²⁵ Todas estas cepas no lipofílicas han sido aisladas en muestras respiratorias o en sangre humana, que incluyen un caso de endocarditis de válvula aórtica nativa.⁶⁷⁹ El microorganismo está relacionado filogenéticamente con <i>C. pseudodiphtheriticum</i>. Las colonias en SBA tienen 1-2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación, son de color hueso y secas, con bordes enteros. No se hidroliza esculina ni urea, y las cepas producen de forma variable pirazinamidasa y fosfatasa alcalina. Al igual que <i>C. pseudodiphtheriticum</i>, <i>C. propinquum</i> es asacarolítica, pero las dos pueden ser diferenciadas por la producción de ureasa por parte de <i>C. pseudodiphtheriticum</i>. Además, <i>C. propinquum</i> puede ser diferenciado de <i>C. afermentans</i> subespecie <i>fermentans</i> por la capacidad del primero para reducir nitrato y de <i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i> tanto por la reducción de nitrato como por la falta de requerimientos de lípidos. No existen datos disponibles acerca de la sensibilidad a los antibióticos de esta especie.

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i> <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Véase el texto. <i>C. pseudotuberculosis</i> (antes denominado <i>Corynebacterium avis</i>) produce linfadenitis caseosa en ovejas, vacas y otros rumiantes pequeños.⁹⁵¹ También se ha demostrado que este microorganismo causa aborto o mortinatos en ovejas con infección experimental y foliculitis en caballos. La mayoría de las infecciones humanas asociadas con <i>C. pseudotuberculosis</i> se han comunicado entre pastores de ovejas en Australia o en carniceros y, como en las infecciones animales, se han presentado como linfadenitis aguda o crónica.^{110,608,672} Se describió un único caso de linfadenopatía cervical granulomatosa supurada debida a <i>C. pseudotuberculosis</i> en un habitante de la ciudad (Seattle) que tenía antecedentes de ingerir leche de vaca y de cabra cruda.³⁴⁵ En estas infecciones humanas, fue necesario el drenaje y la escisión del/os ganglio/s linfático/s afectado/s y la mayoría de los pacientes tenían secreción persistente o recurrente desde el sitio de la herida durante períodos prolongados. Debido al lento proceso de cicatrización, la mayoría de los pacientes fueron tratados con varios antibióticos, como penicilina G, tetraciclina, eritromicina, sulfisoxazol y penicilinas antiestafilocócicas. En 1978 se comunicó un caso inusual de neumonía en un estudiante de medicina veterinaria de 28 años causado por <i>C. pseudotuberculosis</i>.⁴⁸⁷ Este paciente había trabajado con el microorganismo en su clase de microbiología veterinaria durante las 4 semanas antes del inicio de los síntomas pulmonares y también había estado expuesto a caballos "enfermos" en la práctica. <i>C. pseudotuberculosis</i> es miembro del "grupo de <i>C. diphtheriae</i>", que también incluye <i>C. diphtheriae</i> y <i>C. ulcerans</i>. <i>C. pseudotuberculosis</i> también ha sido transformado en una especie productora de toxina diftérica por una infección experimental y lisogenización con el β-corinéfago, pero no se han aislado cepas lisogenizadas naturales. Todos estos microorganismos son pirazinamidasa negativos (al contrario de la gran mayoría de las especies de <i>Corynebacterium</i>) y producen actividad de cistinasa, como lo demuestra la producción de halos pardos alrededor de las colonias en medio de Tinsdale modificado.^{616,853} <i>C. pseudotuberculosis</i> es ureasa positivo y nitrato reductasa y fosfatasa alcalina variable y difiere de <i>C. ulcerans</i> en que no produce ácido a partir de glucógeno ni trehalosa y no hidroliza la gelatina. A diferencia de <i>C. ulcerans</i> y <i>A. haemolyticum</i>, <i>C. pseudotuberculosis</i> es prueba de CAMP inversa positivo. En la comunicación sobre 10 casos de linfadenitis humana debida a <i>C. pseudotuberculosis</i> publicada por Peel y cols., todas las cepas produjeron un perfil en el API Coryne #0111324, lo que indicó una reacción positiva para fosfatasa alcalina, α-glucosidasa, ureasa, glucosa, maltosa y ribosa.⁶⁷² Gran parte de la investigación relacionada con <i>C. pseudotuberculosis</i> en los últimos años se ha concentrado sobre el desarrollo de pruebas diagnósticas para linfadenitis caseosa y una vacuna para prevenirla en los criadores de ovejas y cabras.^{215,684} Estos microorganismos suelen ser sensibles a penicilinas, macrólidos, tetraciclinas, cefalosporinas, quinolonas y rifampicinas; la mayoría son resistentes a aminoglucósidos, nitrofuranos y polimixina.⁴⁶⁹
<i>Corynebacterium riegeli</i>	Esta especie recién descrita ha sido aislada en muestras de orina de mujeres con síntomas de infección urinaria y en hemocultivos.³⁰⁰ Se aislaron cepas en orina de mujeres de 21 a 62 años sin enfermedades subyacentes. Los microorganismos estaban presentes en cantidades importantes ($> 100\,000$ UFC/mL). Las cepas de <i>C. riegeli</i> son no lipofílicas y producen colonias pegajosas brillantes y blancas en SBA (véase lámina en color 14-5E). Son fuertemente ureasa positivas (como <i>C. urealyticum</i>) y se observan reacciones positivas en las porciones inclinadas de urea de Christensen dentro de los 5 minutos después de la inoculación (véase lámina en color 14-5F). Una característica inusual de esta especie es que las cepas producen ácido lentamente a partir de maltosa, pero no se forma ácido a partir de glucosa. Estas reacciones atípicas ocurren con medios convencionales (p. ej., hidratos de carbono sobre base de CTA) y con la tira de API Coryne. Los números de perfil de API Coryne para <i>C. riegeli</i> son 0101224, 2001224 y 2101224 (véase lámina en color 14-5G y H). Las cepas son sensibles a penicilina, cefalotina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina, y son resistentes a cefetamet, ceftibuteno y fosfomicina.³⁰⁰
<i>Corynebacterium sanguinis</i>	Hasta la fecha, esta nueva especie no lipofílica sólo ha sido aislada en hemocultivos.²⁹⁴ Las colonias de este microorganismo en SBA tienen 1-2 mm de diámetro después de 48 horas de incubación, son lisas, secas y amarillentas. Las pruebas de pirazinamidasa, fosfatasa alcalina y PYR son positivas, y la prueba de CAMP es negativa. El microorganismo fermenta lentamente glucosa y ribosa (en el API Coryne) pero ningún otro hidrato de carbono. <i>C. sanguinis</i> es nitrato, ureasa, esculina y prueba de CAMP negativo. En el API Coryne, todas las cepas producen el número de biocódigo 6100304.
<i>Corynebacterium simulans</i>	<i>C. simulans</i> es una nueva especie que ha sido aislada en un absceso en el pie, una biopsia de ganglio linfático y un forúnculo.⁹³⁶ Este microorganismo es una especie fermentadora no lipofílica fenotípicamente similar a <i>C. minutissimum</i> y <i>C. striatum</i>, pero filogenéticamente distinta sobre la base de secuencias de rRNA 16S. Las cepas de <i>C. simulans</i> crecen como colonias cremosas, brillantes, blanco grisáceas y no lipofílicas que tienen 1-2 mm de diámetro después de 48 horas. <i>C. simulans</i> es nitrato positivo y maltosa negativo (<i>C. minutissimum</i> es nitrato negativo y maltosa positivo) y no fermenta el etilenglicol ni crece a 20 °C (<i>C. striatum</i> fermenta el etilenglicol y crece a 20 °C). Ésta es la única especie de <i>Corynebacterium</i> que puede reducir nitrato a nitrito y luego reducir además nitrito a gas nitrógeno, de modo que una prueba de nitrito negativa debe ser evaluada con cinc para confirmar esta reacción. Además, algunas cepas pueden ser catalasa negativas. En el API Coryne, <i>C. simulans</i> produce varios biocódigos (cuadro 14-10). No existen datos sobre sensibilidad a los antibióticos de <i>C. simulans</i>.

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium singulare</i>	La descripción de <i>C. singulare</i> se basa sobre dos cepas humanas (una del semen, otra de la sangre). ⁷³⁴ Ambas tenían todas las características quimiotaxonómicas claves del género <i>Corynebacterium</i> y se asemejaban a <i>C. minutissimum</i> por características morfológicas y bioquímicas. Las colonias de <i>C. singulare</i> son convexas, de bordes lisos, cremosas y de color gris blancuzco. Sin embargo, a diferencia de <i>C. minutissimum</i> , las dos cepas son ureasa positivas. El examen de otros taxones ureasa positivos dentro del género confirmó que las dos cepas eran en efecto distintas de ellos por varias características, como una mayor capacidad fermentativa, la falta de reducción de nitrato y la ausencia de β -glucuronidasa. El microorganismo puede ser diferenciado de <i>C. amycolatum</i> por su falta de producción de ácido propiónico a partir de glucosa. En el API Coryne, el microorganismo genera un código octal único (biocódigo 6101125). Sobre la base de estos criterios, se ha propuesto el nombre <i>C. singulare</i> . ⁷³⁴ No existen datos de sensibilidad a los antibióticos para este especie.
<i>Corynebacterium striatum</i>	Véase el texto.
<i>Corynebacterium sundsvallense</i>	<i>C. sundsvallense</i> ha sido aislado en hemocultivos, una muestra vaginal y el cultivo de una herida en la ingle. ¹⁶⁵ El aspecto en la tinción de Gram de este microorganismo es singular, ya que se pueden observar botones o "protrusiones" en los extremos de algunos de los bacilos. El microorganismo es no lipofílico y produce colonias de color amarillo, pegajosas y adherentes en SBA. El microorganismo fermenta lentamente glucosa, maltosa y sacarosa, pero no lactosa, manitol, ribosa, xilosa o amigdalina. No se reduce el nitrato y no se hidroliza la esculina, pero se produce ureasa y la reacción de α -glucosidasa es positiva (cuadros 14-9 y 14-10). Los ácidos láctico y succínico son los productos principales de la fermentación de la glucosa. No existen datos de sensibilidad a los antibióticos sobre este microorganismo.
<i>Corynebacterium thomssenii</i>	La descripción de la especie de este microorganismo se basa sobre dos cepas similares aisladas en muestras de líquido pleural de un hombre de 56 años con insuficiencia renal crónica, accidente cerebrovascular y neumonía. ⁹⁸⁷ <i>C. thomssenii</i> es un microorganismo no lipofílico de crecimiento lento que produce colonias pegajosas y adherentes de menos de 0,5 mm de diámetro incluso después de 48 horas de incubación. El microorganismo es ureasa positivo, DNasa positivo, e hidrólisis de nitrato y de esculina negativo. Se produce lentamente ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa. Al contrario de todas las otras especies de <i>Corynebacterium</i> , las cepas de esta especie son fuertemente <i>N</i> -acetil- β -glucosaminidasa positivas, y producen el número de perfil 2121125 en el API Coryne. Las cepas de <i>C. thomssenii</i> son sensibles a penicilina, ampicilina, cefazolina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, rifampicina y vancomicina y resistentes a aztreonam, cefetamet, ceftibuteno y fosfomicina. ⁹⁸⁷
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	<i>C. ulcerans</i> es un miembro no lipofílico del "grupo de <i>C. diphtheriae</i> ", junto con <i>C. diphtheriae</i> y <i>C. pseudotuberculosis</i> . En años anteriores, la validez de <i>C. ulcerans</i> como una especie de <i>Corynebacterium</i> separada fue controversial. Sin embargo, en 1995, el estado de especie de este microorganismo fue reafirmado por Riegel y cols., ⁷³⁰ quienes observaron que los tres microorganismos que comprendían el "grupo de <i>C. diphtheriae</i> " eran taxones separados y que los biotipos y las biovariedades dentro de cada especie estaban estrechamente relacionados desde el punto de vista genómico. Los análisis de las secuencias de rRNA 16S mostraron que <i>C. ulcerans</i> tiene un conjunto de semejanzas estrechas con <i>C. pseudotuberculosis</i> y en efecto es una especie separada. Además, se ha demostrado que la mayoría de las cepas de <i>C. ulcerans</i> (y algunas de <i>C. pseudotuberculosis</i>) producen toxina diftérica. En un estudio, 25 de 37 cepas de <i>C. ulcerans</i> y 1 de 14 cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> produjeron pruebas de Elek positivas para toxina diftérica. ³⁶⁷ Además, todas las cepas con prueba de Elek positiva y dos cepas con prueba negativa produjeron resultados positivos en la hibridación con una sonda de DNA para el gen estructural <i>tox</i> de la toxina diftérica. Los análisis de los fragmentos obtenidos por endonucleasas de restricción mostraron que las cepas de <i>C. diphtheriae</i> y <i>C. ulcerans</i> comparten una homología considerable en las pruebas de Southern blot; estos fragmentos homólogos incluyen el sitio de integración de la familia β de corinefagos. Wong y Groman también demostraron que las toxinas diftéricas producidas por cepas de <i>C. ulcerans</i> y <i>C. pseudotuberculosis</i> eran similares en peso molecular y estructura inmunológica, en actividad ribosiladora de ADP enzimática y en la regulación de su síntesis por el hierro. ⁹⁶¹ Las cepas de <i>C. ulcerans</i> también pueden producir una segunda toxina -fosfolipasa D- que es idéntica a la producida por <i>C. pseudotuberculosis</i> . ⁵⁷ Esta toxina afecta la esfingomielina y altera la permeabilidad de la membrana de las células diana. <i>C. ulcerans</i> es una causa rara de infecciones tanto en animales como en el hombre. Causa mastitis en ganado vacuno, primates y otros animales, y se ha aislado en leche de vaca no pasteurizada y otros productos lácteos. ¹⁰⁰ También ha sido aislado en ardillas de tierra salvajes, en las cuales provoca dermatitis gangrenosa, toxemia y sepsis. ⁶⁵² Las infecciones humanas ocurrieron casi siempre en áreas rurales en individuos con antecedentes de exposición a animales o ingestión de productos lácteos crudos. ¹⁰⁰ <i>C. ulcerans</i> ha sido aislada en pacientes con enfermedades indistinguibles de la difteria clásica, con presencia tanto de secuelas cardíacas como neurológicas o sin ella. ^{208,396,482} En 1985, se comunicó un caso de neumonía por <i>C. ulcerans</i> finalmente mortal en un hombre de Baltimore de 78 años que un año antes había recibido terapia radiante en el tórax superior derecho para el tratamiento de un carcinoma pulmonar de células escamosas con metástasis en las costillas. ⁸⁰⁵ En este caso, el microorganismo era sensible a penicilina, ampicilina, cefalotina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y gentamicina. Se comunicó otro caso de infección pulmonar por <i>C. ulcerans</i> en un hombre de 53 años que presentó múltiples nódulos pulmonares bilaterales sugestivos de carcinoma metastásico. ²¹⁶ El examen histopatológico de estos nódulos puso en evidencia una inflamación necrosante granulomatosa y el cultivo dio una cepa no productora de toxina diftérica de <i>C. ulcerans</i> . En 1996, se comunicó un caso de difteria respiratoria debida a <i>C. ulcerans</i> toxigénico en una mujer de 54 años de Terre Haute, Indiana. ¹⁴⁴ La paciente, que nunca había sido inmunizada contra la difteria, fue tratada con ceftriaxona, eritromicina y 40 000 unidades internacionales (UI) de antitoxina

(Continúa)

Recuadro 14-2 Miembros del género *Corynebacterium* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Corynebacterium urealyticum</i> <i>Corynebacterium xerosis</i>	difétrica equina, y tuvo una rápida respuesta clínica. El cultivo de muestras clínicas (hisopados faríngeos y fragmentos de pseudomembrana difétrica) confirmó la presencia de <i>C. ulcerans</i> y la toxigenicidad de esta cepa fue demostrada tanto mediante un ensayo de inmunoprecipitación de Elek como por un ensayo de PCR para toxina difétrica. Las cepas de <i>C. ulcerans</i> productoras de toxina también han causado casos de "difteria" cutánea.⁹³¹ En 2002, Wellingshausen y cols. describieron un caso mortal de sinusitis necrosante en un anciano debido a <i>C. ulcerans</i> toxigénico.⁹⁴⁷ Las colonias de <i>C. ulcerans</i> son blanco grisáceas, secas y de aspecto ceroso, con un área leve difusamente β-hemolítica debajo de las colonias individuales y a su alrededor. El microorganismo es no lipofílico y las colonias tienen 1-2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. <i>C. ulcerans</i> es pirazinamidasa negativo y fosfatasa alcalina y ureasa positivo. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, manosa, arabinosa, ribosa y glucógeno. Al igual que <i>C. pseudotuberculosis</i>, <i>C. ulcerans</i> es prueba de CAMP inversa positivo y produce ácido propiónico como producto de fermentación de la glucosa. Véase el texto. Hasta hace poco se creía que <i>C. xerosis</i> era el corineforme más frecuente sobre la piel y, en consecuencia, la cepa clínica más frecuente perteneciente al género <i>Corynebacterium</i>. Datos sustanciales indican ahora que la mayoría de las cepas clínicas de "<i>C. xerosis</i>" son en realidad <i>C. amycolatum</i> (véase explicación anterior sobre este microorganismo).²⁹⁷ El verdadero <i>C. xerosis</i> produce colonias amarillas granulosas que contienen ácidos micólicos en sus paredes celulares, son LAP y α-glucosidasa positivas y producen ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa, mientras que las cepas de <i>C. amycolatum</i> producen colonias gris blanquecinas, secas y cerosas; carecen de ácidos micólicos; son negativas o débilmente positivas para LAP; son α-glucosidasa negativas y producen ácido propiónico a partir de la fermentación de la glucosa.^{297,315,940} A diferencia de <i>C. striatum</i>, las verdaderas cepas de <i>C. xerosis</i> no hidrolizan tirosina ni fermentan azúcares lentamente (72-96 horas). La bibliografía contiene varias comunicaciones de casos referentes a <i>C. xerosis</i> como agente etiológico en distintos tipos de infecciones humanas. En estas comunicaciones, a menudo se observó que las cepas eran multiresistentes a los antibióticos. Estas cepas multiresistentes eran en realidad <i>C. amycolatum</i> y no <i>C. xerosis</i>, dado que las cepas verdaderas de la última especie son bastante raras y se sabe que tienen una sensibilidad amplia. Debido a su aislamiento frecuente en el laboratorio clínico, <i>C. xerosis</i> fue eliminado de la versión 2 de la base de datos API Coryne. Sin embargo, ciertos biocódigos -2110325 y 3110325- corresponden a las verdaderas cepas de <i>C. xerosis</i>.
<i>Corynebacterium</i> grupo F-1	La bacteria corineforme del grupo F1 de los CDC es un corineforme fermentador lipofílico que puede ser separado en dos grupos de homología de DNA fenotípicamente indistinguibles. Como corineforme ureasa positivo que requiere lípidos, el grupo F1 de los CDC se asemeja estrechamente a la especie con requerimientos de lípido que recientemente ha recibido el nombre <i>C. macginleyi</i>.⁷³¹ Sin embargo, las cepas del grupo F1 de los CDC son pirazinamidasa positivas, fosfatasa alcalina negativas y fermentan glucosa, maltosa y sacarosa, mientras que las cepas <i>C. macginleyi</i> son pirazinamidasa negativas, fosfatasa alcalina positivas y fermentan glucosa y sacarosa, pero no maltosa. El grupo F1 corineforme de los CDC ha sido aislado principalmente en el aparato urogenital. En 1992, se informó un caso de formación de cálculos de estruvita en un paciente de 40 años asociado con el grupo F1 de los CDC.²²⁴ El microorganismo estaba presente en la orina en cantidades importantes (> 10⁸ UFC/mL) y era sensible a las tetraciclinas. El tratamiento del paciente con doxiciclina condujo a la resolución de la infección y el cese de la formación de cálculos.
<i>Corynebacterium</i> grupo G	La bacteria corineforme del grupo F de los CDC ha sido aislada en muestras del humor vítreo, la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el aparato genitourinario (véase lámina en color 14-6C y D).^{700,731} Las cepas pertenecientes al grupo F son lipofílicas y el crecimiento es estimulado por Tween-80. En 1983, Austin y Hill comunicaron un caso de endocarditis mortal de válvula protésica asociado con el grupo F de los CDC en un hombre de 40 años.⁴⁵ La cepa era sensible a ampicilina, cefalotina, cefamandol, cefoxitina, gentamicina y vancomicina. También se aislaron corineformes del grupo G en hemocultivos de un paciente de 74 años que se sometió a hemodiálisis de mantenimiento debido a insuficiencia renal crónica.⁴⁸⁴ Esta cepa también era uniformemente sensible a los antibióticos.
<i>Corynebacterium</i> grupos F2 e I	Se ha demostrado que los grupos F2 e I de los CDC corresponden a cepas de <i>C. amycolatum</i>.^{261,574,940}

importante para evitar las reacciones falsas negativas, y puede ser necesaria una incubación más prolongada para detectar reacciones de fermentación de hidratos de carbono de algunas especies (p. ej., especies de *Arthrobacter*).³⁰⁴

En varias de las comunicaciones sobre nuevas especies de *Corynebacterium*, el API Coryne se utilizó para caracterizar fenotípicamente las nuevas cepas y se generaron biocódigos a partir de los patrones de reacciones positivas y negativas. Algunos biocódigos para nuevas especies dan identificaciones para especies ya incluidas en la base de datos. En estos casos, se deben realizar pruebas adicionales para llegar a la identificación correcta. Sin embargo, algunas nuevas especies generan biocódigos que son únicos.

El Rapid CB-Plus utiliza el formato de cubeta similar a otros sistemas de identificación Remel e incluye 18 celdas de pruebas únicas. Para inocular el sistema, se prepara una suspensión del microorganismo que crece en SBA al 5% (triptica-soja, Columbia o base BHI) equivalente a un estándar de turbidez de McFarland #4 en 2 mL de líquido de inoculación Rapid. Se vierte o pipetea la suspensión en la cubeta y se inoculan simultáneamente las 18 celdas mediante manipulaciones manuales de la cubeta. El sistema se incuba durante 4-6 horas a 35-37 °C en una incubadora sin CO₂. Se agregan los reactivos de nitrato A y B a la celda NIT y un segundo reactivo (Reactivo Rapidx CB Plus) a las celdas de prueba de arilamidasa. Treinta segundos a un minuto después de agregar el reactivo, se leen

las reacciones de color en las celdas y se genera un microcódigo numérico. Se consulta el Compendio de Códigos RapID CB Plus para la identificación. Las evaluaciones de RapID CB-Plus han comunicado que el sistema identifica correctamente el 88.5-95% de las especies de *Corynebacterium*, sobre todo las halladas comúnmente en el laboratorio clínico (*C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum* y grupo G de los CDC).^{305,438} También se identificaron correctamente las cepas de algunos taxones recién descritos (p. ej., *Dermabacter hominis*, especies de *Microbacterium*, *Turicella otitidis*, especies de *Cellulomonas*, *Brevibacterium casei* y *Arthrobacter cummingsii*). Las dificultades con este sistema estaban relacionadas con la interpretación de algunas de las reacciones de acidificación de hidratos de carbono y aminopeptidasa.

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Corynebacterium* y bacterias corineformes

En varias publicaciones se informó la sensibilidad a los antibióticos de muchos de los corineformes recién descritos. En estos informes, se han utilizado procedimientos de dilución en agar y de dilución en microcaldo.^{306,347,583,584,832} Tanto Soriano y cols., como Funke y cols. utilizaron un procedimiento de dilución en agar con agar de Mueller-Hinton con suplemento de sangre de camero al 5% y un inóculo de 10^4 UFC por microorganismo.^{306,832} Martínez-Martínez y cols. emplearon un procedimiento de microdilución en caldo de Mueller-Hinton con suplemento de cationes que contenía Tween 80 al 0,5% y un inóculo de 5×10^4 UFC por celda de microtítulo.^{583,584} Las placas o bandejas se incubaron a 35 °C durante 18-24 horas en condiciones aerobias. Como no existe ningún valor crítico

determinado por CLSI para las pruebas de sensibilidad de las especies de *Corynebacterium* u otros corineformes, los "valores críticos" para la interpretación de las CIM obtenidas mediante los métodos anteriores fueron definidos por los investigadores en estos estudios. En el caso de penicilina, ampicilina, amoxicilina-clavulanato y oxacilina, se utilizaron los valores críticos determinados por CLSI para los estafilococos. En el cuadro 14-8 se mencionan los valores críticos utilizados para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de las corinebacterias y otros corineformes de la literatura.^{306,832} Algunos investigadores también han utilizado los métodos Etest para determinar la sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Corynebacterium* y los corineformes similares a *Arcanobacterium haemolyticum*.^{129,583} Utilizando Etest, la concordancia con la CIM por dilución en caldo varió con el agente por evaluar. El acuerdo entre los métodos varió del 88,2% para cefalotina y rifampicina hasta el 65,4% para amikacina y el 31,1% para vancomicina.⁵⁸³ En la actualidad, el CLSI ha convocado a un nuevo subcomité para preparar recomendaciones para los laboratorios clínicos que evalúan bacilos grampositivos corineformes y bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales. Estas recomendaciones tratarán los métodos más apropiados para uso, los medios y las condiciones de incubación, y los valores críticos para determinar la sensibilidad a los antibióticos de estos microorganismos.

Miembros del género *Corynebacterium* aislados en seres humanos

El género *Corynebacterium* contiene gran cantidad de especies que han sido aisladas en muestras clínicas humanas, animales y el medioambiente. *C. diphtheriae*, un patógeno clásico, es la causa de la difteria. Otras especies, como *C. jeikeium*,

Cuadro 14-8 Valores críticos para la determinación de sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Corynebacterium* y otras bacterias corineformes^{306,832}

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE, µg/mL	RESISTENTE, µg/mL
Penicilina	≤ 0.12	> 0.12
Ampicilina	≤ 0.25	> 0.25
Amoxicilina/clavulanato	≤ 4/2	> 4/2
Oxacilina	≤ 2	> 2
Cefalotina	≤ 8	> 8
Ceftriaxona	≤ 8	> 8
Cefuroxima	≤ 8	> 8
Cloranfenicol	≤ 8	> 8
Clindamicina	≤ 0.5	> 0.5
Eritromicina	≤ 0.5	> 0.5
Ciprofloxacina	≤ 1	> 1
Gentamicina	≤ 4	> 4
Rifampicina	≤ 1	> 1
Imipenem	≤ 4	> 4
Tetraciclina	≤ 4	> 4
Vancomicina	≤ 4	> 4
Teicoplanina	≤ 8	> 8
Nitrofurantoina	≤ 1	> 1

C. striatum, *C. pseudodiphtheriticum* y *C. urealyticum*, se aíslan más a menudo que las otras especies de *Corynebacterium* y se comportan principalmente como agentes oportunistas en pacientes inmunodeprimidos o debilitados. *C. amycolatum* es la especie aislada con mayor frecuencia en el laboratorio clínico y puede representar un contaminante cutáneo o un agente importante de infección. También es difícil diferenciar esta especie de otras con características bioquímicas similares.

C. amycolatum, *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum* y *C. urealyticum* se explican más adelante. En el recuadro 14-2 se enumeran las otras especies de *Corynebacterium*, se describe su importancia clínica y se incluye información útil sobre la identificación de estos microorganismos. En el cuadro 14-9 se exponen las características bioquímicas fenotípicas de las especies de *Corynebacterium* aisladas en muestras clínicas humanas. El cuadro 14-10 es un compendio de los biocódigos de API Coryne para las especies de *Corynebacterium* no incluidas aún en la base de datos API Coryne. Estos biocódigos se han obtenido de las descripciones originales de las distintas especies si el API Coryne fue incluido como parte de la caracterización de los microorganismos.

CORYNEBACTERIUM AMYCOLATUM

En 1988, Collins y cols. informaron sobre una nueva especie de *Corynebacterium* aislada en la piel humana.¹⁶⁶ Aunque meso-DAP, arabinosa y galactosa estaban presentes en la pared celular, este nuevo microorganismo carecía de los ácidos cori-nemicólicos que se encuentran en todas las otras especies de *Corynebacterium*. A pesar de esta separación de un criterio importante utilizado para asignar a los bacilos grampositivos al género *Corynebacterium*, el análisis de secuencia de rRNA 16S apoyó la inclusión de este microorganismo. Éste fue denominado *Corynebacterium amycolatum* ("sin ácidos micólicos") y aceptado como especie válida de *Corynebacterium* en 1988.

Varios estudios indican que es probable que *C. amycolatum* haya sido mal identificado por los laboratorios clínicos durante muchos años como *C. striatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum* y grupo I-1 de los CDC.^{60,297,940,988} En los casos típicos, *C. amycolatum* produce colonias planas, secas, gris blanquecinas, mate o cerosas en SBA (véase lámina en color 14-3C). Las áreas de crecimiento confluentes en medios de agar pueden adquirir un aspecto rugoso con una incubación prolongada. Esta morfología de las colonias se diferencia con facilidad de aquellas de *C. minutissimum* o *C. striatum*, que siempre producen colonias húmedas blanco grisáceas. *C. amycolatum* da pruebas positivas de pirazinamidasa y fosfatasa alcalina, y la mayoría de las cepas reducen también el nitrato a nitrito. *C. amycolatum* produce ácido a partir de glucosa y ribosa, y la mayoría de las cepas también fermentan la maltosa y la sacarosa. Algunas pueden ser ureasa positivas y PYR positivas. Todas producen ácido propiónico como principal producto final del metabolismo de la glucosa. En el cuadro 14-9 se muestran las pruebas adicionales que se pueden utilizar para diferenciar *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. minutissimum* y *C. xerosis*.^{60,717,940,942,988} Los números frecuentes del perfil API Coryne son 3100325, 3100125, 7100125, 3100365, 4100325 y 3040121 (véase lámina en color 14-3D y E); estos números suelen identificar a los microorganismos como *C. amycolatum*/*C. striatum*, lo que requiere estas pruebas adicionales para la identificación definitiva. También se pueden utilizar métodos quimiotaxonómicos para resolver la identificación de estas especies.⁹²³

C. amycolatum ha sido aislado en infecciones humanas importantes. Se ha comunicado una cepa confirmada con qui-

miotaxonomía como causa de sepsis mortal en un lactante prematuro.⁷⁹ Desde entonces *C. amycolatum* ha sido aislado en infecciones relacionadas con catéteres, infecciones de heridas quirúrgicas, quistes pilonidales, mastitis, endocarditis de válvulas nativas y hospitalarias, infección de electrodos de cardioversores y artritis séptica luego de sepsis de injertos vasculares.^{161,202,250,494,670,910} Las cepas son a menudo multirresistentes a los antibióticos, como β -lactámicos, macrólidos, clindamicina, aminoglucósidos, quinolonas y rifampicina.^{729,826,832} Alrededor del 40% de 101 cepas de *C. amycolatum* evaluadas en un estudio reciente fueron resistentes a los β -lactámicos (CIM > 64 μ g/mL).³⁰⁶ Además, las CIM de ciprofloxacina, cloranfenicol, clindamicina y eritromicina en las cuales se inhibía el 50% de las cepas eran mayores que los valores críticos de sensibilidad para los estafilococos. También se observó en algunas resistencia a la gentamicina. Todas fueron sensibles a la tetraciclina y la vancomicina.³⁰⁶

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

C. diphtheriae es la causa de la enfermedad clásica difteria, infección relativamente infrecuente en los Estados Unidos, aunque se sigue viendo en los países en vías de desarrollo.^{31,921} La infección se previene mediante la inmunización amplia de las poblaciones en riesgo con toxoide diftérico; el uso de este material en otros países ha conducido a disminuciones espectaculares en la incidencia de difteria también en esas localidades. Si bien la inmunización amplia en muchos países fue exitosa, la difteria sigue siendo un agente infeccioso letal y resurgente, sobre todo dentro de ciertas partes del mundo, que incluyen Europa Oriental, sudeste de Asia, Sudamérica y el subcontinente de la India.⁴⁷³ La importación de *C. diphtheriae* toxigénico de los países en vías de desarrollo donde la difteria sigue siendo endémica plantea una amenaza constante y ha explicado la mayoría de los casos de difteria de los últimos en los países industrializados. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles de 1993 del primer caso de difteria mortal ocurrido en el Condado de Dade, Florida, en más de veinte años, el viaje reciente a Haití entre los contactos del caso inicial sugirió que el microorganismo podría haber sido importado.²⁵⁹ Además, varias comunicaciones han documentado ahora la importancia clínica de las cepas no toxigénicas de *C. diphtheriae*.^{370,374,426,952,990} Estos microorganismos han sido aislados en cultivos faríngeos y lesiones cutáneas de personas sin hogar, adictos a drogas intravenosas y se ha informado también bacteriemia y endocarditis debidas a cepas no toxigénicas de *C. diphtheriae* en estos pacientes.

En la actualidad, el Immunization Practices Advisory Committee (Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización) del sistema de Salud Pública de los Estados Unidos recomienda administrar tres dosis intramusculares de DPT (toxoides diftérico, vacuna acelular contra la tos ferina y toxoide tetánico) a intervalos de 4 a 8 semanas a todos los niños comenzando a las 6-8 semanas de edad, con una cuarta dosis administrada 6-12 meses después de la tercera dosis. Los niños que han completado la serie primaria de inmunizaciones deben recibir una dosis de refuerzo en el momento del ingreso escolar. Para los niños de 7 años y mayores, se debe administrar toxoide diftérico sólo dos veces con un intervalo de 4 a 8 semanas, y se administra una tercera dosis 6 a 12 meses más tarde. Los individuos mayores deben recibir un refuerzo de toxoide diftérico a intervalos de 10 años. Las personas que viajan a regiones endémicas para la difteria también deben recibir inoculaciones de refuerzo. Además, las personas que están convaleciendo de la

Cuadro 14-9 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Corynebacterium* aisladas en seres humanos

ESPECIE	REQ LÍP	HEMÓL SBA	RED NO ₃	PYZ	AP	ESC	URE	GEL	PRUEBA DE CAMP	GLU	MAL	SAC	MNTL	XYL
<i>C. accolens</i>	+	-	+	V+	-	-	-	-	-	+	-	V	-	-
<i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>C. amycolatum</i>	-	-	V+	+	+	-	V-	-	-	+	V+	V+	-	-
<i>C. appendices</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	ND	+	+	-	-	-
<i>C. argenteratense</i>	-	-	-	+	V-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. atypicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	-	-
<i>C. aurimucosum</i>	-	-	-	+	+	V	V-	V-	ND	+	+	+	-	-
<i>C. auris</i>	-	-	-	+	+	-	-	ND	+	-	-	-	-	-
<i>C. confusum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. coyleae</i>	-	-	-	+	+	-	-	ND	+	+	-	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> gravis	-	-	+	-	-	-	-	V-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> intermedius	+	-	+	-	-	-	-	V-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> mitis	-	-	+	-	-	-	-	V-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> belfanti	-	-	-	-	-	-	-	V-	-	+	+	-	-	-
<i>C. durum</i>	-	-	+	+	-	+	V+	-	ND	+	+	+	+	-
<i>C. falsenii</i>	-	-	-	+ ^d	+	-	+	-	-	+	V+	-	-	-
<i>C. freneyi</i>	-	-	V	+	+	-	-	-	ND	+	+	+	-	-
<i>C. glucuronolyticum</i>	-	-	V	+	V-	V	V+	-	+	+	V	+	-	V
<i>C. imitans</i>	-	-	-	+ ^d	+	-	-	-	+	+	+	+ ^d	-	-
<i>C. jeikeium</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	V	-	-	-
<i>C. kroppenstedtii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	ND	+	+ ^d	+	-	-
<i>C. lipophiloflavum</i>	+	-	-	+	+	-	+ ^{24h}	ND	ND	-	-	-	-	-
<i>C. macginleyi</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	ND	+	-	+	-	-
<i>C. matruchotii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. minutissimum</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. mucifaciens</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	V	-	-
<i>C. nigricans</i>	-	-	-	V	V	-	-	-	-	+	+	+	ND	-
<i>C. propinquum</i>	-	-	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continúa)

Cuadro 14-9 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Corynebacterium* aisladas en seres humanos (cont.)

ESPECIE	LAC	MNE	ARA	SOR	RIB	GLYG	AMYG	α-GAL	β-GAL	α-GLU	β-GLU	β-GUR	NAGA	PYR	LAP
<i>C. accolens</i>	–	+	–	–	+	–	ND	ND	–	–	–	–	–	V	ND
<i>C. afermentans</i> subespecie <i>afermentans</i>	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. afermentans</i> subespecie <i>lipophilum</i>	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. amycolatum</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	–	–	–	–	V–	ND
<i>C. appendices</i>	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. argenteratense</i>	–	ND	ND	ND	V	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	V
<i>C. atypicum</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	–	–	+	–	–	+
<i>C. aurimucosum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. auris</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. confusum</i>	–	ND	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	V
<i>C. coyleae</i>	–	+	–	ND	+	–	–	–	–	–	–	–	–	V	+
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis</i>	–	ND	ND	ND	+	+	ND	–	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. diphtheriae</i> <i>intermedius</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. diphtheriae</i> <i>mitis</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. diphtheriae</i> <i>belfanti</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. durum</i>	–	ND	ND	ND	+	–	–	ND	V	–	ND	–	–	–	ND
<i>C. falsenii</i>	V	ND	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	V
<i>C. freneyi</i>	–	ND	ND	ND	+/	–	ND	ND	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. glucuronolyticum</i>	ND	ND	ND	ND	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+
<i>C. imitans</i>	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. jeikeium</i>	–	ND	ND	ND	V–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. kroppenstedtii</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. lipophiloflavum</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. macginleyi</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. matruchotii</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	ND	–	V	–	–	–	+	ND
<i>C. minutissimum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. mucifaciens</i>	–	+	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	V	–
<i>C. nigricans</i>	–	+	ND	ND	V	V	ND	ND	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. propinquum</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	–	–	–	V	ND

Cuadro 14-9 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Corynebacterium* aisladas en seres humanos (cont.)

ESPECIE	REQ LÍP	HEMÓLISIS SBA	RED NO ₃	PYZ	AP	ESC	URE	GEL	PRUEBA DE CAMP	GLU	MAL	SAC	MNTL	XYL
<i>C. pseudodiphthericum</i>	—	—	+	+	V	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. pseudotuberculosis</i>	—	β	—	—	V	—	+	V	Inv +	+	+	—	—	—
<i>C. riegelti</i>	—	—	—	V	V	—	Rápida +	—	—	—	+	—	—	—
<i>C. sanguinis</i>	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>C. simulans</i>	—	—	+	V	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>C. singulare</i>	—	—	—	+	+	—	+	—	ND	+	+	+	—	—
<i>C. striatum</i>	—	—	+	+	+	—	—	—	V	+	—	V+	—	—
<i>C. sundsvallense</i>	—	—	—	V	V	—	+	—	—	+	+	+	—	—
<i>C. thomssenii</i>	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+	+	+	—	—
<i>C. ulcerans</i>	—	β	—	—	+	—	+	+	Inv +	+	+	—	—	—
<i>C. urealyticum</i>	+	—	—	+	V	—	Rápida +	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. xerosis</i>	—	—	V	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—
<i>Corynebacterium</i> grupo F1	+	—	V+	+	—	—	+	—	—	+	+	+	—	—
<i>Corynebacterium</i> grupo G	+	—	V	+	+	—	—	—	—	+	V	V	—	—

(Continúa)

Cuadro 14-9 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Corynebacterium* aisladas en seres humanos (cont.)

ESPECIE	LAC	MNE	ARA	SOR	RIB	GLYG	AMYG	α -GAL	β -GAL	α -GLU	β -GLU	β -GUR	NAGA	PYZ	LAP
<i>C. pseudodiphthericum</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	–	–	–	V	ND
<i>C. pseudotuberculosis</i>	–	+	ND	ND	+	–	ND	ND	–	V	–	–	–	–	ND
<i>C. riegelii</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. sanguinis</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	–	–	–	–	–	–	+	ND
<i>C. simulans</i>	–	+	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>C. singulare</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	–	–	–	+	ND
<i>C. striatum</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. sundsvallense</i>	–	ND	ND	ND	–	–	–	–	–	+	–	–	ND	–	V
<i>C. thomssenii</i>	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>C. ulcerans</i>	–	+	+	ND	+	+	ND	ND	–	+	–	–	–	–	ND
<i>C. urealyticum</i>	–	ND	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	ND
<i>C. xerosis</i>	–	ND	ND	ND	+	–	ND	ND	–	+	–	–	–	–	ND
<i>Corynebacterium</i> grupo F1	–	ND	ND	ND	V–	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Corynebacterium</i> grupo G	–	ND	ND	ND	+	–	ND	ND	–	–	–	–	–	V	ND

+, reacción positiva; –, reacción negativa; V, reacción variable; +', reacción positiva tardía; +', reacción débil; V+, reacción variable, mayoría de cepas positivas; V–, reacción variable, mayoría de cepas negativas; R+, reacción positiva rápida; Inv+, prueba de CAMP inversa positiva; ND, datos no disponibles.

Leyenda: REQ, LIP, requerimientos de lípidos; Hem SBA, hemólisis en agar sangre de carnero; Red NO₃, reducción de nitrato; PYZ, pirazinamidasa; AP, fosfatasa alcalina; ESC, hidrólisis de esculina; URE, prueba de ureasa; GEL, hidrólisis de gelatina; P. CAMP, prueba de CAMP; Glu, ácido a partir de glucosa; Mal, ácido a partir de maltosa; SAC, ácido a partir de sacarosa; Mnt, ácido a partir de manitol; Xyl, ácido a partir de xilosa; Mne, ácido a partir de manosa; Ara, ácido a partir de arabinosa; Sor, ácido a partir de sorbitol; Rib, ácido a partir de ribosa; Glyg, ácido a partir de glucógeno; Amyg, ácido a partir de amigdalina; α -GAL, α -galactosidasa; β -GAL, β -galactosidasa; α -GLU, α -glucosidasa; β -GLU, β -glucosidasa; β -GUR, β -glucuronidasa; NAGA, N-acetil- β -D-glucosaminidasa; PYZ, pirrolidonil arilamidasa; LAP, leucina aminopeptidasa.

Cuadro 14-10 Biocódigos API Coryne para especies de *Corynebacterium* no incluidas en la base de datos actual

ESPECIE	BIOCÓDIGOS DEL API CORYNE	ESPECIE	BIOCÓDIGOS DEL API CORYNE
<i>C. appendicis</i>	2101124	<i>C. matruchotii</i>	7000325, 7010325, 7050325
<i>C. argentoratense</i>	2000104	"Similar a <i>C. matruchotii</i> "	2140325
<i>C. atypicum</i>	0200365	<i>C. mucifaciens</i>	2000004, 2000104, 2000105, 2100104, 2100105, 2100004, 6000004, 6100104, 6100105, 0000004, 6100125
<i>C. aurimucosum</i>	2100125	<i>C. nigricans</i>	0000125, 2000125, 2100327
<i>C. auris</i>	2100004	<i>C. riegliei</i>	0101224, 2001224, 2101224
<i>C. bovis</i>	0101104	<i>C. sanguinis</i>	6100304
<i>C. confusum</i>	3100304, 3100104	<i>C. simulans</i>	0100305, 2100105, 2100301, 2100305, 3000125
<i>C. coyleae</i>	2100104, 6100304, 2100304, 4100304, 6100004	<i>C. singulare</i>	6101125
<i>C. durum</i>	3000135, 3001135, 3040135, 3400115, 3400135, 3400305, 3400325, 3400335, 3040325, 3040335, 3440335, 3441335, 3440125, 3441125	<i>C. sundsvallense</i>	0011125, 0111125, 2011125, 2111125, 2001004, 2101125
<i>C. falsenii</i>	2101104, 2101304, 2100304, 2100324	<i>C. thomssenii</i>	2121125, 0101004
<i>C. freneyi</i>	3110325	<i>C. xerosis</i>	2110325, 31100325
<i>C. imitans</i>	2100324		
<i>C. kroppenstedtii</i>	2040105, 2040125		
<i>C. lipophiloflavum</i>	2101004		

difteria clínica también deben recibir inmunización con toxoide, dado que la infección clínica no induce necesariamente niveles protectores de antitoxina. Con la comunicación de nuevos casos de difteria respiratoria en los Estados Unidos, es imperativo que la respuesta de salud pública incluya tanto el manejo del caso como la identificación de los contactos cercanos. Debido a la falta de recepción de inyecciones de refuerzo en la mayoría de los adultos, existe actualmente una población de adultos susceptibles; el 10-60% de los individuos mayores de 30 años tienen niveles insuficientes de anticuerpos circulantes contra la toxina diftérica. En consecuencia, se siguen comunicando brotes de difteria.

C. diphtheriae es el prototipo clásico del microorganismo toxigénico. Su virulencia está relacionada casi por completo con la producción de toxina diftérica.⁴²⁴ La toxina diftérica es un polipéptido de 58 342 Da que contiene 535 residuos aminoácidos. La toxina está compuesta por dos fragmentos: el fragmento A tiene 21 500 Da y el fragmento B tiene 37 200 Da. El fragmento B, que contiene los dominios de fijación/translocación del receptor, permite el pasaje de la molécula de toxina a través de la membrana celular de las células diana. El fragmento A, la porción biológicamente activa de la molécula, cataliza la transferencia de la porción de adenosindifosfato ribosa (ADPR) desde dicotinamida adenina dinucleótido (NAD) al factor de elongación 2 (EF-2), una proteína soluble que es necesaria para la translocación de peptidilo-RNA de transferencia desde el sitio aceptor al sitio donante sobre el ribosoma eucarionte. Esta adenorribosilación inactiva EF-2 y se inhibe la síntesis proteica en la célula afectada. El gen estructural (gen *tox*) que codifica la toxina diftérica reside sobre el DNA de un corinefago (bacteriófago) denominado β -corinefago.⁴²⁴ Con la infección por una cepa de *C. diphtheriae* con el corinefago *tox*⁺, el ácido nucleico que contiene el gen *tox* queda integrado en el cromosoma bacteriano (lisogenia) y se reproduce junto con él. La mayoría de las cepas no toxigénicas

de *C. diphtheriae* y la mayoría de los corinefagos *tox* no contienen ninguna secuencia de DNA relacionada con *tox* detectable. Sólo las cepas de *C. diphtheriae* que son lisogenizadas por un β -fago que contiene el gen *tox* son capaces de producir toxina diftérica. *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* (los microorganismos del "grupo *C. diphtheriae*") también pueden portar el β -corinefago y producir toxina diftérica.

La difteria del aparato respiratorio se transmite entre los seres humanos sobre todo por contacto directo, el estornudo o la tos.³⁷⁹ La portación del microorganismo sobre la piel y la portación asintomática en las vías respiratorias altas son fuentes frecuentes de transmisión a otros individuos susceptibles.⁷⁸ Durante un período de incubación de 2-7 días, el microorganismo se multiplica localmente en la nasofaringe posterior y la orofaringe. Durante este período, existe una acumulación de microorganismos, fibrina y células inflamatorias para producir la **seudomembrana característica**, que finalmente puede cubrir las amígdalas, la faringe, la laringe y las vías nasales posteriores (véase lámina en color 14-3F). La extensión de la pseudomembrana hacia adelante puede conducir a la afectación del paladar blando y la úvula. En los casos graves, la pseudomembrana puede extenderse a la tráquea y los bronquios y obstruir las vías aéreas. También suele presentarse una linfadenopatía cervical y submandibular. Una mayor extensión de la pseudomembrana en la nasofaringe posterior y las vías nasales se asocia con una secreción serosanguinolenta o purulenta desde la nariz que es altamente infecciosa. La afectación del oído medio puede ser el resultado de la propagación del proceso infeccioso por contigüidad. La extensión de la infección respiratoria hasta la piel del rostro (nariz, oídos, mejillas) y el cuello también ocurre en ocasiones. La inoculación de los microorganismos en los ojos puede provocar conjuntivitis con afectación de la córnea o sin ella. También pueden aparecer lesiones satélites en el esófago, el estómago o las vías respiratorias bajas.

C. diphtheriae también puede causar una infección cutánea primaria, en la cual la toxina es absorbida por vía sistémica. Las lesiones de la piel pueden ser semejantes a otras lesiones cutáneas, que incluyen foliculitis, impétigo, piodermia o dermatitis seborreica. Otros microorganismos piógenos, como *Streptococcus pyogenes*, pueden ser aislados simultáneamente con *C. diphtheriae*. También se ha comunicado difteria cutánea luego de picaduras de insectos, como arañas, y también se ha documentado infección de heridas preexistentes (p. ej., heridas quirúrgicas, piodermia, eccema, impétigo, dermatitis).^{31,379} La lesión inicial es una lesión ulcerosa denominada **ectima diftérico**. Esta lesión comienza como una vesícula o una pústula que contiene un líquido de color pajizo o serosanguinolento. Una vez que este material drena, la lesión se convierte en una úlcera en sacabocados de algunos milímetros hasta algunos centímetros de diámetro. Los márgenes de la lesión están elevados y socavados. En general, las lesiones cutáneas diftéricas son dolorosas y luego se cubren por una escara o costra pseudomembranosa oscura y adherente. Por último, la pseudomembrana se desprende y deja una base hemorrágica y fuerte que rezuma líquido serosanguinolento. A medida que se desarrolla la lesión inicial, la piel circundante se torna roja y edematosa, con la formación de ampollas satélites que rodean a la lesión de ectima diftérico. La mayoría de las lesiones cutáneas están sobre los brazos, las manos, los pies o las piernas. Aunque es mucho menos probable que las lesiones cutáneas produzcan una toxicidad sistémica grave, plantean un riesgo importante de propagación hacia el medioambiente y a otros individuos.

Las bacterias que se multiplican localmente sintetizan y liberan toxina diftérica, que es absorbida por vía sistémica. La toxina tiene efectos tóxicos directos sobre el corazón, el sistema nervioso central y el periférico, el hígado y los riñones.³⁷⁹ Una miocardiopatía difusa puede aparecer en el 20-70% de los pacientes. Estos síntomas pueden aparecer de forma insidiosa o cataclísmica, y conducir a colapso circulatorio e insuficiencia cardíaca congestiva aguda. Se pueden presentar complicaciones neurológicas y neuropatías en el 20-75% de los pacientes que suelen relacionarse con la gravedad de la enfermedad. Inicialmente, las complicaciones pueden incluir parálisis del paladar blando y la pared faríngea posterior, seguida de parálisis oculomotora y ciliar. Esta última contribuye al riesgo de aspiración orofaríngea y neumonía. Los cambios degenerativos grasos y la necrosis focal en los riñones, el hígado y las glándulas suprarrenales también pueden complicar las infecciones graves. En general, la miocardiopatía y la neuropatía ocurren más adelante y son menos graves luego de las infecciones diftéricas cutáneas que aquellas que siguen a la infección respiratoria. La muerte puede ocurrir por insuficiencia cardíaca o parálisis del diafragma.

Infecciones distintas de la difteria clásica también se han asociado con *C. diphtheriae*; algunas de estas infecciones graves se debieron a cepas no toxigénicas.⁶⁶⁸ En los últimos años se han publicado varias comunicaciones de endocarditis infecciosa debida tanto a cepas toxigénicas como no toxigénicas que afectan a válvulas cardíacas nativas y protésicas. En 1993, Tiley y cols. informaron sobre siete casos de endocarditis debida a cepas no toxigénicas que ocurrieron en Nueva Gales del Sur, Australia, en un período de 12 meses.⁸⁸⁶ La edad de los pacientes varió entre 12 y 49 años. Tres de los siete tenían anomalías cardíacas preexistentes y sólo uno era adicto a drogas intravenosas. Los pacientes presentaron una enfermedad prodrómica (cefalea, malestar general, fiebre, mialgias) de 4 a 10 días de duración; cinco tenían también faringitis no exudativa. La ecocardiografía demostró vegetaciones valvulares grandes en el momento de la presentación. La ecocardiografía mostró

grandes vegetaciones valvulares en cinco pacientes. Se desarrollaron embolias sépticas difusas en los pequeños vasos sanguíneos en cuatro pacientes, mientras que se presentaron embolias en el encéfalo, el bazo y los riñones en el quinto, lo que condujo a su muerte. Los aneurismas micóticos complicaron dos casos y se desarrolló artritis séptica en cuatro de los siete pacientes. No se conoce en la actualidad la patogenia de las infecciones graves debidas a *C. diphtheriae* no toxigénica. El microorganismo puede invadir activamente el tejido y causar una enfermedad fulminante que afecta los tejidos cardíacos, endoteliales y sinoviales. También se informó endocarditis por una cepa no toxigénica de *C. diphtheriae* en un estudiante varón de 20 años en el cual se desarrollaron embolias cerebrales y rabdomiólisis grave, que requirió el reemplazo de las válvulas mitral y aórtica.⁹⁸

La capacidad de *C. diphtheriae* para infectar una amplia variedad de tipos celulares puede ser la causa de algunas de las presentaciones inusuales de la difteria. Havaladar y Shanthala comunicaron un caso en una niña de 11 años que presentó dolor abdominal de dos semanas de duración.³⁹⁸ Con posterioridad, aparecieron pseudomembranas conjuntivales bilaterales que eran positivas en cultivo para *C. diphtheriae*. La afectación intestinal se volvió evidente con la evacuación de heces sanguinolentas y membranas de tejido intestinal desprendido. Se han comunicado otras infecciones asociadas con *C. diphtheriae* (p. ej., artritis séptica, osteomielitis), pero son raras.^{56,687}

A pesar de las prácticas de inmunización y un riesgo aparentemente bajo de difteria de adquisición endógena en los Estados Unidos, existen grandes subgrupos de individuos susceptibles. Las encuestas indican que sólo el 40-60% de los niños estadounidenses que tienen como mínimo 2 años de edad han recibido todas las vacunaciones recomendadas. Estudios similares también han mostrado que hasta el 20% de los niños preescolares carecen de inmunidad protectora contra la toxina diftérica. Además, algunas investigaciones serológicas en adolescentes y adultos en los Estados Unidos han mostrado que el 20% hasta más del 50% de estos individuos carecían de inmunidad contra la toxina diftérica. Los niveles de inmunidad en los individuos ancianos fueron muy bajos, tal vez como resultado de la falta de exposición natural durante la primera era de la vacunación, las tasas bajas de vacunación y la inmunidad inducida por la vacuna decreciente o ausente.

El tratamiento de la difteria comprende la administración de antitoxina equina para neutralizar la toxina que ya no está unida a las células diana. No existe ningún tratamiento eficaz para revertir la afectación cardíaca o neurológica que podría haber ocurrido antes del diagnóstico específico. Se necesitan medidas de sostén (traqueostomía o intubación, depuración de la vía aérea, monitorización de la función cardíaca) que son de extrema importancia. También se puede administrar penicilina o eritromicina para acelerar la erradicación de los microorganismos del aparato respiratorio.⁴⁹³ Se ha utilizado rifampicina y eritromicina para erradicar la portación de *C. diphtheriae* en los individuos expuestos. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos in vitro han mostrado que las cepas de *C. diphtheriae* generalmente son sensibles a penicilina, ampicilina, cefuroxima, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, trimetoprim y rifampicina.⁵⁷⁸

Para el aislamiento de *C. diphtheriae*, se obtienen muestras de hisopados orofaríngeos, nasofaríngeos o de lesiones cutáneas. Los hisopos deben elaborarse de dacrón y se utilizan para tomar muestras de múltiples áreas inflamadas de la nasofaringe. Si se hallan pseudomembranas, se deben recoger muestras con hisopos por debajo de las membranas. Las muestras deben

enviarse al laboratorio en un medio de transporte semisólido de rutina, como Amies. Estos hisopos son inoculados en una placa de agar sangre de carnero o una placa de agar colistina ácido nalidíxico (CNA) Columbia y un medio de agar que contiene cistina y telurito de potasio. Para el medio de cistina telurito, los laboratorios deben utilizar agar sangre con cistina telurito o agar de Tinsdale modificado para el aislamiento de *C. diphtheriae*. Aunque no se realiza de rutina, algunos laboratorios también inoculan el agar inclinado ("pico de flauta") de medio de Loeffler, que contiene sangre de vaca coagulada y huevo. La tinción de frotis de preparados con azul de metileno luego de 8 a 18 horas de crecimiento en medio de Loeffler puede establecer un diagnóstico preliminar de difteria, dado que estos microorganismos crecen rápidamente en este medio y producen células difteroides características con forma de porra o maza que contienen gránulos metacromáticos (véase lámina en color 14-3H). Sin embargo, dado que otros corineformes también pueden tener este aspecto en el medio de Loeffler, los resultados sólo deben informarse como presuntivos y deben relacionarse con la presentación clínica del paciente. SBA y CNA se utilizan para evaluar estreptococos β -hemolíticos, *Staphylococcus aureus* y *Arcanobacterium haemolyticum*. *S. aureus* puede ser aislado simultáneamente con *C. diphtheriae* y también crece como colonias negras en el medio de Tinsdale, de modo que la placa de agar sangre o la placa de CNA ayudan a evaluar la extensión del crecimiento de los estafilococos en el medio que contiene telurito. Dado que es posible que algunos laboratorios no almacenen medios que contienen telurito debido a que su utilización es infrecuente, la inoculación de sangre o agar CNA permite aún el aislamiento de *C. diphtheriae* y de otros microorganismos patógenos, lo que posibilita que las

cepas corineformes sospechosas sean subcultivadas y examinadas mejor si la presentación clínica y los antecedentes del paciente (p. ej., presencia de una lesión orofaríngea pseudomembranosa característica, falta de inmunizaciones, circunstancias de brote) sugieren con fuerza una infección por *C. diphtheriae*. (Véanse los protocolos 14-1 y 14-2 para las descripciones de la preparación de la tinción de azul de metileno de Loeffler y el medio de suero).

C. diphtheriae, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* producen colonias negras que están rodeadas por halos pardos en un medio de Tinsdale modificado (véase lámina en color 14-3G).⁶¹⁶ La coloración negra de las colonias es el resultado de la actividad de la telurito reductasa, lo que conduce a la reducción de telurio, mientras que los halos pardos indican actividad de cistinasa.⁸⁵³ Otros difteroides, estafilococos y algunos estreptococos también pueden reducir el telurito (aunque no suelen presentarse halos alrededor de las colonias), de modo que las tinciones de Gram y las pruebas de catalasa deben realizarse en todas las colonias sospechosas. Como *C. diphtheriae* no produce ureasa, esta prueba puede utilizarse para distinguir este microorganismo de *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* (ambos ureasa positivos). Los dos últimos microorganismos pueden diferenciarse entre sí por la producción de ácido a partir de almidón o glucógeno. La desaminación de la pirazinamida en ácido pirazinoico por acción de la pirazinamidasa, una prueba utilizada en micobacteriología, también es útil para distinguir los microorganismos "*C. diphtheriae*" (pirazinamidasa negativos) de otras especies de *Corynebacterium* (principalmente pirazinamidasa positivas). En la figura 14-1 se presenta un algoritmo para la detección e identificación presuntiva de cepas aisladas en medio de Tinsdale.

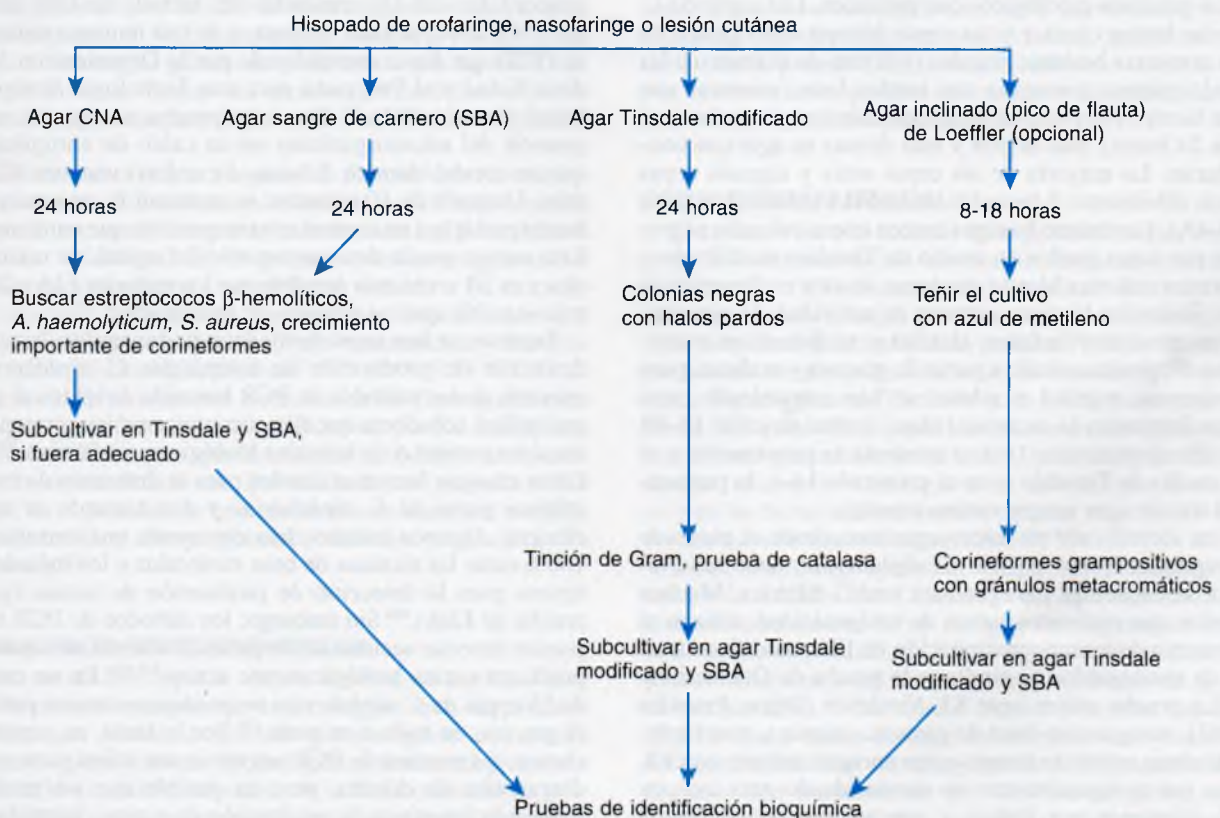


Figura 14-1 Algoritmo para la identificación de *Corynebacterium diphtheriae*.

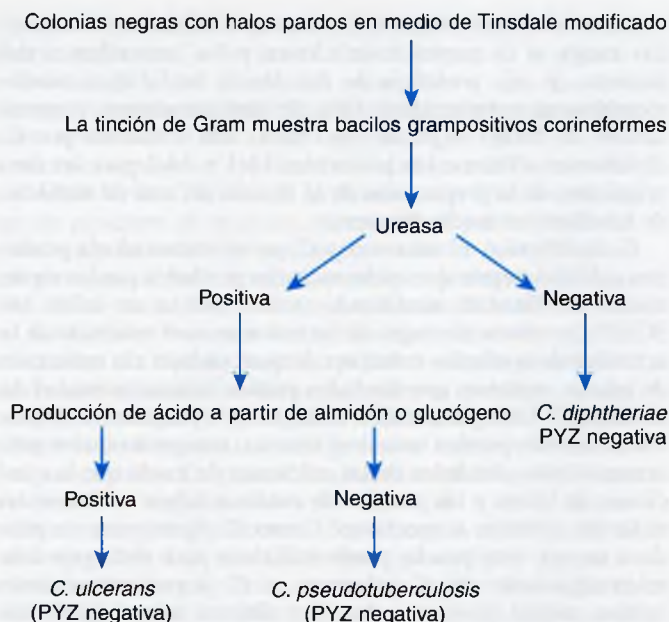


Figura 14-2 Algoritmo para el aislamiento de *C. diphtheriae*.

C. diphtheriae puede aparecer como cuatro tipos (biotipos) de colonias distintas designadas *gravis*, *mitis*, *intermedius* y *belfanti*. Estos biotipos también difieren significativamente en la morfología de la coloración de Gram, algunas reacciones bioquímicas y, desde del punto de vista histórico, en la gravedad de los procesos patológicos que producen. Las cepas de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* y las cepas biotipo *mitis* producen colonias convexas bastante grandes (1-2 mm de diámetro a las 24 horas), colonias convexas con bordes lisos, mientras que las cepas biotipo *intermedius* producen colonias pequeñas (< 1 mm a las 24 horas), más negras y más densas en agar que contiene telurito. La mayoría de las cepas *mitis* y algunas cepas *gravis* son débilmente β-hemolíticas en SBA (véase lámina en color 14-4A). Los cuatro biotipos crecen como colonias negras rodeadas por halos pardos en medio de Tinsdale modificado y todos forman colonias blanco grisáceas, lisas y no hemolíticas en SBA. Todos los biotipos carecen de actividad de pirazina-midasa, no producen fosfatasa alcalina y no hidrolizan esculina ni urea. Se produce ácido a partir de glucosa y maltosa, pero no de sacarosa, manitol o xilosa; se han comunicado raras cepas que fermentan la sacarosa (véase lámina en color 14-4B y C).²¹¹ (En el protocolo 14-3 se presenta la preparación y el uso del medio de Tinsdale y en el protocolo 14-4, la preparación y el uso de agar sangre cistina telurito).

Una vez identificado un microorganismo desde el punto de vista bioquímico como posible *C. diphtheriae*, debe ser evaluado por su capacidad para producir toxina diftérica. Muchos laboratorios que realizan pruebas de toxigenicidad utilizan el procedimiento de inmunoprecipitación de Elek modificado, un método de inmunodifusión similar a la prueba de Ouchterlony clásica. La prueba utiliza agar KL Virulence (Difco, Franklin Lakes, NJ), un agar con base de proteosa peptona, con suplemento de suero estéril de conejo o con enriquecimiento con KL Virulence (un enriquecimiento no seroso ideado para uso con agar KL Virulence por Difco) y con telurito de potasio al 0,03% (con suplemento de solución de telurito de Bacto-Chapman, 1%; Difco) como medio base. Este medio se vierte

en una placa de Petri estéril de 150 mm. Antes de que el medio se solidifique, se sumerge una tira de 1 cm × 8 cm de papel de filtro saturado con antitoxina diftérica (tiritas de antitoxina Bacto-KL; Difco) en el medio y se lo orienta cruzando el diámetro de la placa. Después del enfriamiento, se realiza una estría perpendicular con la cepa por evaluar para la producción de toxina en la tira de antitoxina sumergida. Equidistante de uno de los lados de esta estría, también se siembra otra estría con una cepa toxigénica conocida de *C. diphtheriae* como control de la prueba. Luego se incuba la placa a 35 °C y se la examina cada 24 horas durante 3 días. Si la cepa desconocida es toxigénica, se forman líneas de precipitina en ángulos de 45° entre el inóculo y la tira de antitoxina. Estas líneas serán idénticas a la cepa toxigénica de *C. diphtheriae* de control. En un procedimiento de inmunodifusión de Elek modificado se utiliza un disco central con antitoxina y los microorganismos de prueba se inoculan a 7-9 mm del disco central.²⁴⁶ Estas modificaciones permiten la evaluación simultánea de múltiples cepas y son adaptables a situaciones de brotes de casos. Se puede obtener una antitoxina de alta calidad de varias fuentes (Pasteur-Mérieux, Lyon, Francia; CNG, Peyrm, Rusia; Wyeth Laboratories, Marietta, PA; Connaught Laboratories, Swiftwater, PA).

También se han creado otros métodos, que incluyen inmunanálisis enzimáticos y pruebas de aglutinación del látex pasivas inversas para la detección de producción de toxina por *C. diphtheriae*.^{244,245,633,889} El EIA rápido desarrollado por Engler y Efstratiou utilizó antitoxina policlonal equina como anticuerpo de captura, y un anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina dirigido contra el fragmento A de la toxina diftérica como anticuerpo de detección. Este método detectó 87 cepas toxigénicas entre 245 cepas de *C. diphtheriae* y fue totalmente concordante con los resultados del método de Elek modificado.²⁴⁴ En 2002, se creó un ensayo de tira inmunocromatográfica (ICS) que fue comercializado por la Organización Mundial de la Salud y el Programa para una Tecnología Apropiada en Salud (Seattle, WA).²⁴⁵ Para esta prueba, se preparó una suspensión del microorganismo en un caldo de enriquecimiento que se incubó durante 3 horas. Se colocó una tira ICS en el tubo. Después de 10 minutos, se examinó la presencia de una banda paralela a un control interno positivo que contiene la tira. Este ensayo puede detectar tan sólo 0,5 ng/mL de toxina diftérica y es 10 veces más sensible que los métodos EIA y 20 veces más sensible que los ensayos de aglutinación.²⁴⁵

También se han implementado métodos moleculares para la detección de producción de toxina por *C. diphtheriae*. La mayoría de los métodos de PCR han sido dirigidos al gen *tox*, que utilizó cebadores que flanquean secuencias correspondientes al fragmento A de la toxina biológicamente activa.^{34,606,622,656} Estos ensayos fueron utilizados para la detección de toxina en cultivos puros de *C. diphtheriae* y directamente en muestras clínicas. Algunos estudios han observado una correlación del 100% entre las técnicas de base molecular y los métodos fenotípicos para la detección de producción de toxina (p. ej., la prueba de Elek).⁶⁰⁶ Sin embargo, los métodos de PCR también pueden detectar secuencias de genes de toxinas en cepas que no producen toxina biológicamente activa.^{619,656} En un estudio, 6 de 55 cepas de *C. diphtheriae* no produjeron toxina pero tenían el gen *tox*, en todo o en parte.²³⁸ Por lo tanto, en cepas sospechosas, las pruebas de PCR negativas son útiles para excluir el diagnóstico de difteria, pero es posible que no predigan la expresión fenotípica de producción de toxina. También se han utilizado métodos moleculares para tipificar tanto las cepas toxigénicas como no toxigénicas de *C. diphtheriae* a partir de

los brotes. Estos métodos han incluido ribotipificación, análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados, electroforesis en gel de campo pulsado y análisis de DNA polimórfico amplificado aleatorio.^{219-221,581,623,887,929}

CORYNEBACTERIUM JEIKEIUM

C. jeikeium es una de las especies de *Corynebacterium* aisladas con mayor frecuencia en las infecciones humanas.³¹⁵ Esta especie lipofílica coloniza la piel de los pacientes hospitalizados y también puede ser aislada en objetos inanimados en el medioambiente hospitalario.^{199,831,879} Las infecciones por *C. jeikeium* se ven predominantemente en huéspedes inmunodeprimidos con neoplasias y otras enfermedades subyacentes (que incluyen SIDA), dispositivos médicos permanentes, roturas de la barrera tegumentaria, neutropenia y terapia con antibióticos de amplio espectro.^{828,834,907,934} Este microorganismo es una causa bien documentada de muchas infecciones graves, como bacteriemia extrahospitalaria y hospitalaria y sepsis, endocarditis de válvulas nativas y válvulas protésicas, meningitis, ventriculitis, neumonía, pielonefritis, osteomielitis, peritonitis, otitis media e infecciones cutáneas y de tejidos blandos.^{92,188,212,360,447,456,495,744,905,946,978}

Después de 24 horas de incubación, las colonias de *C. jeikeium* en SBA son pequeñas (0,5-1 mm de diámetro), no hemolíticas y blanco grisáceas (véase lámina en color 14-4D). El crecimiento en agar chocolate disponible en el comercio suele ser escaso debido a la ausencia de lípidos en las fórmulas actuales de ese medio. A diferencia de otras especies, este microorganismo es estrictamente aerobio. En ausencia de suplemento para los medios de crecimiento con Tween 80, la acidificación de la glucosa y de las cúpulas de prueba de ribosa en el API Coryne a menudo es débil después de 24 horas (véase lámina en color 14-2F). El microorganismo da pruebas de pirazinamidasa y fosfatasa alcalina positivas y acidifica la glucosa, la ribosa y la galactosa, y algunas cepas también acidifican la maltosa. Todas las pruebas enzimáticas en API Coryne son negativas para *C. jeikeium* (véase lámina en color 14-4E y F).

C. jeikeium fue la primera especie de *Corynebacterium* documentada como multirresistente a los antibióticos.⁴⁴⁷ Las cepas de esta especie a menudo muestran resistencia a los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, imipenem) y los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina), sensibilidad variable a los macrólidos, tetraciclinas, rifampicina y quinolonas (ciprofloxacina) y sensibilidad a los glucopéptidos (p. ej., vancomicina y teicoplanina) y quinupristina-dalfopristina.^{51,457,511,584,615,677,680,764,832,893} *C. jeikeium* también es resistente a muchas de las fluoroquinolonas más nuevas (gemifloxacina, trovafloxacina) y a los macrólidos (azitromicina).²⁸⁵ Se cree que la resistencia múltiple a los antibióticos es cromosómica más que asociada con plásmidos. Sin embargo, en *C. jeikeium* se ha demostrado resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptogramina, inducible y asociada con transposones.⁷⁴²

CORYNEBACTERIUM PSEUDODIPHtheriticum

Si bien no es una especie recién descrita, la cantidad creciente de comunicaciones de casos sugiere que *C. pseudodiphtheriticum* puede constituir un patógeno emergente importante, sobre todo en los huéspedes inmunodeprimidos. Aunque se lo considera miembro de la flora orofaríngea normal, las infecciones respiratorias asociadas con él incluyen faringitis exudativa, bronquitis, bronquiolitis, traqueítis necrosante, traqueobronquitis, neumonía y absceso pulmo-

nar.^{10,25,121,148,178,190,282,378,577} En los huéspedes inmunodeprimidos con estas infecciones, las enfermedades subyacentes o los factores predisponentes han incluido traqueostomía permanente secundaria a carcinoma laríngeo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica e intubación y ventilación mecánica como consecuencia de accidentes de tránsito e infección por HIV. En algunos casos, la infección respiratoria por *C. pseudodiphtheriticum* puede imitar la difteria respiratoria.⁴⁴⁶ También se han informado casos de endocarditis de válvula nativa y de válvula protésica. La mayoría de los casos de endocarditis en válvula nativa ocurrieron en pacientes con daño valvular preexistente.^{139,618,954} En una comunicación, una vegetación grande en el área que rodeaba a la válvula mitral ocluía por completo la entrada en la aurícula izquierda y se extendía hacia abajo en el ventrículo izquierdo.⁶¹⁸ También se informó una linfadenitis cervical supurada por *C. pseudodiphtheriticum* en un niño de tres años y medio y un caso de discitis vertebral.^{516,966} En este último caso, la infección se debió a una infección de los cornetes nasales; se sugirió que este procedimiento podía haber causado una bacteriemia que sembró el disco vertebral. Además, se ha comunicado tanto una herida cutánea como infecciones oculares (queratitis y conjuntivitis) causadas por el microorganismo.^{405,536}

C. pseudodiphtheriticum es no lipofílico y crece como colonias blancas y lisas en SBA (véase lámina en color 14-5C). La pirazinamidasa y las reacciones de nitrato reductasa son positivas, y la reacción de fosfatasa alcalina es variable. Este microorganismo es ureasa positivo después de 24 horas y no fermenta ni oxida los hidratos de carbono. Las cepas de *C. pseudodiphtheriticum* suelen ser sensibles a β -lactámicos, vancomicina y aminoglucósidos, pero se han hallado algunos resistentes a clindamicina, eritromicina, tetraciclina y quinolonas. Al igual que las subespecies de *C. afermentans* y *C. auris*, *C. pseudodiphtheriticum* no produce ácido a partir de hidratos de carbono, pero es diferenciado fácilmente de estas especies por sus reacciones positivas de ureasa y de reducción de nitratos (véase lámina en color 14-5D).

CORYNEBACTERIUM STRIATUM

C. striatum ha sido hallado en el ganado bovino, como parte de la flora normal de las vías nasales humanas y sobre la piel humana. En 1980, se comunicó el primer caso de infección pleuropulmonar humana por *C. striatum* en un hombre de 79 años con leucemia linfocítica crónica.¹⁰⁴ El microorganismo fue aislado en el esputo, dos series de hemocultivos y un cultivo de líquido pleural. También se lo aisló, junto con estreptococos del grupo B y peptoestreptococos, en el esputo y las secreciones traqueales de un varón de 22 años que había sufrido una fractura de cráneo grave en un accidente automovilístico y en los hemocultivos tomados en una mujer de 64 años con carcinoma endometrial metastásico.^{59,197}

Desde 1993, han aparecido varias comunicaciones de otros casos relacionados con *C. striatum* que apoyan más el papel de este microorganismo como patógeno emergente en los individuos inmunodeprimidos.¹⁸⁷ Watkins y cols., en la Case Western Reserve University, informó sobre el aislamiento de *C. striatum* en seis pacientes.⁹³⁵ Las edades de estos pacientes variaban entre 19 y 78 años y tenían distintas enfermedades subyacentes, como linfoma linfoblástico con trasplante de médula autóloga, mielodisplasia con trasplante de médula ósea alogénica, esclerosis lateral amiotrófica, cáncer colorrectal, diabetes, conjuntivitis purulenta y rotura prematura de membranas amnióticas. Las fuentes de las cepas fueron sangre, puntas de catéteres, líquido

peritoneal, granuloma de heridas de dedos, conjuntivas, tejidos uterinos y placentarios y orina. Peiris y cols., en el Reino Unido, aislaron cultivos puros de *C. striatum* en esputo, membranas amnióticas y una herida profunda del codo en tres pacientes.⁶⁷³ En 1994, Wolde Rufael y Cohn comunicaron el primer caso de endocarditis de válvula nativa causado por *C. striatum* y Tumbarello y cols. informaron el primer caso de bacteriemia por *C. striatum* en un paciente con infección por HIV.^{897,959} La evidencia proveniente de estudios llevados a cabo en unidades de cuidados intensivos sugiere que en ocasiones *C. striatum* se transmite intrahospitalariamente.^{107,529} Desde mediados de 1990, se han aislado cepas importantes de *C. striatum* en pacientes con osteomielitis vertebral, artritis séptica y sinovitis, abscesos pulmonares, abscesos mamarios, meningitis, infecciones de derivaciones de LCR y peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{64,81,179,263,585,846,945} Desde 1994 se han comunicado otros varios casos de endocarditis por *C. striatum*, que incluyen endocarditis asociada con marcapasos y el primer caso de endocarditis de válvula protésica.^{206,471,601,748,875}

Las cepas de *C. striatum* son no lipofílicas y crecen como colonias blanco grisáceas no hemolíticas, lisas y húmedas con bordes lisos en SBA (véase lámina en color 14-6A). Las colonias miden 1-2 mm de diámetro luego de 24 horas de incubación. Se produce pirazinamidasa y fosfatasa alcalina y no se hidrolizan urea, esulina ni gelatina. La mayoría de las cepas reducen el nitrato y producen ácido a partir de glucosa, sacarosa, fructosa y galactosa solamente (véase lámina en color 14-6B).⁵⁸⁶ Las cepas de *C. striatum* producen ácidos láctico y succínico a partir de glucosa, lo cual es útil para diferenciarlas de *C. amycolatum*. En un examen de 1995 de 31 cepas clínicas se observó que todas eran sensibles a imipenem y a vancomicina; la mayoría fueron sensibles a ampicilina, cefalosporinas y aminoglucósidos, y la mayoría fueron resistentes a clindamicina, eritromicina y tetraciclina.⁵⁸⁶ En el informe de Tumbarello y cols., la cepa de *C. striatum* era sensible a vancomicina, teicoplanina, rifampicina y tetraciclina, pero resistente a todos los β -lactámicos (incluido imipenem), todos los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, la eritromicina y la clindamicina.⁸⁹⁷

CORYNEBACTERIUM UREALYTICUM

C. urealyticum era denominado antes grupo corineforme D-2 de los CDC; en 1992 se propuso formalmente y se adoptó el nombre *Corynebacterium urealyticum*.^{8,9,686} Las pruebas de restricción del DNA de cepas clínicas y de referencia y algunos estudios con sondas génicas de rRNA han demostrado que esta especie representa un taxón singular entre los corineformes.⁷²⁷ Normalmente microorganismo saprófito hallado en la piel, esta especie ha sido asociada con infecciones urinarias agudas y crónicas, urolitiasis, quistes renales y estenosis ureteral.^{229,628,649,810,824,825,830} También causa infecciones similares en perros.^{239,851} Se asocia altamente con la **cistitis incrustante alcalina**, un trastorno crónico observado en huéspedes inmunodeprimidos con lesiones vesicales preexistentes, en quienes la inflamación ulcerosa conduce al depósito de cristales de fosfato de amonio-magnesio (estruvita; $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y cristales de apatita ($\text{CA}[\text{OH}][\text{PO}_4]_3$) sobre la pared vesical.³³⁶ Este trastorno es causado por microorganismos capaces de desdoblarse rápidamente la urea, como las especies de *Proteus*. La pielonefritis causada por *C. urealyticum* se observa sobre todo en pacientes inmunodeprimidos y en quienes han recibido un trasplante renal y tuvieron complicaciones posquirúrgicas.^{8,229} Además de su papel como patógeno de las vías urinarias, *C. urealyticum* ha sido aislado en ocasiones en hemocultivos y

como causa de bacteriemia, endocarditis, pericarditis, osteomielitis e infecciones de heridas y de los tejidos blandos.^{150,243,269,650,753,829,964}

C. urealyticum es un corineforme lipofílico que crece lentamente en SBA y produce pequeñas (< 0,5 mm de diámetro después de 24 horas de incubación) colonias grises, no hemolíticas. Es pirazinamidasa positivo y fosfatasa alcalina positivo, asacarolítico y rápidamente ureasa positivo. Los medios de agar urea en “pico de flauta” comienzan a hacerse positivos inmediatamente con la inoculación. Las cepas de *C. urealyticum* suelen ser multirresistentes a β -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos; algunas pueden ser sensibles a los β -lactámicos.^{325,634,986} Las fluoroquinolonas muestran una actividad irregular y la ofloxacina es el agente más activo.⁸²⁷ Doxiciclina, rifampicina y los antibióticos glucopéptidos vancomicina y teicoplanina son los agentes más activos contra esta especie bacteriana. Se pueden seleccionar cepas resistentes a las quinolonas y la rifampicina durante el tratamiento con estos fármacos. También se describieron métodos de PCR para la identificación de *C. urealyticum*.⁸¹⁰ La ribotipificación parece ser la herramienta más útil para la caracterización de las cepas.⁶³⁴

Especies de *Corynebacterium* asociadas con animales

Algunas especies de *Corynebacterium* se han aislado en animales, en los cuales pueden constituir parte de la flora normal o ser una causa de un proceso infeccioso. Como ya se dijo, *C. pseudotuberculosis* es principalmente una cepa animal que en ocasiones produce enfermedad en los seres humanos que tienen contacto con animales o con productos animales infectados (p. ej., leche no pasteurizada).^{608,672} *C. bovis* forma parte de la flora normal de la ubre bovina y también ha sido implicado como causa de mastitis en estos animales. Este microorganismo es una causa rara de infecciones humanas (véase antes). *C. kutscheri* es un patógeno desconocido de ratas y ratones de experimentación, en los cuales puede causar enfermedades rápidamente progresivas y mortales.¹¹⁷ En estos animales, el microorganismo puede ser aislado en la cavidad bucal y en los ganglios linfáticos regionales. Para determinar su presencia en las colonias de roedores de experimentación, se han creado sondas de ácidos nucleicos a fin de detectarlo en improntas de biopsias de ganglios linfáticos de los animales.⁷⁶³ Aunque han aparecido dos comunicaciones de infecciones por *C. kutscheri* en seres humanos en la bibliografía (corioamnionitis y artritis séptica), los microorganismos fueron caracterizados en forma incompleta, de modo que existen dudas sobre la validez de las identificaciones.^{276,604} *C. vitaruman* fue aislado originariamente en el rumen de una vaca y denominado al principio *Flavobacterium vitaruman*. Se cree que participa en la síntesis del complejo vitamínico B, sobre todo en la producción de riboflavina, en el rumen. No ha sido aislado en seres humanos.

El “grupo *C. renale*”, que incluye *C. renale*, *C. cystiditis* y *C. pilosum*, causa afecciones genitourinarias en el ganado bovino y en otros animales.^{506,974} No se han informado casos de infecciones humanas debidas a *C. renale* o *C. cystiditis*. Se describió *C. pilosum* en un absceso perirectal humano y como causa de endocarditis de válvula protésica en una mujer de 79 años, ocho años después del reemplazo de una válvula aórtica por una bioprótesis pericárdica bovina.^{315,822} Sin embargo, en estas comunicaciones de casos, las descripciones de la morfología de las colonias de las cepas aisladas no coincidieron con las de la cepa tipo de *C. pilosum* y las características bioquímicas que se utilizaron para las identificaciones fueron incompletas. La morfología de las colonias descritas en estas comunica-

ciones, y el hecho de que las cepas a menudo fueran multirresistentes, sugieren que *C. amycolatum* fue en realidad la cepa aislada en estos pacientes.

En los últimos años, se han descrito varias especies de *Corynebacterium* nuevas halladas en animales. *C. auriscanis* ha sido aislado en otitis externa, piodermia y heridas interdigitales de perros.¹⁷¹ Esta especie está más estrechamente relacionada con *C. falsenii*, *C. jeikeium* y *C. urealyticum*, y es tanto filogenética como fenotípicamente distinta. *C. mastiditis* y *C. camporealensis* fueron descritas por primera vez como causas de mastitis subclínica en ovejas.^{265,266} Ambos microorganismos han sido aislados en muestras de leche en España. *C. mastidis* es una especie lipofílica similar desde el punto de vista bioquímico a *C. urealyticum* y *C. afermentans* subespecie *lipophilum*, pero es distinta de ellas sobre la base de las características quimiotaxonómicas y los estudios de secuencia de genes rRNA. *C. camporealensis* es no lipofílica y está más estrechamente relacionado desde el punto de vista filogenético con *C. striatum*. *C. capitovis* es una especie no lipofílica aislada en lesiones cutáneas sobre la cabeza de una oveja.¹⁶⁸ *C. testudinoris* y *C. felinum* son nuevas especies no lipofílicas aisladas en lesiones necróticas de la boca de una tortuga y en el tejido pulmonar de un gato salvaje escocés, respectivamente.¹⁶⁹ *C. phoace* es una especie no lipofílica aislada en *Phoca vitulina*, la foca común.⁶⁶³ Desde el punto de vista filogenético, esta especie está más estrechamente relacionada con *C. striatum*, *C. vitrumen* y *C. flavescens*. *C. spheniscorum* y *C. sphenisci* son especies no lipofílicas recién descritas que fueron aisladas en las cloacas de pingüinos salvajes.^{354,355} Por último, *C. aquilae* es una nueva especie aislada en la boca de las águilas imperiales españolas (*Aquila adalberti*) jóvenes junto con cepas de *C. falsenii*.²⁶⁷ Las propiedades fenotípicas para la identificación de las especies de *Corynebacterium* más recientemente identificadas y caracterizadas de los animales se encuentran en el cuadro 14-11.

Especies de *Corynebacterium* aisladas en los alimentos y el medioambiente

Varias especies de *Corynebacterium* nuevas y descritas recientemente se encuentran en distintos productos alimenticios y en el medioambiente, pero no han sido aisladas en muestras clínicas humanas. *C. flavescens* fue denominado al principio *Microbacterium flavus* cuando se describió en 1919 y transferido formalmente al género *Corynebacterium* en 1979. Este microorganismo ha sido aislado en el queso y otros productos lácteos. *C. mooreparkense* y *C. casei* son especies nuevas que se encuentran en la superficie de los quesos muy fermentados como el Limburger y el Tilsit.¹¹¹ *C. ammoniagenes* también se encuentra en los alimentos, sobre todo como parte de la microflora de las piezas de queso.⁹⁰⁰ *C. terpenotabidum* es una especie ambiental capaz de degradar el tetraterpeno lineal (C_{30}) escualeno.⁸⁶⁷ *C. glutamicum* (también denominado *C. lillium*), *C. callunae* y *C. efficiens* son corinebacterias ambientales que se utilizan en la industria por su capacidad para producir gran cantidad de ácido L-glutámico en el medio de cultivo durante el crecimiento en condiciones aerobias.²⁸⁶ La nueva especie *C. glaucum* fue aislada en una muestra de colorante cosmético.⁹⁷⁵

Otras bacterias corineformes

Otras bacterias corineformes que han sido aisladas en muestras clínicas humanas incluyen bacilos grampositivos fenotípi-

cos que forman letras chinas características, formas en V y formas cocoides ocasionales en la tinción de Gram. Estas especies difieren de las especies de *Corynebacterium* reconocidas en varios aspectos. La mayoría de ellas carecen de meso-DAP como diaminoácido que comprende los enlaces cruzados en la estructura del peptidoglucano y tienen en cambio otros aminoácidos (p. ej., L-lisina, L-ornitina) (cuadro 14-7).³¹⁵ Otros componentes hallados normalmente en la pared celular de las corinebacterias, como arabinosa, galactosa y ácidos micólicos de cadena corta también pueden estar ausentes. Las metaquinonas presentes como parte del sistema de transporte de electrones también varían de un grupo a otro. Además, algunos de los microorganismos son oxidativos más que fermentativos en relación con el metabolismo de los hidratos de carbono. Estas bacterias han sido aisladas en varios tipos de muestras clínicas humanas, como sangre, líquido cefalorraquídeo, orina y otros sitios y líquidos corporales normalmente estériles.³¹⁵

Aunque algunos de los ex grupos corineformes de los CDC han sido reclasificados formalmente en el género *Corynebacterium*, se ha observado que otros pertenecen a géneros que antes no estaban asociados con patología humana. Varios grupos de investigación en los Estados Unidos y Europa están trabajando para descubrir las relaciones taxonómicas complejas entre estos microorganismos dispares utilizando tanto enfoques genéticos (p. ej., hibridación de DNA-DNA, secuenciación de RNA ribosómico [rRNA] 16S y 5S) como quimiotaxonómicos (p. ej., análisis de pared celular, ácidos grasos celulares y menaquinona celular).^{60,75,207,706} Estos métodos han establecido que basarse sólo sobre las características fenotípicas puede no ser suficiente para la identificación de estos microorganismos, y que pueden ser necesarios los análisis moleculares y quimiotaxonómicos de los componentes subcelulares para diferenciar entre los microorganismos que tienen características fenotípicas idénticas o similares. Aunque estos microorganismos son cepas relativamente infrecuentes en el laboratorio clínico, cada vez se están aislando más como colonizadores hospitalarios y patógenos ocasionales, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos.

Especies de *Actinobaculum*

El examen intenso de otras cepas "similares a *Actinomyces*" provenientes de muestras clínicas humanas también ha conducido a la descripción de géneros totalmente nuevos y a la reclasificación de las especies existentes de *Actinomyces*. Lawson y cols. examinaron cinco cepas de un microorganismo desconocido similar a *Actinomyces* que fueron aisladas en especies humanas (incluida la sangre) y observaron que eran distintas de las especies de *Actinomyces* descritas antes.⁵²² El microorganismo más estrechamente relacionado con estas cepas desconocidas fue *Actinomyces suis*, e incluso éste era filogenéticamente divergente de otras especies de *Actinomyces* examinadas.⁵³⁶ Sobre la base de sus datos genéticos, quimiotaxonómicos y bioquímicos, estos investigadores propusieron un género nuevo, *Actinobaculum*, y el nombre de una especie, *Actinobaculum schaalii*, para las cinco cepas humanas antes no descritas y propusieron reclasificar a *Actinomyces suis* como *Actinobaculum suis*.⁵²² Las especies de *Actinobaculum* eran bacilos grampositivos catalasa negativos, anaerobios o anaerobios facultativos. Las células individuales pueden ser ligeramente curvas o mostrar ramificaciones. Los productos principales de la fermentación de la glucosa o la maltosa son los ácidos láctico y acético; *A. schaalii* produce también succinato y *A. suis* produce los ácidos acético y fórmico más algo de eta-

Cuadro 14-11 Características bioquímicas de especies de <i>Corynebacterium</i> aisladas en los animales														
ESPECIE	REQ LÍP	HEMÓL SBA	RED NO ₃	PYZ	AP	ESC	URE	GEL	PRUEBA DE CAMP	GLU	MAL	SAC	MNTL	XYL
<i>C. aquilae</i>	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>C. auriscanis</i>	–	–	–	–	+	V	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>C. bovis</i>	+	–	–	V	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>C. camporealensis</i>	–	–	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–
<i>C. capitovis</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	ND	+	–	–	–	–
<i>C. felinum</i>	–	–	–	+	–	–	–	–	ND	+	+	–	–	–
<i>C. mastiditis</i>	+	–	–	+	+	–	V	–	ND	–	–	–	–	–
<i>C. phocae</i>	–	–	–	+	+	–	V	–	ND	+	+	V	–	–
<i>C. sphensci</i>	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
<i>C. spheniscorum</i>	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–
<i>C. testudinoris</i>	–	–	+	–	–	+	–	–	ND	+	+	+	–	–
Véase leyenda del cuadro 14-9.														

nol a partir de la fermentación de la maltosa (no se fermenta la glucosa). Los miembros del género no reducen nitrato a nitrito, y no se hidroliza esculina ni gelatina. Desde la descripción de *A. schaalii* y la reclasificación de *A. suis*, se han aislado otras dos especies de *Actinobaculum* —“*A. massiliae*” y *A. urinale*— en muestras de orina de pacientes con infecciones urinarias crónicas.^{365,382} En el cuadro 14-12 se incluyen las características fenotípicas para la identificación de especies de *Actinobaculum*.

Especies de *Actinomyces* aisladas en seres humanos

El género *Actinomyces* está compuesto por un grupo heterogéneo de bacilos grampositivos, anaerobios facultativos o microaerófilos, no esporulados, inmóviles y no ácido-alcohol resistentes. Algunas cepas muestran una ramificación rudimentaria. Muchas especies de *Actinomyces* forman parte de la microflora bucal de seres humanos y distintos animales. Algunas especies, como *A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. georgiae*, *A. odontolyticus* y *A. naeslundii* son altamente prevalentes tanto en muestras de placa supragingival como subgingival de pacientes con periodontitis y gingivitis del adulto. Estos mismos microorganismos también desempeñan un papel importante en el desarrollo de las caries de las superficies radiculares.¹⁰⁶ Las especies de *Actinomyces* pueden producir actinomicosis clásica, infecciones de heridas, abscesos, infecciones genitales e infecciones urinarias. Las infecciones genitales, en particular por *A. israelii*, se asocian a menudo con la presencia de dispositivos intrauterinos.^{274,982} En el nuevo *Manual de Bergey*, el género *Actinomyces* está incluido en el nuevo filo Actinobacterias, clase Actinobacterias, orden Actinomycetales, familia Actinomycetaceae junto con los géneros *Actinobaculum*, *Arcanobacterium* y *Mobiluncus* (recuadro 14-1).³²⁹

El género *Actinomyces* ha sufrido una rápida expansión en los últimos años, con la descripción de varias especies nuevas en seres humanos y animales. En el pasado, algunos laborato-

rios clínicos se basaban en técnicas de identificación aerobias convencionales y métodos bacteriológicos anaerobios para la identificación, como los que se presentan en el *VPI Anaerobe Manual*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y el *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*.^{422,467,767,771} Muchos laboratorios utilizan sistemas de identificación de anaerobios enzimáticos rápidos (p. ej., Rapid ANA) para la identificación de las especies de *Actinomyces*, pero estos sistemas no tienen buen rendimiento en la identificación de estos microorganismos.⁶⁰⁹ Santala y cols. evaluaron recientemente los sistemas RapID ANA II® (Remel), RapiID CB-Plus® (Remel), BBL Crystal ANR ID® (BD Microbiology Systems, Cockeysville, MD) y RapID 32A® (BioMérieux, Inc.) por su capacidad para identificar a las especies “clásica” y recién descritas de *Actinomyces*.⁷⁶⁵ Estos sistemas identificaron correctamente sólo del 26% al 65% de las cepas de *Actinomyces* “clásicas” hasta la categoría de especie y sólo el 13% al 49% de las especies recién descritas hasta la categoría de género, lo que indica que se deben actualizar sus bases de datos. La naturaleza facultativa de la mayoría de las especies de *Actinomyces* ha conducido a la inclusión de algunas especies en las bases de datos de los sistemas de identificación para bacterias facultativas y anaerobias, como API Coryne, API Rapid ID32A y API Rapid ID32 Strep (todas de BioMérieux). Algunas de las descripciones de las especies nuevas de *Actinomyces* se basan en reacciones bioquímicas obtenidas con estos sistemas y los bio-códigos resultantes son incluidos como parte de las descripciones fenotípicas en las publicaciones. La cromatografía gas-líquido para la detección de productos volátiles y no volátiles de la fermentación de la glucosa es extremadamente útil para la identificación, dado que los bacilos grampositivos no esporulados que producen grandes cantidades de ácido succínico pueden ser colocados en el género *Actinomyces* sin otras pruebas. Como las especies nuevas son validadas actualmente mediante métodos moleculares fenotípicos, no existen datos de cromatografía gas-líquido disponibles para las especies descritas más

LAC	MNE	ARAB	SORB	RIB	GLYG	AMYG	α -GAL	β -GAL	α -GLU	β -GLU	β -GUR	NAGA	PYR	LAP
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	+	+
-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	V	-	-	-	-	ND	ND
-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+
-	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	+
-	ND	ND	ND	+	ND	ND	-	-	+	-	-	ND	+	+
-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+
V	+	-	-	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	V
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-	+	ND	ND	+	-	ND	-	-	-	-	-	ND	-	+ ^d
-	ND	ND	ND	+	-	ND	-	-	V	-	-	-	-	+

recientes. Debido a las dificultades con la identificación fenotípica, muchos investigadores han desarrollado sondas de DNA específicas de género y de especie, sobre todo para investigar el papel de estas bacterias en la enfermedad periodontal.^{871,972} Las especies de *Actinomyces* también pueden ser identificadas mediante métodos moleculares, como PCR de rDNA 16S y análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.^{387,768} Sin embargo, ninguna de estas técnicas moleculares se encuentra disponible en el laboratorio clínico de rutina. En el recuadro 14-3 se describen las especies de *Actinomyces* que han sido aisladas en seres humanos, mientras que las aisladas en animales se describen brevemente más adelante. Los datos fenotípicos presentados en el cuadro 14-13 incluyen tanto cepas humanas como animales y representan una síntesis de las características fenotípicas y las descripciones de varias fuentes.^{422,467,771} Sarcone y cols. también publicaron un diagrama de flujo dicotómico para ayudar en la identificación de especies de *Actinomyces*, *Arcanobacterium* y *Actinobaculum* utilizando reactivos fácilmente disponibles (p. ej., tabletas de reactivo Rosco, Rosco, Taastrup, Dinamarca).⁷⁶⁷ Estos diagramas de flujo se presentan en la figura 14-3.

A. israelii es la causa más frecuente de actinomicosis en los seres humanos, aunque otras especies (es decir, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* y *A. viscosus*) también pueden producir en ocasiones esta infección.⁶⁹⁷ La actinomicosis es una infección crónica caracterizada por la formación de abscesos, trayectos fistulosos que drenan y fibrosis tisular. Debido a su naturaleza crónica, las infecciones actinomicóticas a menudo imitan a los carcinomas.^{223,436} Las formas clínicas de actinomicosis incluyen actinomicosis cervicofacial, actinomicosis torácica, actinomicosis abdominal y pelviana y actinomicosis del sistema nervioso central (SNC).⁸¹⁶ La **actinomicosis cervicofacial** se asocia con mala dentición, manipulaciones dentales y otras infecciones de la cabeza y el cuello (p. ej., otitis, mastoiditis).¹² Al menos nueve especies diferentes de *Actinomyces* pueden producir esta infección, aunque predomina

A. israelii y *A. gerencseriae*.⁶⁹⁷ En la mayoría de los casos, se introducen *Actinomyces* orales endógenos con algún tipo de traumatismo y comienzan a crecer en los tejidos de la cabeza y el cuello para formar un absceso piógeno agudo que puede evolucionar a una masa submandibular indurada con un trayecto fistuloso secretante o más de uno. Se secretan microcolonias de los microorganismos denominadas gránulos de azufre desde estos trayectos fistulosos. La **actinomicosis torácica** ocurre como extensión de la infección cervicofacial en la región de tórax y el mediastino, como resultado de la aspiración del contenido orofaríngeo o como extensión de una infección abdominal o pelviana propagada al retroperitoneo o por vía transdiafragmática.⁸⁷⁴ La infección se inicia como una neumonía aspirativa, con el desarrollo final de cavitaciones o masas pulmonares. Los síntomas son tos, dolor torácico e hipermia leve, y las radiografías de tórax pueden poner en evidencia lesiones fibronodulares o cavitarias con derrame pleural o empiema acompañantes.⁴⁸⁹ La infección pulmonar también puede extenderse para afectar los huesos (costillas, esternón, cintura escapular), los músculos de la pared torácica y los tejidos blandos.⁶² La **actinomicosis abdominal** es el resultado de un traumatismo penetrante, una perforación colónica o una cirugía del tubo digestivo. En general, está afectada la región ileocecal del colon y la infección puede mantenerse localizada o propagarse por vía hematógena o por extensión directa.¹⁵⁸ La actinomicosis anorrectal puede originarse en una cripta, una fisura o un absceso anal infectados o por extensión directa desde una localización intraabdominal. La infección del riñón, el hígado y el bazo pocas veces puede ocurrir por extensión directa desde un foco abdominal o a través del torrente circulatorio. La **actinomicosis pelviana** puede provenir de la propagación continua de la actinomicosis abdominal u originarse en la pelvis propiamente dicha. Esta infección se asocia con dispositivos intrauterinos que son colonizados por actinomicosis.^{274,962} Esto conduce a la infección endometrial con extensión hasta los ovarios. La **actinomicosis del SNC** ocurre como

Cuadro 14-12 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Actinobaculum*

CARACTERÍSTICA	<i>A. SCHAALII</i>	<i>A. SUIIS</i>	<i>A. MASSILIAE</i>	<i>A. URINALE</i>
Morfología/pigmento de las colonias	Pequeñas, blanco grisáceas	Blancas, granulosas, de bordes lisos o irregulares, centro elevado	Pequeñas, grises, de bordes lisos	Pequeñas, blanco grisáceas, convexas, lisas, de bordes continuos (lisos)
Hemólisis, SBA	–	–	–	β
Pirazinamidasa	V	ND	+	–
Fosfatasa alcalina	–	+	–	–
Ureasa	–	+	–	V+
Arginina dihidrolasa	–	ND	–	–
Hidrólisis de hipurato	+	ND	+	+
Acetoína (VP)	–	–	ND	–
LAP	ND	ND	–	–
Prueba CAMP	+ ^d	ND	ND	ND
PYR	V	ND	–	ND
α-GAL	–	ND	–	–
β-GAL	–	+	–	–
α-GLU	+	+	+	–
β-GLU	–	ND	ND	–
β-GUR	–	+	–	+
NAGA	–	ND	–	–
Ácido producido a partir de:				
Glucosa	+	–	+	+
Maltosa	+	V	+	V
Sacarosa	V	–	ND	V
Manitol	–	–	–	–
Xilosa	+	–	+	–
Lactosa	–	–	ND	–
Manosa	V	–	–	–
Arabinosa	V	–	ND	–
Sorbitol	–	–	–	–
Rafinosa	–	–	+ ^d	–
Ribosa	+	ND	+	+
Trehalosa	V	–	+	–
Glucógeno	–	+	+	–
Melibiosa	–	–	ND	–
Melezitosa	–	–	ND	–
Productos, fermentación de la glucosa	A, S	A, f, EtOH (a partir de maltosa)	ND	L, a

consecuencia de la diseminación hematógena o por extensión directa desde infecciones actinomicóticas en las áreas de cabeza y cuello.⁸¹⁶ En general, los pacientes presentan meningitis o meningoencefalitis crónica complicada por el desarrollo de empiema subdural, abscesos epidurales y subdurales, y osteomielitis craneal. En el 75% de los casos, en la actinomicosis del SNC se observan abscesos encefálicos únicos o múltiples,

habitualmente en los lóbulos temporales o frontales.^{816,817} Los pacientes pueden tener un cuadro de meningitis crónica que se asemeja a la meningitis tuberculosa. En general, el LCR muestra pleocitosis mononuclear, hiperproteínorraquia y concentraciones de glucosa normales o bajas. Es interesante señalar que se suele presentar fiebre sólo en alrededor del 50% de los pacientes con actinomicosis del SNC.

Recuadro 14-3 Miembros del género *Actinomyces*

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Actinomyces bovis</i>	<i>A. bovis</i> produce actinomicosis en ganado bovino y otros animales. Este microorganismo no ha sido aislado en infecciones humanas; sin embargo, un caso reciente de bacteriemia por <i>A. bovis</i> en un ser humano fue comunicado por Bernard y cols. (en prensa). Fue confirmado con enfoques fenotípico, quimiotaxonómico y genotípico. En el API Coryne, esta cepa produjo el número de biocódigo 0101104, lo que indicó reacciones positivas para fosfatasa alcalina, ureasa, glucosa y catalasa.
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	Esta especie nueva ha sido aislada en líquido pleural humano, un absceso paracolónico, un absceso mandibular, un absceso ótico posmastoidectomía, un lavado sinusal y dispositivos intrauterinos. ³⁸¹ En las tinciones de Gram, los microorganismos aparecen como bacilos delgados y ligeramente curvos con filamentos arrosariados ramificados. Después de 48 horas de incubación, las colonias son pequeñas, convexas, de bordes lisos y pueden ser cremosas a rosadas. <i>A. cardiffensis</i> es un anaerobio facultativo catalasa negativo y produce cantidades importantes de ácidos succínico y láctico y pequeñas cantidades de ácido acético a partir de la fermentación de la glucosa. No hidroliza esculina, urea ni gelatina.
<i>Actinomyces europaeus</i>	Esta nueva especie fue descrita en 1997, cuando fue aislada como el único microorganismo o como el único microorganismo aerobio en muestras obtenidas de un absceso humano. ²⁸⁸ También se lo aisló en infecciones relacionadas con la piel (p. ej., infección de seno pilonidal, abscesos perianales, úlceras por decúbito) e infecciones urinarias. ⁷⁵⁴ En los extendidos teñidos con Gram, aparece como bacilos grampositivos cortos dispuestos en grupos pequeños sin ramificaciones evidentes. Las colonias en SBA son pequeñas (< 0,5 mm después de 48 horas de incubación en CO ₂), grises y translúcidas. Este microorganismo da una prueba de catalasa negativa, es inmóvil y fermenta la glucosa y la maltosa, pero no el manitol ni la xilosa. Algunas cepas hidrolizan esculina y gelatina, pero estas reacciones son tardías. No se reduce nitrato a nitrito ni se produce ureasa. Como sucede con otras especies de <i>Actinomyces</i> , se produce ácido succínico como principal producto de la fermentación de la glucosa.
<i>Actinomyces funkei</i>	Esta especie recién descrita fue aislada originariamente en hemocultivos, el cultivo de una herida esternal y una incisión abdominal humana y recientemente comunicada como causa de endocarditis de válvula tricúspide nativa. ^{524,949} Estas cepas fueron identificadas en un principio como de <i>A. turicensis</i> , pero algunos rasgos fenotípicos y la secuenciación de rRNA 16S mostraron que este microorganismo estaba estrechamente relacionado con <i>A. turicensis</i> , pero no era idéntico a él. Las células de <i>A. funkei</i> son grampositivas, delgadas, ligeramente curvas y muestran cierta ramificación. El crecimiento ocurre en condiciones aerobias y anaerobias. En agar sangre de carnero (SBA), las colonias son pequeñas, no hemolíticas y grises después de 24 horas de incubación. Se produce ácido a partir de glucosa, sacarosa y xilosa, pero no de arabinosa, manitol, glucógeno, rafinosa, sorbitol o trehalosa. Se hidroliza hipurato, pero no esculina ni gelatina. En el sistema API Coryne, la cepa original produjo los números de biocódigo 0130761 o 3530761, lo que indicó la variabilidad de las reacciones de pirazinamidasas, nitrato reductasa y β-galactosidasa sobre la tira.
<i>Actinomyces georgiae</i>	<i>A. georgiae</i> fue descrito en 1990 y se encuentra como parte de la flora normal de los surcos gingivales de adultos y niños. Las cepas de esta especie son anaerobias facultativas. En las tinciones de Gram, esta especie aparece como bacilos que se presentan de a pares o cadenas cortas; a lo largo de ellas las células pueden tener tumefacciones y rara vez se observan ramificaciones. ⁴⁵⁸ En los cultivos de caldo más antiguos, las células pueden tener un aspecto cocoide. Después de 48 horas de incubación en condiciones anaerobias, las colonias tienen 1 mm de diámetro, son circulares, brillantes, lisas y con bordes continuos (lisos). Las colonias pueden ser blancas, ocreas o marrones claras. El microorganismo es catalasa negativo y se producen ácidos succínico, acético, fórmico y pequeñas cantidades de ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa. Se produce ácido a partir de distintos hidratos de carbono, que incluyen glucosa, maltosa, sacarosa, xilosa, trehalosa y glucógeno. La mayoría de las cepas hidrolizan esculina y no reducen nitrato a nitrito.
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Esta especie fue descrita en 1990 y antes denominada <i>A. israelii</i> serotipo II. ⁴⁵⁸ Sin embargo, no está relacionada genéticamente con la cepa tipo de <i>A. israelii</i> . <i>A. gerencseriae</i> se encuentra en la cavidad bucal humana y en los surcos gingivales. Alrededor del 12% de las cepas son anaerobias estrictas, mientras que el resto producen un crecimiento escaso a moderado en agar sangre incubado en CO ₂ al 5-7%. En las tinciones de Gram, los microorganismos aparecen como células filamentosas con tumefacciones ocasionales y ramificación. Después de 48 horas de incubación en condiciones anaerobias, las colonias miden unos 0,2 mm de diámetro, son blancas, opacas, no hemolíticas y pueden tener una topografía "desigual". Esta especie da pruebas de catalasa negativa, hidrólisis de esculina positiva, hidrólisis de gelatina negativa y produce ácido a partir de distintos hidratos de carbono, que incluyen glucosa, maltosa, manosa, sacarosa y trehalosa. Se producen los ácidos láctico, succínico, fórmico y acético por la fermentación de la glucosa.
<i>Actinomyces graevenitzi</i>	La comunicación original de esta nueva especie describió cuatro cepas humanas, tres de las cuales provenían de muestras respiratorias, mientras que la cuarta se aisló en la mandíbula de un paciente con osteítis. ⁷⁰⁴ Estas cepas eran bacilos ligeramente curvos, grampositivos e inmóviles con cierta ramificación y extremos tumefactos ocasionales. Las colonias en SBA son pequeñas (0,2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación) y son adherentes al agar, sobre todo en aislamiento primario. Esta especie da una prueba de catalasa negativa, no hidroliza esculina, urea ni hipurato y no reduce nitrato a nitrito. Esta especie también es fuertemente <i>N</i> -acetil-β-D-glucosaminidasa positiva en la banda API Coryne, lo cual ayuda a diferenciarla de las otras especies de <i>Actinomyces</i> estrechamente relacionadas. Los ácidos succínico y láctico constituyen los productos terminales de la fermentación de la glucosa.

(Continúa)

Recuadro 14-3 Miembros del género *Actinomyces* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	Esta especie nueva, descrita en 2003, fue aislada de material purulento de un paciente con actinomycosis pelviana. ⁹⁶² Esta especie es estrictamente anaerobia, crece en SBA como colonias no hemolíticas puntiformes y es catalasa negativa. Mediante secuenciación de genes rRNA 16S, esta especie está más estrechamente relacionada con <i>A. maramammallium</i> , el cual ha sido aislado en focas y marsopas.
<i>Actinomyces houstonensis</i>	Esta especie humana se originó con tres cepas de abscesos subcutáneos graves que requirieron drenaje. ¹⁶² <i>A. houstonensis</i> es un anaerobio facultativo, que produce colonias grises α -hemolíticas que miden unos 0,2 mm de diámetro después de 48 horas de incubación a 35-37 °C. Las células son bacilos grampositivos pleomorfos que tienden a formar semicírculos. El microorganismo da una prueba de catalasa negativa y no hidroliza esculina, urea o gelatina. Reduce el nitrato a nitrito y produce ácido a partir de glucosa y sacarosa, pero no de xilosa.
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>A. israelii</i> es el agente actinomicótico asociado con mayor frecuencia con actinomycosis cervicofacial clásica. Este microorganismo también puede causar infecciones musculoesqueléticas asociadas con infecciones de tejidos blandos adyacentes, traumatismo y diseminación hematogena. ⁵³⁵ También se han comunicado infecciones de articulaciones protésicas luego de una bacteriemia por <i>A. israelii</i> . ⁹⁸⁵ Este microorganismo es primariamente anaerobio, y el crecimiento facultativo en una atmósfera rica en CO ₂ sólo ocurre después de subcultivos repetidos. Las colonias pueden asemejarse a un diente molar, son no hemolíticas en SBA y reducen el nitrato a nitrito. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, xilosa, lactosa y trehalosa.
<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>A. meyeri</i> es una especie anaerobia estricta asociada con distintas infecciones humanas, como actinomycosis torácica y diseminada; neumonía; abscesos encefálicos, cutáneos y esplénicos; endocarditis; funisitis; corioamnionitis y osteomielitis. ^{32,177,327,437,537,657,913,967} Las colonias en agar sangre son blancas y no pigmentadas. Las cepas de <i>A. meyeri</i> son catalasa negativas, no hidrolizan esculina y no reducen nitrato. La prueba de CAMP es positiva y algunas cepas también producen ureasa. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y xilosa, y algunas cepas también fermentan glicerol y glucógeno. No se fermenta manitol, trehalosa, rafinosa ni manosa.
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>A. naeslundii</i> se encuentra en la orofaringe humana y es una causa rara de actinomycosis cervicofacial, actinomycosis endocervical asociada con dispositivos intrauterinos (DIU), artritis séptica, enfermedad periodontal y otras infecciones. ^{387,532,971} Las cepas de <i>A. naeslundii</i> son divididas en las geno-especies I y II, ambas anaerobias facultativas. En general, las cepas del grupo I son catalasa negativas, pueden reducir o no nitrato a nitrito, y son prueba de CAMP negativas, mientras que las cepas del grupo II suelen ser catalasa positivas, reducen nitrato a nitrito y son prueba de CAMP positivas. Ambos grupos hidrolizan esculina, fermentan distintos hidratos de carbono y son ureasa positivos. Las colonias en agar sangre son no pigmentadas.
<i>Actinomyces nasicola</i>	Esta especie fue aislada originalmente en pus que fue aspirado del antro de un paciente que se sometió a una polipectomía nasal de rutina. ³⁸⁶ En las tinciones de Gram, aparece como bacilos grampositivos corineformes, y se observa también con cierta ramificación y formas cocoides. El microorganismo es anaerobio facultativo y catalasa negativo: se producen ácido acético, láctico y succínico como productos de fermentación de la glucosa. No hidroliza esculina, gelatina ni almidón y la prueba de ureasa es negativa. Se produce ácido a partir de fructosa y celobiosa, pero no de glucosa, maltosa, sacarosa, ribosa, xilosa, lactosa, manitol o amigdalina.
<i>Actinomyces neuii</i> subespecie <i>neuii</i> y <i>Actinomyces neuii</i> subespecie <i>anitratus</i>	Estas especies de <i>Actinomyces</i> fueron descritas en 1994 y comprenden los ex miembros de las cepas corineforme del grupo I de los CDC y "similares al grupo I" que fueron aisladas en distintas muestras clínicas, como de derivaciones de líquido cefalorraquídeo, cultivos óticos, líquidos vítreos, abscesos de glándulas mamarias, forúnculos y sangre. ³⁰¹ Las cepas del grupo I eran α -hemolíticas en agar sangre humana, reducían nitrato a nitrito, eran incapaces de fermentar adonitol y eran fosfatasa alcalina negativas, mientras que las cepas similares al grupo I eran no hemolíticas, no reducían nitrato a nitrito, fermentaban adonitol y eran fosfatasa alcalina positivas. Ambos grupos de microorganismos crecieron en condiciones aerobias y estrictamente anaerobias. El análisis de la pared celular mostró que carecían de ácidos <i>meso</i> -DAP y micólicos. El análisis de ácidos grasos volátiles y no volátiles mostró que el ácido succínico era el principal producto terminal de la fermentación de la glucosa para ambos grupos de microorganismos y el examen de los ésteres metílicos de ácidos grasos puso en evidencia que las paredes celulares contenían los ésteres metílicos de los ácidos grasos C16:0, C18:1 <i>cis</i> -9 y C18:0 como sus principales componentes. Estos datos sugirieron una relación filogenética entre cepas del grupo I y similares al grupo I de los CDC y especies de <i>Actinomyces</i> . ^{301,771} Luego, se hallaron las secuencias de genes rRNA 16S de estos microorganismos que apoyaron la inclusión de las cepas del grupo I y similares al grupo I de los CDC en el género <i>Actinomyces</i> . En 1994, las cepas del grupo I y similares al grupo I de los CDC fueron propuestas formalmente como <i>Actinomyces neuii</i> subespecie <i>neuii</i> y <i>Actinomyces neuii</i> subespecie <i>anitratus</i> , respectivamente. ³¹³ Desde el depósito de este corineforme en el género <i>Actinomyces</i> , esta especie ha sido asociada con corioamnionitis y sepsis neonatal, bacteriemia mortal en un huésped no inmunodeprimido, endoftalmítis posoperatoria e infección de una prótesis mamaria. ^{118,314,328,576} Tanto <i>A. neuii</i> subespecie <i>neuii</i> como <i>A. neuii</i> subespecie <i>nitratus</i> son bacilos grampositivos no hemolíticos catalasa positivos. Las colonias son circulares, lisas, convexas y blancas con bordes lisos; la subespecie <i>neuii</i> es α -hemolítica en SBA, mientras que la subespecie <i>anitratus</i> es no hemolítica. Estos microorganismos son fermentadores muy activos y producen ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, manitol, lactosa, manosa, trehalosa y xilosa. Ambas especies producen leucina arilamidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa y α -glucosidasa, y son prueba de CAMP positivas. <i>A. neuii</i> subespecie <i>neuii</i> reduce nitrato a nitrito, mientras que la subespecie <i>anitratus</i> es negativa para esta característica. Algunas raras cepas de <i>A. neuii</i> pueden ser catalasa negativas. ¹¹⁸

Recuadro 14-3 Miembros del género *Actinomyces* (cont.)

Especie	Importancia clínica e identificación
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Esta especie se encuentra en la orofaringe humana en asociación con los surcos gingivales y lesiones cariadas profundas. También es una causa rara de bacteriemia, infecciones toracopulmonares, abscesos pulmonares, infecciones de tejidos blandos y actinomicosis pelviana asociadas con DIU. ^{62,180,545,823,869,962} Esta especie es catalasa negativa, produce colonias rosadas en SBA y forma colonias rojas en agar infusión de cerebro y corazón. El nitrato se reduce a nitrito y no se produce ureasa. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa, y algunas cepas fermentan también glicerol, glucógeno y xilosa.
<i>Actinomyces oricola</i>	Esta especie nueva, al igual que <i>A. radidentis</i> (véase más adelante), fue aislada originariamente en un absceso dental. ³⁸⁴ Esta especie incluye bacilos grampositivos que muestran tanto ramificación como formación de filamentos. El microorganismo es anaerobio facultativo, catalasa negativo y produce colonias puntiformes en SBA después de 48 horas de incubación. El análisis por cromatografía gas-líquido de cultivos en caldo de glucosa pasada muestra la formación de ácidos acético, láctico y succínico. En la banda del API Coryne, se produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa solamente y produjo un número de biocódigo de 2550121, que indica reacciones positivas para pirazinamidas, fosfatasa alcalina e hidrólisis de esculina, α -glucosidasa y β -galactosidasa.
<i>Actinomyces radidentis</i>	<i>A. radidentis</i> es una especie nueva que ha sido aislada en cultivos puros de conductos radiculares infectados en seres humanos. ^{170,476} Estas cepas eran grampositivas, catalasa positivas, de morfología cocoide a cocabacilar y crecieron en condiciones aerobias y anaerobias. Las colonias en SBA pueden producir un pigmento rosado. Esta especie es activa desde el punto de vista fermentativo, produce ácido a partir de glucosa, maltosa, manitol, lactosa, ribosa y sacarosa en el API Coryne, hidroliza esculina y la reducción de nitrato y la producción de ureasa son características variables. La secuenciación del rRNA 16S de este microorganismo confirmó una relación estrecha con <i>A. slackii</i> , <i>A. bovis</i> , <i>A. bowdenii</i> , <i>A. naeslundii</i> y <i>A. viscosus</i> . ¹⁷⁰ Este microorganismo probablemente es un miembro antes no reconocido de la microflora bucal normal de los seres humanos.
<i>Actinomyces radingae</i>	Los microorganismos del grupo E de los CDC fueron descritos originariamente como bacterias "similares a <i>A. pyogenes</i> " que han sido aisladas en distintas fuentes clínicas humanas que incluyen muestras de oído medio, líquido de empiema, quistes pilonidales, abscesos perianales, hemocultivos, urocultivos y úlceras por decúbito. ⁹⁶⁹ Al principio se pensaba que estos microorganismos eran cepas aerotolerantes del microorganismo anaerobio <i>Bifidobacterium adolescentis</i> que diferían en su crecimiento aerobio y en los productos terminales volátiles y no volátiles producidos a partir de la fermentación de la glucosa. ³⁷⁵ Utilizando enfoques genéticos y quimiotaxonómicos, Wust y cols. observaron que estas cepas estaban estrechamente relacionadas con especies de <i>Actinomyces</i> y propusieron dos especies nuevas en el género <i>Actinomyces</i> : <i>Actinomyces radingae</i> y <i>Actinomyces turiscensis</i> . ⁹⁷⁰ Vandamme y cols. utilizaron luego electroforesis proteica de células enteras, análisis de ácidos grasos, pruebas fenotípicas bioquímicas (API Coryne y el panel IDS Rapid ANA) y sondas de oligonucleótidos específicos de especie para caracterizar un grupo de bacterias corineformes catalasa negativas no identificadas. ⁹⁰⁶ Estos investigadores observaron que los microorganismos formaban dos grupos que correspondían a <i>A. turiscensis</i> y <i>A. radingae</i> , respectivamente. Estos análisis permitieron la publicación de descripciones corregidas de estas cepas similares a <i>A. pyogenes</i> de muestras clínicas humanas. ⁹⁰⁶ Utilizando sondas de oligonucleótidos específicas de especie para <i>A. turiscensis</i> y <i>A. radingae</i> , Sabbe y cols. examinaron 294 cepas "similares a actinomicas" de muestras clínicas humanas recogidas en un período de 7 años y observaron que <i>A. radingae</i> se asocia fundamentalmente con infecciones relacionadas con la piel (p. ej., abscesos cutáneos, quistes pilonidales, abscesos perianales). ⁷⁵⁴ <i>A. radingae</i> son bacilos grampositivos facultativos y catalasa negativos. Después de 48 horas de incubación, las colonias en SBA son pequeñas, grises, convexas y circulares con una consistencia mantecosa. La mayoría de las cepas son α -hemolíticas. Se hidroliza esculina, pero no gelatina ni urea. No se reduce el nitrato a nitrito y la prueba de CAMP es negativa. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, xilosa y ribosa, pero no de manitol o glucógeno. Con las pruebas enzimáticas en el API Coryne, <i>A. radingae</i> produce α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa y N-acetil- β -D-glucosaminidasa, pero no produce leucina arilamidasa, pirrolidonil arilamidasa, fosfatasa alcalina o β -glucuronidasa. Las cepas de <i>A. radingae</i> son sensibles a penicilina, cefalosporinas, eritromicina y tetraciclinas. ⁹⁰⁶
<i>Actinomyces turiscensis</i>	<i>A. turiscensis</i> se encuentra principalmente en infecciones genitales, infecciones relacionadas con la piel e infecciones urinarias y algunas cepas han sido aisladas en tejido apendicular, absceso hepático, infecciones de cabeza y cuello y sangre. ^{735,754} En la tinción de Gram, las células de <i>A. turiscensis</i> son rectas, ligeramente curvas o con forma de palo. Las colonias en SBA son pequeñas, grises, convexas y enteras después de 48 horas de incubación en una atmósfera de CO ₂ . El microorganismo es catalasa negativo, no hidroliza esculina, urea ni gelatina, no reduce nitrato a nitrito y es prueba de CAMP negativo. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, xilosa, ribosa y trehalosa, pero no se fermenta lactosa ni manitol. En el API Coryne, se detecta α -galactosidasa, pero las otras pruebas enzimáticas son negativas. <i>A. turiscensis</i> es ampliamente sensible a distintos agentes, como penicilina, cefalosporinas, eritromicina y doxiciclina. ⁹⁰⁶
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Las cepas de esta nueva especie fueron aisladas originariamente en orina, secreción vaginal y cultivos uretrales. ⁶³⁶ Estos microorganismos son bacilos catalasa negativos, grampositivos regulares y facultativos. Esta especie produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y xilosa, y algunas cepas también fermentan manitol y ribosa. Se reduce nitrato a nitrito y se hidroliza la esculina, pero no se hidroliza gelatina, urea ni hipurato. Se cree que esta especie es un comensal de la vagina humana y aún no ha sido reconocido como causa de enfermedad del aparato urogenital.
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>A. viscosus</i> se encuentra en la cavidad bucal del hombre y los animales. Esta especie es un bacilo grampositivo y catalasa positivo. Las colonias en SBA son pequeñas y no hemolíticas después de crecimiento durante 48 horas. Se hidroliza esculina y urea, y el nitrato se reduce a nitrito. Se produce ácido a partir de glucosa y sacarosa, y algunas cepas producen también ácido a partir de xilosa.

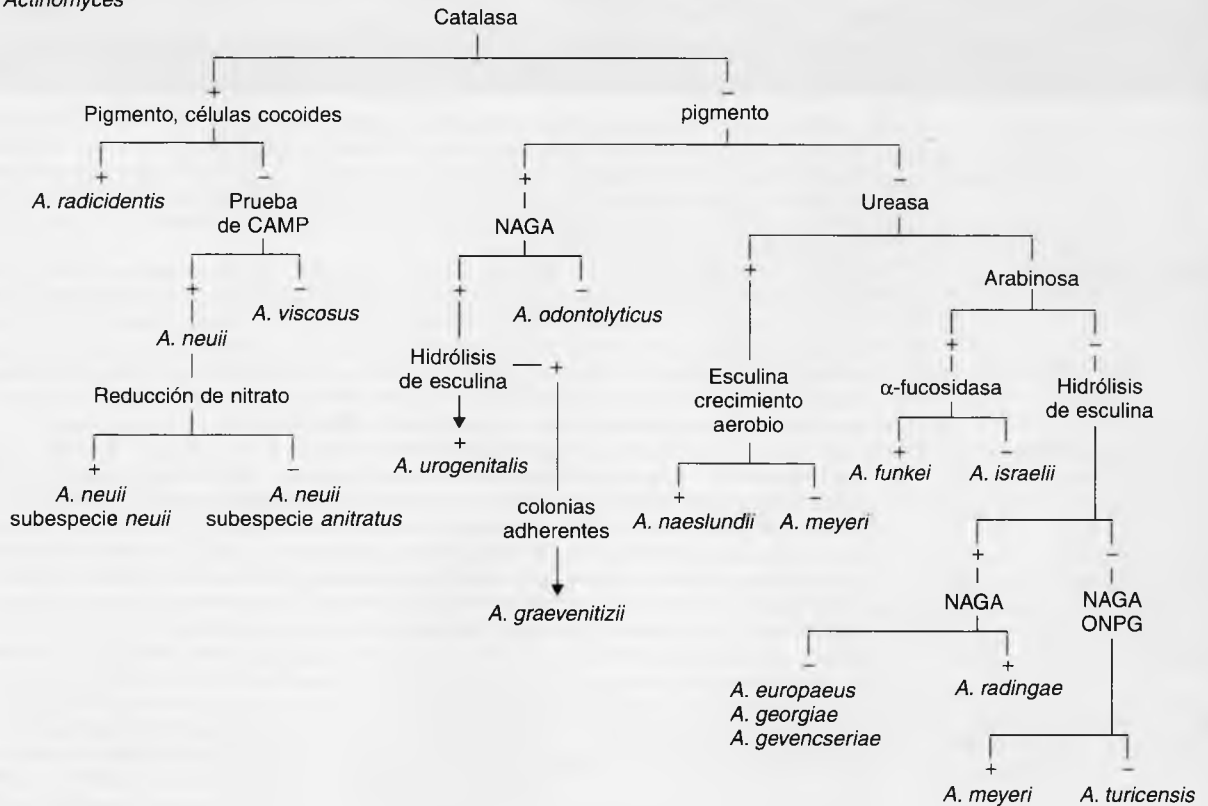
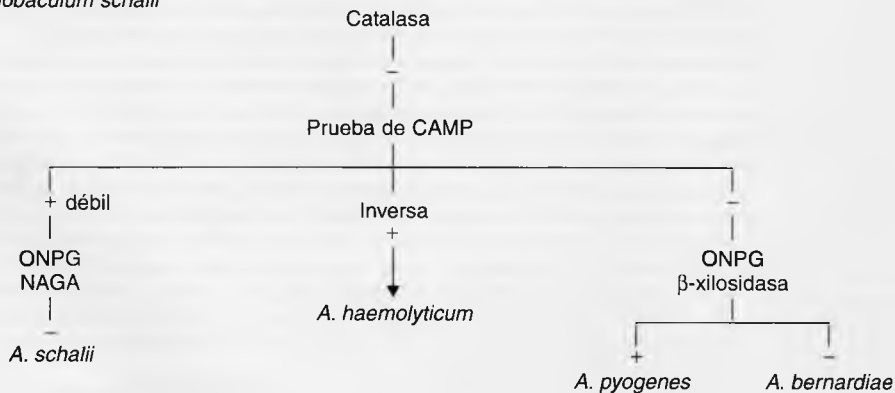
a. Especies de *Actinomyces*

b. *Arcanobacterium* y *Actinobaculum schalii*


Figura 14-3 Algoritmo para la identificación de especies de *Actinomyces*, *Actinobaculum* y *Arcanobacterium* en muestras clínicas humanas.

Especies de *Actinomyces* aisladas en animales

Muchas especies de *Actinomyces*, que incluyen varios géneros descritos originariamente, son patógenos animales. Como ya se mencionó, *A. bovis* es una causa de actinomicosis bovina. *A. hordeovulneris*, *A. canis*, *A. catuli* y *A. coleocanis* se encuentran en la vagina de perros y *A. bowdenii* ha sido aislado en infecciones cutáneas de perros y gatos.^{429,430,433,644} *A. hordeovulneris* y *A. denticolens* también se encuentran en los surcos gingivales de gatos.⁵⁵⁵ *A. hordeovulneris* ha sido asociado con actinomicosis canina, pleuritis piogranulomatosa, peritoni-

tis, pericarditis y artritis séptica.⁶⁷⁵ *A. hyovaginalis* se encuentra en el aparato genital de cerdos y ha sido aislado en lesiones purulentas del aparato genital y en el pulmón de estos animales.^{1,175} La nueva especie *A. suimastitidis* fue aislada originariamente en un cerdo con mastitis.⁴³² *A. howellii*, *A. denticolens*, *A. slackii* y *A. vaccimaxillae* se encuentran en las orofaringes de vacas; la última especie fue aislada originariamente en la lesión mandibular de una vaca.^{214,383,698} *A. marimammalium* ha sido aislado en mamíferos marinos, como focas y marsopas.⁴³⁴ El cuadro 14-13 contiene las características fenotípicas de todas las especies de *Actinomyces*.

Especies de *Arcanobacterium*

Las especies de *Arcanobacterium* son bacilos grampositivos facultativos que pueden ser ligeramente curvos y pueden mostrar una ramificación rudimentaria junto con formas en letras chinas y V. A diferencia de las especies de *Corynebacterium*, estos microorganismos son catalasa negativos, no tienen ácidos micólicos de la pared celular y contienen L-lisina y L-ornitina más que meso-DAP como el peptidoglucano diaminoácido. El género *Arcanobacterium* incluye actualmente seis especies: *A. haemolyticum*, *A. pyogenes*, *A. bernardiae*, *A. phocae*, *A. pluranimalium* y *A. hippocoleae*.^{174,431,523,705} *A. haemolyticum*, *A. pyogenes* y *A. bernardiae* eran antes miembros del género *Corynebacterium* y posteriormente del género *Actinomyces* antes de que el análisis de secuencias de rRNA 16S estableciera que era miembro del género *Arcanobacterium*.^{174,705,710} Se ha aislado *A. phocae* en focas y otros animales marinos, mientras que *A. pluranimalium* ha sido aislado en marsopas y ciervos.^{523,705} El miembro más nuevo del género, *A. hippocoleae*, ha sido aislado sólo en las secreciones vaginales de un caballo.⁴³¹

A. haemolyticum se asocia con faringitis aguda en los seres humanos.^{480,930} A menudo, las adenopatías cervicales, la amigdalitis y la erupción pueden acompañar a la infección.⁵⁶⁷ Debido a la erupción, se puede considerar que los pacientes tienen escarlatina. También se han observado "seudomembranas" faríngeas extensas semejantes a las observadas con la difteria en algunos pacientes.³⁵⁹ En general, la faringitis por *A. haemolyticum* ocurre en niños y adultos jóvenes (el grupo de 10 a 30 años). También se lo ha aislado en úlceras cutáneas crónicas, infecciones de tejidos blandos, abscesos de tejidos profundos (que incluyen abscesos encefálicos, periamigdalinos, paravertebrales e intraabdominales) e infección de espacios articulares, y ha sido asociado con sinusitis, celulitis orbitarias, neumonía, osteomielitis, endocarditis y meningitis.^{21,225,278,541,814} También se lo involucró en un caso de enfermedad de Lemierre asociado con *Fusobacterium necrophorum*.⁹⁸⁴ En general, *A. haemolyticum* es sensible a todas las clases de antibióticos, que incluyen penicilinas, cefalosporinas, macrólidos y vancomicina, y la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol se considera un hallazgo constante.^{19,219-131} Algunas cepas pueden ser resistentes a las tetraciclinas, los macrólidos, la clindamicina y la ciprofloxacina.¹³¹

Arcanobacterium bernardiae es una especie recién descrita que incluye cepas antes denominadas corineformes del grupo 2 de los CDC.³⁰⁹ Se lo aisló en distintas fuentes clínicas humanas, entre ellos sangre, heridas y orina. En 1995, Funke y cols. propusieron la inclusión de los microorganismos grupo 2 de los CDC en el género *Actinomyces* como *Actinomyces bernardiae*.³⁰⁹ El análisis de secuencia de rRNA 16S de estas cepas condujo a la propuesta ulterior de transferirla al género *Arcanobacterium* como *Arcanobacterium bernardiae*.⁷⁰⁵ Se han comunicado dos casos de infecciones urinarias complicadas y un caso de artritis séptica debidas a *A. bernardiae*.^{3,441,530} En uno de estos casos, el paciente tenía una disfunción vesical de larga data y desarrolló hidroureteronefrosis, cálculos renales, abscesos perirrenales y septicemia.⁴⁴¹

A. pyogenes es reconocido como patógeno veterinario, que produce infecciones en cerdos, ganado bovino, ovejas, cabras y animales domésticos de compañía (perros y gatos).⁸⁵ Al respecto, el microorganismo y sus infecciones tienen gran importancia económica. También se puede aislar en la leche y otros productos lácteos producidos de animales infectados. Aunque se han comunicado infecciones humanas causadas por este

microorganismo desde 1940, la validez de estas comunicaciones es cuestionable debido a la ausencia de datos microbiológicos que aseguren una distinción definida entre este agente y bacterias estrechamente relacionadas como *A. haemolyticum* (véase lámina en color 14-2G). Las infecciones por *A. pyogenes* confirmadas bacteriológicamente han incluido bacteriemia en un paciente con cáncer de colon, cinco pacientes con infecciones intraabdominales (incluida una con cáncer del cuello uterino), dos con otitis media, uno con mastoiditis, dos con cistitis (incluido uno con carcinoma prostático), dos con abscesos cutáneos y un paciente con diabetes y una infección mixta de una herida y hemocultivos positivos que contenían *pyogenes*.^{58,232,319,563} El microorganismo ha sido aislado como causa de úlceras en las piernas entre un grupo de niños de la zona rural de Tailandia.⁵⁰¹

A. haemolyticum, *A. bernardiae* y *A. pyogenes* son las especies que pueden hallarse en muestras clínicas de seres humanos. En SBA, *A. haemolyticum* crece como pequeñas colonias mate β -hemolíticas (véase lámina en color 14-6E). Se puede observar hemólisis inicialmente en áreas de crecimiento confluyente luego de 24 horas de incubación; las colonias aisladas serán β -hemolíticas luego de 48 horas de incubación. *A. haemolyticum* también es catalasa negativo y no hidroliza esculina ni urea. La mayoría de las cepas son pirazinamidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa y *N*-acetil- β -glucosaminidasa positivas y hidrólisis de gelatina y β -glucuronidasa negativas. La mayoría de las cepas fermentan glucosa, maltosa, lactosa y ribosa, y no fermentan manitol, xilosa o glucógeno (véase lámina en color 14-6F). *A. haemolyticum* es la única especie de *Arcanobacterium* que es prueba de CAMP inversa positiva (o inhibición de la prueba de CAMP positiva). En esta prueba, el efecto de la β -hemolisina de *S. aureus* sobre los eritrocitos de carnero es inhibido por la fosfolipasa de *A. haemolyticum*. Esto aparece sobre la placa de SBA como un área no hemolizada con forma de punta de flecha entre *S. aureus* y *A. haemolyticum* sembrado en estría en ángulos rectos con la estría de estafilococo. *A. bernardiae* forma pequeñas colonias lisas y espejadas en SBA que pueden ser o no β -hemolíticas. Este microorganismo es catalasa negativo y produce ácido a partir de glucosa y maltosa, pero no de sacarosa, manitol, xilosa y lactosa. A diferencia de *A. haemolyticum*, se fermenta más fácilmente la glucosa que la maltosa, y se fermenta fácilmente el glucógeno. *A. pyogenes*, la especie aislada más a menudo en los seres humanos, también es β -hemolítica y catalasa negativa. Esta especie se diferencia fácilmente de *A. haemolyticum* y de *A. bernardiae* porque es obviamente β -hemolítica a las 24 horas, es hidrólisis de gelatina positiva, fermenta la xilosa y es β -glucuronidasa (β -GUR) positiva. Las tres especies se identifican con facilidad con API Coryne. En el cuadro 14-14 se encuentran las características fenotípicas de las especies de *Arcanobacterium*.

Especies de *Arthrobacter*

Durante su examen de distintas cepas de los grupos B-1 y B-3 de los CDC, Funke y cols. encontraron 11 muestras clínicas humanas (de orina, infección cutánea, hemocultivos y endoftalmitis) que mostraron un ciclo bacilo-coco pronunciado. El análisis de la pared celular mostró que la lisina era el principal diaminoácido y la presencia de diferentes ácidos grasos celulares.²⁹⁵ Estos datos fueron compatibles con miembros del género *Arthrobacter*. Los miembros de este género se encuentran en el medioambiente y también son aislados en los animales; pocas veces se aíslan en muestras clínicas huma-

Cuadro 14-13A Características bioquímicas para la identificación de especies de *Actinomyces* aisladas en seres humanos y animales

ESPECIE	CAT	MORFOLOGÍA PIGMENTACIÓN DE LAS COLONIAS	HEMOL SBA	RED NO ₃	PYZ	AP	ESC	URE	ADH
<i>A. bovis</i>	-	Lisas o granulosas con centros oscuros, blancas, de bordes continuos (lisos)	-/β	-	ND	-	V+	-	ND
<i>A. bowdenii</i>	+	Pequeñas, blanco grisáceas	-	+	+	V	+	-	-
<i>A. canis</i>	+	No descritas	-	-	+ ^d	-	-	-	-
<i>A. cardiffensis</i>	-	Pequeñas, convexas, de color crema a rosado, y de bordes lisos	-	V	-	-	-	-	-
<i>A. catuli</i>	V	Pequeñas, convexas, blancas, adherentes	-	+	+	-	+	-	V
<i>A. coleocanis</i>	-	No informada	-	-	+ ^d	-	-	-	-
<i>A. denticolens</i>	-	De bordes continuos (lisos), convexas o umbilicadas, lisas, pigmentación rosada clara	-	+	ND	-	+	ND	ND
<i>A. europaeus</i>	-	Pequeñas, grisáceas, translúcidas	-/β ^d	-	-	-	V	-	ND
<i>A. funkei</i>	-	Pequeñas, grises	-	V	V	+	-	-	-
<i>A. georgiae</i>	-	Pequeñas, circulares, de bordes lisos, convexas	-	V-	ND	ND	+ ⁻	-	ND
<i>A. gerencseriae</i>	-	Pequeñas, circulares, convexas	V	V-	ND	ND	+	-	ND
<i>A. graevenitzii</i>	-	Pequeñas, adherentes, ligeramente rosadas en SBA	-	-	ND	ND	-	-	ND
<i>A. hongkongensis</i>	-	Pequeñas, puntiformes	-	-	ND	+	-	-	+
<i>A. hordeovulneris</i>	+ ^d	Blancas, adherentes, con forma de cúpula, consistencia mantecosa	-	-	V	-	+	-	ND
<i>A. howellii</i>	+	Blancas, lisas, convexas, de bordes continuos (lisos)	ND	-	+	+	+	-	+
<i>A. hyovaginalis</i>	-	Planas con bordes hacia afuera	-	V	-	+	+	-	-
<i>A. houstoniensis</i>	-	Pequeñas, grises, convexas	-	+	ND	-	-	-	ND
<i>A. israelii</i>	-	Rugosas, apiladas, "en diente molar", blancas a blanco grisáceas	-	V+	ND	ND	+	-	ND
<i>A. marimammalium</i>	-	Pequeñas, grises, convexas, de bordes lisos	-	-	-	V	-	-	-
<i>A. meyeri</i>	-	Pequeñas, planas a convexas, blancas, brillantes, lisas	-	V-	ND	-	-	V	ND
<i>A. naeslundii</i> genoespecie 1	V-	Lisas, circulares, convexas, umbilicadas	-	V+	+	-	+	+	-
<i>A. naeslundii</i> genoespecie 2	V+	Lisas, circulares, convexas, umbilicadas	-	+	+	+ ^d	+	+	-
<i>A. nasicola</i>	-	Puntiformes, blanco grisáceas, opacas, de bordes lisos	-	-	ND	-	V	-	V
<i>A. neuii</i> subespecie <i>neuii</i>	+	Circulares, pequeñas, convexas, opacas	α	+	+	-	-	-	ND
<i>A. neuii</i> subespecie <i>anitratus</i>	+	Circulares, pequeñas, convexas, opacas	-	-	+	V	-	-	ND
<i>A. odontolyticus</i>	-	Pequeñas, pigmentación rosada en SBA, rojas en BHI	-	+	ND	-	V	-	-
<i>A. oricola</i>	-	Puntiformes, "en miga de pan", blancas	-	-	+	V	+	-	-
<i>A. radidentis</i>	+	Pigmentación rosada, pequeñas, de bordes lisos	-	V	+	-	+ ^d	V	-
<i>A. radingae</i>	-	Pequeñas, grises, convexas, circulares, opacas	α/β ^d	-	V	-	+	-	ND
<i>A. slackii</i>	+	Pequeñas, grises, opacas	-	+	V	-	+	V-	-
<i>A. suimastitidis</i>	-	No descritas	-	-	+ ^d	V	+	-	-
<i>A. turicensis</i>	-	Pequeñas, grises, opacas, enteras	β ^d	-	-	-	-	-	ND
<i>A. urogenitalis</i>	-	No descritas	-	+	-	V	+	-	-
<i>A. vaccimaxillae</i>	-	Pequeñas, blancas, opacas, de bordes lisos	-	-	+	+	+	-	-
<i>A. viscosus</i> serotipo 1	+	Pequeñas, lisas, circulares de bordes continuos (lisos)	-	V	-	-	+	+	-
<i>A. viscosus</i> serotipo 2	+	Pequeñas, lisas, circulares de bordes continuos (lisos)	-	V	+	-	V	V	V

+, reacción positiva; -, reacción negativa; +^d, reacción positiva débil o retardada; V, reacción variable; V+, variable, mayoría de cepas positivas; V-, variable, mayoría de cepas negativas; ND, datos no disponibles; Cat, catalasa; Fac, facultativo; Ana, anaerobio; Cat, catalasa; Hemol SBA, hemólisis en agar sangre de carnero; BHI, agar con infusión de cerebro y corazón; Red NO₃, reducción de nitrato a nitrito; PYZ, pirazinamidas; AP, fosfatasa alcalina; ESC, hidrólisis de esculina; URE, hidrólisis de urea; ADH, dihidrolasa que produce arginina; MOT, motilidad; GEL, hidrólisis de gelatina; LAP, leucina arilamidasa; PYR, pirrolidonil arilamidasa; Prueba CAMP, prueba de CAMP con *S. aureus* que produce

GEL	LAP	PYR	PRUEBA CAMP	α -GAL	β -GAL	α -GLU	β -GLU	β -GUR	NAGA	HIP	ACETOÍNA
-	+	ND	ND	-	-	-	-	-	+	-	-
-	+	ND	ND	+	+	V	+	-	-	-	-
-	+	-	ND	+	+	+	-	-	+	-	-
	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-
-	+	+	ND	V	+	+	+	+	V	-	-
-	ND	-	ND	-	+	+	-	-	-	-	-
ND	+	ND	ND	V	+	+	V	-	-	-	ND
⁺ _d	+	-	-	+	+	+	-	-	-	ND	ND
-	+	-	+	-	V	+	-	-	V	+	-
V	ND	ND	-	ND	+	+	ND	ND	-	ND	ND
V-	ND	ND	-	ND	+	+	ND	ND	-	ND	ND
-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	ND
-	+	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND
⁺ _d	ND	V	ND	+	ND	+	V	-	+	ND	ND
-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	+	ND	ND
-	+	-	ND	V	+	+	+	-	ND	-	-
-	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
-	ND	ND	-	ND	+	+	ND	ND	-	ND	ND
-	+	-	ND	-	+	-	-	-	+	-	-
-	+	ND	+	-	V	+	-	-	V	-	-
-	+	ND	-	V	+	+	+	-	-	-	-
-	+	ND	+	V	V	+	+	-	-	ND	ND
-	+	-	ND	-	+	+	V	-	+	ND	-
-	+	ND	+	+	+	+	-	-	-	ND	ND
-	+	ND	+	+	+	+	-	-	-	ND	ND
-	V	ND	-	-	+	V	V	-	-	-	-
-	-	ND	ND	+	V	+	+	-	-	-	-
⁺ _d	+	ND	-	+	+	+	+	-	-	-	⁺ _d
-/ ⁺ _d	-	-	-	+	+	+	+	-	+	ND	ND
V	ND	+	ND	+	ND	+	+	-	-	ND	ND
-	ND	ND	ND	+	+	+	+	-	V	-	⁺ _d
-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	ND
-	+	+	ND	+	+	+	+	-	+	ND	V
-	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-
-	+	ND	ND	-	V	V	+	-	-	-	-
-	+	ND	ND	-	V	V	+	-	-	-	-

β -hemolisina; α -GAL, α -galactosidasa; β -GAL, β -galactosidasa; α -GLU, α -glucosidasa; β -GLU, β -glucosidasa; β -GUR, β -glucuronidasa; NAGA, N-acetil- β -D-glucosaminidasa; Hip, hidrólisis de hipurato; Glu, glucosa; Mal, maltosa; SAC, sacarosa; MntI, manitol; Xil, xilosa; Lac, lactosa; Mne, manosa; Arab, arabinosa; Sorb, sorbitol; Raf, rafinosa; Tre, trehalosa; Glyc, glucógeno; Amyg, amigdalina; Meli, melibiosa; Melez, melezitosa; S, cantidades importantes de ácido succínico a partir de glucosa; l, cantidades menores de ácido láctico a partir de glucosa; f, cantidades menores de ácido fórmico a partir de glucosa.

(Continúa)

Cuadro 14-13B Características bioquímicas para la identificación de especies de *Actinomyces* aisladas en seres humanos y animales

ESPECIE	RELACIÓN CON O ₂	GLU	MAL	SAC	MNTL	XYL	LAC	MNE	ARAB	SORB	RAF
<i>A. bovis</i>	Ana/Fac	+	+	+	-	-	+	V	-	-	-
<i>A. bowdenii</i>	Fac	+	+	+	-	-	+	ND	-	-	+
<i>A. canis</i>	Fac	+	+	V	-	+	+	ND	+	-	V
<i>A. cardiffensis</i>	Fac	+	V	V	-	-	-	V	-	-	V
<i>A. catuli</i>	Fac	+	+	+	-	+	+	ND	V	-	+
<i>A. coleocanis</i>	Fac	+	+	-	-	-	+	ND	-	-	-
<i>A. denticolens</i>	Fac	+	+	+	V	-	+	V	-	-	+
<i>A. europaeus</i>	Fac	+	+	V	-	-	-	V	-	-	-
<i>A. funkei</i>	Fac	+	V	+	-	+	V	ND	-	-	-
<i>A. georgiae</i>	Fac	+	+	+	V-	+	V+	V-	V-	V-	V-
<i>A. gerencseriae</i>	Ana/Fac	+	+	+	V	+	+	+	-	V	+
<i>A. graevenitzii</i>	Fac	+	+	+	-	-	+	ND	-	-	-
<i>A. hongkongensis</i>	Ana	-	ND	ND	ND	-	ND	-	-	ND	-
<i>A. hordeovulneris</i>	Ana/Fac	+	+	+	-	+	+	+ ^d	V	ND	+ ^d
<i>A. howellii</i>	Ana/Fac	+	+	+	-	+	V	V	-	ND	+ ^d
<i>A. hyovaginalis</i>	Fac	+	+	+	-	+	V	+	+	-	-
<i>A. houstoniensis</i>	Fac	+	ND	+	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>A. israelii</i>	Ana/Fac	+	+	+	V+	+	+	+	V+	V-	+
<i>A. marimammalium</i>	Fac	+	+	-	-	-	+	ND	-	-	-
<i>A. meyeri</i>	Ana/Fac	+	+	+	-	+	V+	-	V-	-	-
<i>A. naeslundii</i> genoespecie 1	Fac	+	+	V+	-	V-	V	+	-	-	+
<i>A. naeslundii</i> genoespecie 2	Fac	+	+	V+	+	V+	V	+	-	V	+
<i>A. nasicola</i>	Fac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. neuui</i> subespecie <i>neuui</i>	Fac	+	+	+	V	+	+	+	V+	ND	+
<i>A. neuui</i> subespecie <i>anitratus</i>	Fac	+	+	+	V+	+	+	+	-	ND	+
<i>A. odontolyticus</i>	Ana/Fac	+	V+	+	-	V	V	-	V	-	-
<i>A. oricola</i>	Fac	+	V+	+	-	-	-	ND	-	-	+
<i>A. radidentis</i>	Fac	+	+	+	+	-	+	ND	-	-	+
<i>A. radingae</i>	Fac	+	+	+	-	+	V+	ND	VD	ND	V
<i>A. slackii</i>	Fac	+	ND	V	-	+	ND	ND	-	ND	ND
<i>A. suimastitidis</i>	Fac	+	V	+	-	+	-	ND	+ ^d	-	+
<i>A. turicensis</i>	Fac	+	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	-
<i>A. urogenitalis</i>	Fac	+	+	+	V	+	+	ND	V	-	+
<i>A. vaccimaxillae</i>	Fac	+	-	V	V	+	+	ND	+	-	-
<i>A. viscosus</i> serotipo 1	Fac	+	V	+	-	V-	V+	V	-	-	+
<i>A. viscosus</i> serotipo 2	Fac	+	V	+	-	-	V+	V	-	-	+

+, reacción positiva; -, reacción negativa; +d, reacción positiva débil o retardada; V, reacción variable; V+, variable, mayoría de cepas positivas; V-, variable, mayoría de cepas negativas; ND, datos no disponibles; Cat, catalasa; Fac, facultativo; Ana, anaerobio; Cat, catalasa; Hemol SBA, hemólisis en agar sangre de carnero; Reducción de NO₃, reducción de nitrato a nitrito; PYZ, pirazinamidasa; AP, fosfatasa alcalina; ESC, hidrólisis de esculina; URE, hidrólisis de urea; ADH, dihidrolasa que produce arginina; MOT, motilidad; GEI, hidrólisis de gelatina; LAP, leucina arilamidasa; PYR, pirrolidonil arilamidasa; Prueba CAMP, prueba de CAMP con *S. aureus* productor de β-hemolisina; α-GAL,

RIB	TRE	GLY	GLYCG	AMYG	MELI	MELEZ	FERMENTACIÓN (GLC)	PRODUCTOS DE GLUCOSA BIOCÓDIGOS API FRECUENTES
–	–	–	+	–	V	–	S, A, L, f	0101104
+	+	ND	ND	ND	+	+	S, L, A	3410365, 3400365, 3510365, 3500365
+	–	ND	+	ND	–	–	ND	2430766, 2430767
V	–	ND	–	–	–	–	L, S, a	0010121, 0010321, 1010121, 1010321
+	+	ND	–	ND	V	–	S, L, a	7650761, 7650765, 7670761, 7670765
–	–	ND	+	ND	–	–	S, L	2410162
V	–	–	ND	–	ND	–	S, A, L	ND
V	V	ND	V	–	V	V	S	04 (1/5) 0 (1/3) 2 (0/1/2/3); GEL + después de 5 días
V	–	ND	–	ND	–	–	ND	0130761, 3530761
–	+	V	+	V–	–	V–	S, l, a, f	ND
V+	+	–	V–	V+	V	V	S, L, a, f	ND
+	–	+	–	–	–	–	L, S	(0,2)(0,4)2036 ¹
–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
V	V	–	V	ND	–	–	L, S	ND
–	V+	–	–	–	V	V	ND	ND
V	–	V	–	+	–	–	ND	0570721, 0170721
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
V+	+	–	–	V+	V+	V	S, A, L, f	ND
–	–	ND	V	ND	–	–	S, A, L	0520162, 0420160, 0520160
+	–	V	V	V+	–	–	S, a, l, f	ND
V	V+	V	–	V	V	–	L, s, a, f	ND
V	V+	V	V	V	V	V	L, s, a, f	ND
–	–	–	–	–	–	–	S, a, l	ND
+	+	+	V+	ND	V+	+	S, L	Incluido en la base de datos de API Coryne
+	+	+	V	ND	+	+	S, L	Incluido en la base de datos de API Coryne
V	V	V	V	–	–	–	S, A, f	ND
V	+	ND	ND	+ ^d	–	–	S, A, L	ND
+	+	ND	–	ND	+	+	ND	ND
+	ND	ND	–	ND	ND	ND	ND	Incluido en la base de datos de API Coryne
–	+	ND	–	ND	+	ND	ND	ND
+ ^d	–	ND	ND	ND	+	–	ND	ND
+	+	+	–	ND	ND	ND	ND	00170721, 0010701, 0010723, 1010701; incluido en la base de datos de API Coryne
V	+	ND	–	ND	+	+	ND	ND
+	+	ND	+	–	–	–	S, L, a	ND
–	V–	–	V	–	–	–	S, A, L, f	ND
+	V	V	V	–	V	–	S, A, L, f	ND

α -galactosidasa; β -GAL, β -galactosidasa; α -GLU, α -glucosidasa; β -GLU, β -glucosidasa; β -GUR, β -glucuronidasa; NAGA, N-acetil- β -D-glucosaminidasa; Hip, hidrólisis de hipurato; Glu, glucosa; Mal, maltosa; SAC, sacarosa; Mnit, manitol; Xil, xilosa; Lac, lactosa; Mne, manosa; Arab, arabinosa; Sorb, sorbitol; Raf, rafinosa; Tre, trehalosa; Glycg, glucógeno; Amyg, amigdalina; Meli, melibiosa; Melez, melejitosa; S, cantidades importantes de ácido succínico a partir de glucosa; l, cantidades menores de ácido láctico a partir de glucosa; f, cantidades menores de ácido fórmico a partir de glucosa.

Cuadro 14-14 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Arcanobacterium*

PRUEBA	A. BERNARDIAE	A. HAEMOLYTICUM	A. HIPPOCOLEAE	A. PHOCAE	A. PLURANIMALIUM	A. PYOGENES
Catalasa	–	–	–	V	+	–
Hemólisis, SBA	V	β	β	β	α	β
Reducción de NO ₃	–	–	–	–	–	V
Pirazinamidasa	+	+	–	+	V	V–
Fosfatasa alcalina	–	V+	V+	+	–	V
Hidrólisis de esculina	–	–	+ ^d	–	+ ^d	–
Arginina dihidrolasa	ND	ND	–	ND	–	ND
Hidrólisis de hipurato	ND	ND	+	ND	+	ND
Producción de acetoina	ND	ND	–	ND	–	ND
Hidrólisis de gelatina	–	ND	–	–	+	+
Ácido producido a partir de:						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	V	+	V	+
Sacarosa	–	V	–	+	–	V
Manitol	–	–	–	V–	–	V
Xilosa	–	–	–	–	–	+
Lactosa	–	+	+	+	–	+
Manosa	ND	ND	ND	V+	ND	+
Arabinosa	ND	ND	–	–	–	V
Sorbitol	ND	ND	–	–	–	V
Rafinosa	ND	ND	–	–	–	–
Ribosa	V+	V+	–	+	+	ND
Trehalosa	ND	ND	–	V+	–	+
Glicerol	+	–	ND	+	ND	ND
Glucógeno	V+	ND	–	+	–	+
Amigdalina	–	ND	ND	ND	ND	–
Melibiosa	ND	ND	–	–	–	–
Melezitosa	ND	ND	–	V+	–	+
LAP	+	ND	+	+	ND	ND
PYR	V	V	–	–	ND	+
α-GAL	–	ND	–	+	–	–
β-GAL	–	V+	+	+	–	+
α-GLU	+	+	+	+	–	+
β-GLU	–	–	–	–	–	–
β-GUR	–	V	+	–	+	+
NAGA	–	V+	V	–	–	V

+, reacción positiva; –, reacción negativa; V, reacción variable; V+, reacción variable, mayoría de cepas positivas; V–, reacción variable, mayoría de cepas negativas; +^d, reacción positiva débil.

nas.^{249,435} Algunas comparaciones quimiotaxonómicas y genéticas de estas cepas con las especies de *Arthrobacter* ambientales existentes condujeron a proponer dos especies de *Arthrobacter* nuevas –*A. cummingsii* y *A. woluwensis*– para

algunos las cepas grupos B-1 y B-3 de los CDC.²⁹⁵ Un análisis realizado en 1998 de 15 muestras clínicas de *A. cummingsii* del aparato urinario, oído medio, líquido amniótico, vagina, osteomielitis calcánea, celulitis de tejidos profundos, cuello uterino,

sangre y heridas puso en evidencia patrones singulares de los ácidos grasos celulares, con la presencia constante de C14:0i y C14:0, y cantidades extraordinariamente altas de ácidos grasos C16:0 y C16:0i, que no se encuentran en otras especies de *Arthrobacter*.³⁰⁴ Cuando se evaluaron estas cepas en API Coryne, se observaron muchos biotipos después de 24 horas y 7 días de incubación. (Véase cuadro 14-13).

A. cummingsii es la especie de *Arthrobacter* aislada más a menudo en muestras clínicas humanas. Este microorganismo es catalasa positivo, LAP positivo, inmóvil y tanto nitrato reductasa como hidrólisis de esculina negativo. Algunas cepas producen ureasa y la mayoría tienen tanto actividad de DNasa como de gelatinasa. Aunque la mayoría producen ácido a partir de ribosa, la producción de ácido a partir de glucosa es variable, y no se produce ácido a partir de maltosa, sacarosa, manitol, xilosa, lactosa o glucógeno.³⁰⁴ *A. woluwensis* hidroliza esculina, urea, gelatina y DNA y, al contrario de *A. cummingsii*, produce varias actividades enzimáticas, que incluyen β -galactosidasa (β -GAL), α -glucosidasa (α -GLU), β -glucosidasa (β -GLU) y *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGA). En la mayoría de las comunicaciones sobre estos microorganismos, se utilizó API CHO® (BioMérieux), un panel de asimilación de hidratos de carbono (sin fermentación) para la caracterización, pero este sistema no suele emplearse en los laboratorios clínicos. Desde que se describieron *A. cummingsii* y *A. woluwensis*, se han aislado otras especies de *Arthrobacter* descritas antes (*A. oxydans*) y tres especies nuevas de *Arthrobacter* (*A. creatinolyticus*, *A. luteolus* y *A. albus*) en muestras clínicas humanas, que incluyen sangre, heridas quirúrgicas y orina.^{428,938} *A. creatinolyticus* hidroliza creatina, xantina y gelatina, pero no almidón. Esta especie también produce ácido a partir de glicerol, pero la descripción original no describió la acidificación de hidratos de carbono. Las especies de *Arthrobacter* están incluidas en la base de datos API Coryne; no obstante, las cúpulas para la fermentación de hidratos de carbono suelen ser negativas después de 24 horas. La incubación prolongada de los paneles de identificación (hasta 5 a 7 días) puede conducir a la utilización oxidativa lenta de algunos hidratos de carbono. En el cuadro 14-15 se presentan algunas características fenotípicas y bioquímicas de las especies de *Arthrobacter* aisladas en las especies clínicas.

Especies de *Brevibacterium*

Las especies de *Brevibacterium* son bacterias irregulares, delgadas, con forma de bacilos que muestran un ciclo bacilócoco pronunciado. Los subcultivos frescos (< 3 días) se tiñen como bacilos, pero a medida que el cultivo envejece (4-7 días), las células pueden tener morfología de cocos. Ambas formas del microorganismo son grampositivas, pero fácilmente pueden cambiar de color. Las células con forma de bacilo muestran una morfología difteroides y son no ácido-alcohol resistentes. Las especies de *Brevibacterium* son aerobias estrictas y tienen metabolismo oxidativo. Son inmóviles y tolerantes a la sal (NaCl > 6.5%), producen catalasa y proteinasas, no tienen ureasa y no producen ácido a partir de glucosa ni otros hidratos de carbono en medios con peptona. Las brevibacterias también producen característicamente metanetiol (CH₃SH) a partir de L-metionina. El peptidoglucano contiene *meso*-DAP como diaminoácido principal, pero no contiene arabinosa, lisina ni ácidos micólicos (se puede presentar o no galactosa).^{123,462}

En la actualidad, el género *Brevibacterium* está compuesto por nueve especies: *B. linens*, *B. iodinum*, *B. casei*, *B. epidermidis*, *B. mcbrellneri*, *B. otitidis*, *B. paucivorans*, *B. lutescens*

y *B. avium*. En la edición de 1986 del *Bergey's Manual* se describieron cuatro especies: *B. linens*, *B. iodinum*, *B. casei* y *B. epidermidis*.⁴⁶² *B. casei* y *B. epidermidis* crecen en condiciones óptimas a 30-37 °C, mientras que *B. linens* y *B. iodinum* prefieren hacerlo a 20-30 °C. Las colonias de estos microorganismos son blanco grisáceas, blanco amarillentas, amarillas u ocre y tienen un olor intenso "a queso" (véase lámina en color 14-6G). El hábitat de las brevibacterias es fundamentalmente los productos lácteos, en los cuales las bacterias contribuyen al aroma y el color (p. ej., *B. linens* con pigmento anaranjado) de los quesos que maduran superficialmente (p. ej., queso Limburger). También se encuentran sobre las superficies cutáneas humanas. Cuando residen sobre la piel humana en condiciones de maceración y humedad (p. ej., entre los dedos del pie y otras zonas intertriginosas), se cree que contribuyen al olor corporal. *B. mcbrellneri*, descrito en 1993, fue aislado en los pelos de los genitales humanos que estaban infectados simultáneamente por *Trichosporon beigeli*.⁵⁹³ *Brevibacterium otitidis*, una especie aislada en seres humanos con otorrea bilateral, fue descrito en 1996.⁶⁶² *B. paucivorans*, descrito en 2001, ha sido aislado de LCR, abscesos, heridas, sangre, secreción ótica y catéteres intravasculares.⁹³⁹ *B. lutescens* es una especie similar a *B. otitidis* aislada en líquido de diálisis peritoneal humana y en una secreción ótica infectada en 2003.⁹³⁷ *B. avium* ha sido aislado en lesiones granulomatosas en aves de corral.⁶⁶¹

Las brevibacterias son causas raras de infecciones humanas y el examen de las cepas clasificadas antes como grupos B-1 y B-3 de los CDC estableció que algunas eran, de hecho, especies de *Brevibacterium*. En 1991, McCaughey comunicó el primer caso documentado de infección de una vía venosa central causado por *B. epidermidis* en un hombre de 40 años.⁵⁹⁵ En 1993, Gruner y cols. aislaron nueve cepas de *Brevibacterium*, en el líquido de diálisis de pacientes que se encontraban en diálisis peritoneal ambulatoria continua, hemocultivos, esputo, LCR, líquido pleural y otro líquido corporal.³⁷¹ La comparación de sus características bioquímicas con las cepas de *Brevibacterium* de referencia indicó que estos microorganismos eran *B. casei* o *B. epidermidis*. Estos investigadores sugirieron que los bacilos aerobios, grampositivos y catalasa positivos que son inmóviles y no fermentan azúcares pueden ser identificados como especies presuntivas de *Bacteroides* sobre la base de la pigmentación y la morfología de las colonias (blancas grisáceas a amarillas, opacas, convexas y lisas) y un olor intenso a "queso" o "pies hediondos". Estos mismos investigadores examinaron luego 41 cepas clínicas grupos B-1 y B-3 de los CDC y observaron que 22 eran idénticas a *B. casei* y otras 5 formaban otro grupo fenotípico dentro del género *Brevibacterium*.³⁷² Funke y Carlotti también examinaron 43 cepas de *Brevibacterium* aisladas en muestras clínicas en los últimos 20 años y las compararon con cepas de referencia.²⁹⁰ Utilizando análisis quimiotaconómico y pruebas de asimilación de hidratos de carbono con el panel de asimilación de hidratos de carbono API 50CH, 41 fueron identificadas como *B. casei* y 2 como *B. epidermidis*. Las colonias de *B. casei* suelen ser gris blancuzcas, mientras que las cepas de *B. epidermidis* desarrollan colonias amarillentas con el tiempo. Se puede utilizar la detección de metanetiol y el análisis de ácidos grasos celulares para confirmar la asignación de la cepa al género *Brevibacterium*, y se pueden utilizar asimilaciones de hidratos de carbono para identificarla con la especie. Las brevibacterias también están incluidas en las bases de datos del API Coryne y el RapID CB-Plus (véase lámina en color 14-6H). En el cuadro 14-16 se muestran las características bioquímicas de las especies de *Brevibacterium*.

Cuadro 14-15 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Arthrobacter*

CARACTERÍSTICA	A. ALBUS	A. CITREUS	A. CREATI- NOLYTICUS	A. CUMMINSH	A. LUTEOLUS	A. OXYDANS	A. WOLU- WENSIS
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis, SBA	–	ND	–	–	–	–	–
Crecimiento, 20 °C	–	+	ND	V	+	+	+
Crecimiento, 42 °C	+	–	ND	+	+	V	+
Reducción de NO ₃	–	+	+	–	+	+	–
Pirazinamidasa	+	ND	ND	V	+	ND	ND
Fosfatasa alcalina	+	ND	ND	V	ND	ND	+
Hidrólisis de esculina	–	ND	ND	–	–	–	+ 3 días
Ureasa	–	ND	ND	V	–	–	+ 3 días
Motilidad	–	+sl	–	–	+	–	–
Hidrólisis de gelatina	+ ¹	+	+	+ 10 días	+	+	+ 24 horas
DNasa	–	+	ND	+ 10 días	+	+	+ 24 horas
LAP	+	ND	ND	+	+	ND	+
PYR	+	–	ND	+	–	–	+
α-GAL	–	ND	ND	–	–	ND	–
β-GAL	–	+	ND	–	–	+	+
α-GLU	–	+	ND	–	+	+	+
β-GLU	–	ND	ND	–	–	ND	+
α-GUR	–	ND	ND	–	–	ND	–
NAGA	–	+	ND	–	–	–	+
Ácido de forma oxidativa a partir de:							
Glucosa	–	+	–	V	+	+	+
Maltosa	–	ND	ND	–	+	–	ND
Sacarosa	–	ND	ND	–	+	+	ND
Manitol	–	+	ND	–	–	+	+
Xilosa	–	ND	–	–	+	–	ND
Lactosa	ND	ND	ND	–	–	ND	ND
Biocódigos API Coryne frecuentes	6102004, 6100004	ND	ND	Varía (depende de la duración de la incubación)	3110004	3750004	ND

+, reacción positiva; –, reacción negativa; V, reacción variable; +¹, reacción positiva tardía; ND, datos no disponibles.

En la actualidad se han publicado varias comunicaciones de casos que documentan las especies de *Brevibacterium* como agentes oportunistas. Se han informado las brevibacterias como causa de bacteriemia persistente en pacientes con enfermedades subyacentes, como leucemia linfoblástica, linfoma no Hodgkin y cáncer testicular.^{483,543,648,714} Una especie de *Brevibacterium* también fue aislada como causa de osteomielitis esternal en un varón de 4 semanas.⁶³⁰ Se ha informado *B. iodinum* y *B. otitidis* como causas de peritonitis en pacientes que se someten a diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{29,941} En 2000, Brazzola y cols. aislaron *B. casei* tanto en sangre periférica como en sangre recogida a través de un Porto-Cath

de una mujer de 18 años con SIDA y, en 2002, Janda y cols. aislaron *B. casei* en la sangre de un hombre de 34 años con SIDA y sepsis a partir de una vía.^{109,451} Se describió endocarditis de válvula protésica debida a *B. otitidis* en un paciente en los National Institutes of Health.²⁰⁴

Especies de *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium* y *Oerskovia*

Las especies de *Cellulomonas* son microorganismos principalmente ambientales que aparecen como bacilos corineformes irregulares y delgados que pueden parecer más cocoides en los cultivos más antiguos. Son grampositivos (aunque cambian

Cuadro 14-16 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Brevibacterium*

CARACTERÍSTICA	<i>B.</i> <i>AVIUM</i>	<i>B. CASEI</i>	<i>B.</i> <i>EPIDERMIDIS</i>	<i>B.</i> <i>IODINUM</i>	<i>B.</i> <i>LINENS</i>	<i>B.</i> <i>LUTESCENS</i>	<i>B.</i> <i>MCBRELLNERI</i>	<i>B.</i> <i>OTITIDIS</i>	<i>B. PAUCI-</i> <i>VORANS</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis, SBA	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Reducción de NO ₃	+	V–	V+	+	ND	–	–	–	–
Pirazinamidasa	ND	+	+	+	+	+	–	+	–
Fosfatasa alcalina	+	+	ND	ND	ND	V	ND	+	–
Hidrólisis de esculina	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
Ureasa	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
Crecimiento, NaCl al 6,5%	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND	ND
DNasa	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
Hidrólisis de:									
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+ [†]	+	+ [†]
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Xantina	+	+	+	+	+	–	V	–	–
Ácido a partir de hidratos de carbono	–	–	–	–	–	–	–	–	–
LAP	+	+	ND	ND	ND	+	ND	+	+
PYR	ND	V+	–	–	–	+	–	+	–
α-GAL	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
β-GAL	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
α-GLU	–	V+	–	–	–	–	–	–	–
β-GLU	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
β-GUR	–	–	ND	ND	ND	–	ND	–	–
NAGA	–	–	+	–	–	+	+	–	V–
Biocódigos API Coryne frecuentes	ND	6112004, 4112004	ND	ND	ND	6002004, 6102004	ND	6002004	0000004

+, reacción positiva; –, reacción negativa; +[†], reacción positiva tardía; V, reacción variable; V+, reacción variable, mayoría de cepas positivas; V–, reacción variable, mayoría de cepas negativas; ND, datos no disponibles.

fácilmente de color), no ácido-alcohol resistentes y pueden ser inmóviles o móviles debido a flagelos polares únicos o laterales escasos. Las colonias de estos microorganismos suelen ser opacas, convexas y de pigmento amarillo. El peptidoglucano de la pared celular contiene L-ornitina y no contiene meso-DAP, glicina, lisina u homoserina.⁸⁴¹ Estos microorganismos tienen metabolismo oxidativo o fermentativo; la mayoría de las cepas producen ácido a partir de glucosa tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Las especies de *Cellulomonas* son catalasa positivas, hidrolizan celulosa, almidón y gelatina (reacción débil), reducen nitrato a nitrito y producen DNasa. El género *Cellulomonas* incluye más de ocho especies válidas que se aíslan en distintos medioambientes.³⁰⁷

Algunas cepas corineformes de los grupos A-3 y A-4 de los CDC se reconocen ahora como especies de *Cellulomonas* que han sido aisladas en muestras clínicas humanas.^{307,315,397} Funke y cols. examinaron muestras clínicas de LCR (dos muestras) y sangre (dos muestras); ambas cepas de LCR habían sido identificadas desde el punto de vista fenotípico como grupo A-3 de los CDC, mientras que las de hemocultivos fueron identificadas como grupo A-4 de los CDC.³⁰⁷ Estas cepas se compararon con cepas tipo de las especies de *Cellulomonas* ambientales caracterizadas mediante análisis de peptidoglucano y ácidos grasos celulares además de las pruebas fenotípicas utilizadas para la caracterización de los corineformes. Los resultados de las pruebas fenotípicas para estos aislados no se correspondieron con ninguna de las especies de *Cellulomonas* existentes. Las cuatro cepas clínicas aisladas contenían L-ornitina como diaminoácido peptidoglucano, reforzando así la afinidad con las especies de *Cellulomonas*. La secuenciación parcial de los rRNA 16S de estos microorganismos validaron más las similitudes con las especies de *Cellulomonas*, y Funke y cols. propusieron formalmente asignar las cepas del grupo A-3 y algunas cepas del grupo A-4 de los CDC a un género nuevo, *Cellulomonas hominis*. Estos microorganismos han sido aislados en muestras de humor vítreo luego de lesiones penetrantes o trasplantes intraoculares de cristalino, hemocultivos asociados con sepsis relacionada con catéteres, endocarditis de válvula nativa y líquido cefalorraquídeo.^{88,185,392,539}

Las cepas de *C. hominis* son bacilos grampositivos cortos, delgados e inmóviles. Las colonias en SBA son lisas, circulares, convexas y blancas; se desarrolla una pigmentación amarillenta después de unos 3 días. Se hidroliza esculina, gelatina y DNA y se reduce nitrato a nitrito, pero no se produce ureasa. Este microorganismo es fermentativo, y produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, xilosa y lactosa, pero no de manitol. A diferencia de las especies de *Cellulomonas* ambientales, *C. hominis* no hidroliza la celulosa. Las especies de *Cellulomonas* están incluidas en la base de datos API Coryne, pero estos microorganismos suelen dar una prueba cruzada con las especies de *Microbacterium*. *Cellulomonas turbata* es el mismo microorganismo que *Oerskovia turbata* (véase más adelante).

Los bacilos corineformes asignados al género *Oerskovia*—*O. turbata* y *O. xanthineolytica*— fueron designados originariamente como corineformes grupos A-1 y A-2 de los CDC, respectivamente, y estaban relacionados con los grupos A-3, A-4 y A-5. Sin embargo, las primeras pruebas genéticas y quimiotaxonómicas sugirieron que las dos especies de *Oerskovia* no estaban estrechamente relacionadas. En 1982, Stackbrandt y cols. propusieron la unión de los géneros *Oerskovia* y *Cellulomonas* sobre la base de las pruebas filogenéticas, con el epíteto de género *Cellulomonas* que tiene precedencia.^{840,942} El nombre *Cellulomonas cellulans* fue propuesto para *O. xanthi-*

neolytica, y *O. turbata* se convirtió en *Cellulomonas turbata*. Sin embargo, el cambio de nombre no tuvo en cuenta la aparente falta de relación de “*C. cellulans*” con “*C. turbata*”. El análisis de los dendrogramas de rDNA 16S proporcionó pruebas de que “*C. cellulans*” se ramificaba fuera de los límites filogenéticos del género *Cellulomonas* y era un “vecino filogenético más cercano” del género *Promicromonospora*. Además, el análisis quimiotaxonómico de la pared celular de “*C. cellulans*” ha mostrado que la cepa tipo y otras cepas de esta especie tienen un peptidoglucano “tipo A4α”, una característica que no se ha hallado entre los miembros del género *Cellulomonas*, que incluyen “*C. turbata*”. Se observó que L-lisina es el principal diaminoácido de la pared celular de “*C. cellulans*”, mientras que otras especies de *Cellulomonas* contienen L-ornitina. La concordancia entre la posición filogenéticamente distinta de este microorganismo en el dendrograma rDNA 16S y sus diferentes propiedades quimiotaxonómicas justificó la asignación de “*C. cellulans*” al nuevo género *Cellulosimicrobium*, siendo la especie tipo *Cellulosimicrobium cellulans* (“*Oerskovia xanthineolytica*”).⁷⁸⁴ En 2002, se aisló una segunda especie de *Cellulosimicrobium* (*C. variabile*) en el intestino posterior de la termita.⁵⁰ Los taxonomistas tampoco están de acuerdo sobre el estado de *Oerskovia turbata* como especie de *Cellulomonas*. Algunos estudios recientes que utilizaron secuenciación de DNA 16S y análisis de la estructura de la pared celular también sugieren que es posible que no sea válida la transferencia de *O. turbata* al género *Cellulomonas*.⁸³⁹

Los miembros del enmendado género *Oerskovia* demuestran hifas vegetativas ramificadas que penetran en el agar y se fragmentan en elementos bacilares móviles.⁸³⁹ En los frotis, los microorganismos aparecen como bacilos corineformes. Los microorganismos pueden ser móviles o no. Son catalasa positivos y oxidasa positivos y facultativos en relación con el oxígeno, aunque algunas cepas pueden ser estrictamente aerobias. Los principales ácidos grasos, la composición de quinonas isoprenoides y otras características del género se muestran en el cuadro 14-7. Además de la cepa tipo, *O. turbata*, se describieron o otras tres especies. *O. enterophila* se aísla en insectos y antes era una especie de *Promicromonospora*, mientras que *O. jenkinsii* y *O. paurometabola* se aíslan en el suelo.⁸³⁹ En el cuadro 14-17 se muestran las características bioquímicas que son útiles para la identificación de especies de *Cellulomonas*, *C. hominis*, *C. (O.) turbata* y *C. cellulans*.

Cellulosimicrobium cellulans produce colonias lisas y brillantes que tienen un fuerte pigmento amarillo (véase lámina en color 14-7C). Las afinidades por los actinomicetos del microorganismo se manifiestan por la producción de un “micelio” sustrato que se fragmenta en bacilos irregulares, curvos y con forma de palos dispuestos en formas de V y “letras chinas”. Después del agotamiento de los hidratos de carbono fermentables de los medios de caldo, estos microorganismos con forma de bacilos son transformados incluso en bacilos más cortos o formas de cocos. Son bioquímicamente activos y están incluidos en las bases de datos tanto del sistema API Coryne como del IDS Rapid CB plus para la identificación de bacterias corineformes. Los biocódigos comunes API Coryne para *C. cellulans* son 3552727, 7552727, 3572727 o 7572727 (véase lámina en color 14-7D). Tanto *O. turbata* como *Cellulosimicrobium cellulans* hidrolizan caseína, pero sólo las últimas especies hidrolizan xantina. Además, *Cellulosimicrobium cellulans* crece a 42 °C, mientras que *O. turbata* no lo hace.

Cellulosimicrobium cellulans y *O. turbata* son causas raras de infecciones oportunistas en huéspedes inmunodeprimidos. *O. turbata* ha sido aislado como causa de bacteriemia relacio-

Cuadro 14-17 Características bioquímicas para la identificación de especies de *Cellulomonas*, *Cellulomonas hominis*, *Cellulomonas turbata*, *Cellulosimicrobium cellulans* y *Dermabacter hominis*

CARACTERÍSTICA	ESPECIES DE <i>CELLULOMONAS</i>	<i>C. HOMINIS</i>	<i>C. (O.) TURBATA</i>	<i>CELLULOSIMICROBIUM CELLULANS</i>	<i>DERMABACTER HOMINIS</i>
Catalasa	+	+	+	+	+
Hemólisis, SBA	—	—	—	—	—
Motilidad	V+	+	+	+	—
Reducción de NO ₃	+	+	+	+	—
Pirazinamidasa	ND	ND	—	ND	—
Fosfatasa alcalina	V	—	ND	ND	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+
Ureasa	—	—	—	—	—
DNasa	V	+	+	+	+
Hidrólisis de:					
Gelatina	+	+	+	+ ^d	V+
Almidón	ND	ND	ND	+	+
Caseína	ND	ND	+	+	ND
Xantina	ND	ND	—	+	ND
Tirosina	ND	ND	—	—	ND
Ácido producido en condiciones fermentativas a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Manitol	V	—	—	—	—
Xilosa	+	+	+	+	V
Lactosa	ND	+	ND	+	+
Arabinosa	ND	+	ND	ND	ND
LAP	+	+	ND	ND	+
PYR	ND	ND	—	ND	+
α-GAL	ND	ND	ND	ND	V+
β-GAL	ND	ND	+	ND	+
α-GLU	+	+	+	ND	+
β-GLU	ND	ND	+	ND	+
β-GUR	ND	—	—	ND	—
NAGA	ND	ND	+	ND	+

+, reacción positiva; —, reacción negativa; +^d, reacción positiva débil o retardada; V, reacción variable; V+, variable, mayoría de cepas positivas; V-, variable, mayoría de cepas negativas; ND, datos no disponibles; Cat, catalasa; Fac, facultativo; Ana, anaerobio; Cat, catalasa; Hemol SBA, hemólisis en agar sangre de carnero; Reducción de NO₃, reducción de nitrato a nítrito; LAP, leucina arilamidasa; PYR, pirrolidónil arilamidasa; α-GAL, α-galactosidasa; β-GAL, β-galactosidasa; α-GLU, α-glucosidasa; β-GLU, β-glucosidasa; β-GUR, β-glucuronidasa; NAGA, N-acetil-β-D-glucosaminidasa.

nada con catéteres Broviac en un varón de 3 años y como causa de endocarditis en un hombre de 68 años cuya válvula aórtica había sido reemplazada por un homoinjerto de válvula cardíaca debido a insuficiencia aórtica grave relacionada con espondilitis anquilosante.^{531,715} En 1996, se comunicó a este microorganismo como causa de bacteriemia (junto con *Comomonas acidovorans*) en un paciente con SIDA.⁵¹² *C. cellulans* ha sido informado como causa rara de queratitis, endoftalmitis, neumonía, infección relacionada con válvula protésica, bacteriemia relacionada con catéter, meningitis asociada con derivación ventriculoperitoneal y peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria crónica.^{99,395,440,474,557,596,631,736,791} También se ha documentado bacteriemia por *C. cellulans* en receptores de trasplantes de médula ósea, en pacientes con SIDA y en enfermos con hepatopatía subyacente.^{240,570} Se los aisló como contaminantes en soluciones de nutrición parenteral total; esto fue descubierto sólo después de que se desarrollaran signos y síntomas de bacteriemia en un paciente inmediatamente luego de la infusión parenteral, con aislamiento de los microorganismos en hemocultivos, en el catéter venoso central del paciente y en el suplemento nutricional propiamente dicho.³⁷⁷

O. turbata y *C. cellulans* varían en su sensibilidad a los antibióticos. Aunque se ha comunicado que muchas cepas son sensibles a penicilina, ampicilina, cefalotina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y vancomicina, también se han informado cepas resistentes a estos agentes.^{377,440,596,736,894} Se ha comunicado resistencia de alto nivel a la vancomicina y la teicoplanina en una cepa clínica de *O. turbata*.⁶⁹³ Se demostró que esta resistencia a los glucopéptidos se debía a la estructura de peptidoglucanos modificada de la pared celular relacionada con la presencia de secuencias genéticas *vanA* similares a las halladas en cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.

Especies de *Dermabacter*

En 1988, Jones y Collins describieron cuatro cepas de bacterias corineformes que fueron aisladas exclusivamente en la piel humana.⁴⁶¹ Las paredes celulares de estas cepas contenían meso-DAP, alanina y ácido glutámico, pero carecían de ácidos micólicos.¹²³ Estas bacterias también contenían predominantemente ácidos grasos celulares de carbonos ramificados, una característica hallada sólo en especies de *Brevibacterium* y el microorganismo ambiental *Brachybacterium faecium*.¹²³ Los microorganismos eran fermentadores (no oxidativos como las especies de *Brevibacterium* y de *Brachybacterium*) y producían ácido a partir de varios hidratos de carbono. Se propuso para estas cepas el nombre *Dermabacter hominis*. El examen ulterior de cepas de los grupos 3 y 5 de los CDC aisladas en distintas muestras clínicas humanas por Gruner y cols., Bernard y cols. y Funke y cols. estableció que estos dos grupos de los CDC eran idénticos a la cepa tipo de *Dermabacter hominis* descrita por Jones y Collins.^{76,312,373,461} *D. hominis* ha sido aislado en distintas muestras clínicas, que incluyen sangre, tejido pulmonar, abscesos, LCR, líquido peritoneal, conjuntivas, osteomielitis calcánea e injertos vasculares infectados.^{350,903} En 1998, Bavbek y cols. describieron un caso de absceso cerebral por *D. hominis* en el receptor de un trasplante renal que se presentó como una base encefálica con refuerzo por contraste.⁶⁵ *D. hominis* también fue causa de peritonitis en un paciente en diálisis peritoneal ambulatoria continua.⁷⁰¹

Las cepas de *D. hominis* son corineformes catalasa positivas, no hemolíticas e inmóviles. En frotis teñidos con Gram, los

microorganismos aparecen cocobacilares o cocoides. En general, las colonias son blancas, convexas y tienen una consistencia cremosa o ligeramente pegajosa. Después de 24 horas de incubación, las colonias miden alrededor de 1.5 mm de diámetro. No reducen nitrato ni producen pirazinamidas, pero hidrolizan esculina y fosfatasa alcalina, pirrolidoniil arilamidasa, leucina aminopeptidasa y DNasa. También producen tanto lisina como ornitina descarboxilasa. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa; las ex cepas del grupo 3 *D. hominis* de los CDC también fermentan xilosa, mientras que las ex cepas del grupo 5 de los CDC no lo hacen. Este microorganismo está incluido en la base de datos API Coryne.⁷⁶ En el cuadro 14-17 se detallan otras características fenotípicas.

Especies de *Exiguobacterium*

Las especies de *Exiguobacterium* son bacterias corineformes irregulares y cortas que demuestran un ciclo bacilo-coco pronunciado en su crecimiento. Característicamente producen colonias amarillas o anaranjado pálidas en medios de agar y tienen un metabolismo facultativo o fermentador. Los ácidos micólicos están ausentes y L-lisina es el diaminoácido peptidoglucano. Son catalasa positivas, móviles y se asemejan a las especies de *Microbacterium* y *Oerskovia*, aunque difieren en los ácidos grasos de su pared celular. *E. acetylum*, una ex especie de *Brevibacterium*, ha sido aislado en heridas y líquido cefalorraquídeo. Produce colonias amarillo claras, amarillo intensas o anaranjadas en SBA. Este microorganismo catalasa positivo es rápidamente fermentador y produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y manitol, pero no de xilosa. Hidroliza la esculina, pero no produce ureasa. Algunas cepas reducen nitrato a nitrito. (Véase cuadro 14-18).

Especies de *Leifsonia*

Durante una investigación taxonómica de microbios aislados en nudos de raíces vegetales inducidos por un nematodo de vida libre, Evtushenko y cols. reconocieron un grupo de bacterias corineformes que eran fenotípicamente similares al corineforme móvil denominado históricamente "*C. aquaticum*".²⁵¹ Si bien durante mucho tiempo ha sido considerada una especie de *Corynebacterium*, ciertas propiedades (p. ej., movilidad y metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono) sirven para excluirlas de ese género. Las cepas antes denominadas "*C. aquaticum*" también contenían ácido DL-2,4-diaminobutírico en la pared celular, al igual que las aisladas en los nudos de raíces. Este diaminoácido inusual se encuentra en la pared celular de las especies de *Clavibacter*. Un mejor análisis de las cepas aisladas en los nudos de raíces, las cepas de referencia de "*C. aquaticum*" y las cepas de las especies existentes de *Clavibacter* estableció que estos microorganismos estaban relacionados desde el punto de vista taxonómico y filogenético. Se creó el género *Leifsonia* para incluir a la especie de *Clavibacter* descrita, la cepa de los nudos vegetales y "*C. aquaticum*". Por lo tanto, el género *Leifsonia* está formado por *L. xyli* subespecie *xyli* y *L. xyli* subespecie *cynodontis* (antes especies de *Clavibacter*), *L. poae* (la cepa de *Poa annua* inducida por el nematodo *Subanguina radicola* aislado en los nudos de raíces) y *L. aquatica* ("*C. aquaticum*").⁸⁵⁵

L. aquatica es una causa rara de infecciones en los seres humanos, entre ellas bacteriemia, endocarditis, infección de dispositivos de accesos, meningitis, peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria crónica, infecciones de heridas e infecciones de las vías urinarias.^{68,133,275,479,507,517,614,880} Las

Cuadro 14-18 Características bioquímicas para la identificación de *Exiguobacterium acetylicum*, *Leifsonia aquatica* y especies de *Microbacterium*

CARACTERÍSTICA	<i>EXIGUOBACTERIUM ACETYLICUM</i>	<i>LEIFSONIA AQUATICA</i>	ESPECIES DE <i>MICROBACTERIUM</i>	<i>MICROBACTERIUM ARBORESCENS</i>	<i>MICROBACTERIUM IMPERIALE</i>	<i>MICROBACTERIUM PARAOXYDANS</i>
Pigmentación	Amarilla, anaranjada pálida	Amarilla, lisa	Blanco amarillenta, amarilla	Anaranjada, amarilla oscura	Anaranjada, amarilla oscura	Amarilla brillante, pegajosa, lisa
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Hemólisis, SBA	—	—	—	—	—	—
Reducción de NO ₃	V	V	V	—	—	—
Pirazinamidasa	ND	+	V+	ND	ND	ND
Fosfatasa alcalina	ND	V	ND	ND	ND	ND
Hidrólisis de esculina	+	V	V	+	+	+
Ureasa	—	—	V	—	—	—
Motilidad	+	+	V+	+	+	+
DNasa	+	—	ND	ND	ND	+
Hidrólisis de:						
Gelatina	+	—	+	ND	ND	+
Caseína	+	—	V	ND	ND	+
Xantina	ND	—	ND	ND	ND	ND
Tirosina	ND	—	ND	ND	ND	—
Almidón	+	+	ND	ND	ND	ND
Ferm/Oxid	Ferm	Oxid	Oxid	Ferm	Ferm	Oxid
Ácido producido a partir de:						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	V	+	+	+	+
Sacarosa	+	V	V	+	+	+
Manitol	+	+	V+	+	+	+
Xilosa	—	ND	V	+	+	ND
Lactosa	—	+	V	ND	ND	ND
Arabinosa	—	+	—	+	+	ND
Rafinosa	—	ND	—	—	+	ND
LAP	ND	ND	ND	ND	ND	+
PYR	ND	V—	ND	ND	ND	ND
β-GAL	ND	ND	V+	+	+	V
α-GLU	ND	+	V+	ND	ND	+
β-GLU	ND	ND	V	+	+	—
β-GUR	ND	—	ND	ND	ND	—
NAGA	ND	V+	V	+	+	V
Números de biocódigos API frecuentes	ND	Utilización de los hidratos de carbono habitualmente negativa debido al metabolismo oxi- dativo	Las cepas que no fermentan hidratos de carbono pueden representar ex especies de <i>Aureobacterium</i> , que tienen metabolismo oxidativo de hidratos de carbono	ND	ND	ND

+, reacción positiva; —, reacción negativa; V, reacción variable; V+, reacción variable, mayoría de cepas positivas; V—, reacción variable, mayoría de cepas negativas; +', reacción positiva tardía o débil; ND, datos no disponibles; Oxid, utilización oxidativa de los hidratos de carbono; Ferm, utilización fermentativa de los hidratos de carbono.

colonias de *L. aquatica* son opacas, untuosas y de pigmentación amarilla. Esta pigmentación aumenta con la antigüedad del cultivo. Las células son móviles a 35-37 °C y a temperatura ambiente por medio de flagelos peritricos largos. El microorganismo demuestra un ciclo bacilo-coco, de modo que en los cultivos más viejos predominan las células cocoides. Es aerobio y catalasa y oxidasa positivo (véase cuadro 14-18). Se produce ácido en forma oxidativa a partir de glucosa, sacarosa, fructosa, arabinosa, galactosa y manosa. El microorganismo es ureasa negativo y no hidroliza la esculina, pero se produce H₂S. En el pasado, se han identificado erróneamente como "*C. aquaticum*" algunas especies de *Microbacterium* aisladas en muestras clínicas humanas.^{316,369} La hidrólisis de caseína y gelatina es útil para separar las posibles especies de *Microbacterium* (hidrólisis de gelatina e hidrólisis de caseína negativas). *L. aquaticum* también produce fuerte actividad de DNasa. Otras especies de *Leifsonia* (*L. cynodontis*, *L. rubra*, *L. aurea*, *L. shinshuensis*, *C. naganoensis*) son cepas ambientales y no han sido aisladas en muestras clínicas humanas.^{711,855}

Especies de *Microbacterium* (*Aureobacterium*)

Las especies de *Microbacterium* son bacilos pequeños, de forma irregular, grampositivos y catalasa positivos que crecen con una morfología "difteroides" típica. Pueden ser inmóviles o móviles, con uno a tres flagelos y son oxidativos y aerobios en su metabolismo, aunque algunas especies pueden ser fermentadoras. En lugar de *meso*-DAP, estos microorganismos contienen lisina como diaminoácido en sus paredes celulares y tienen "glicina-glicina-lisina" o "glicina-lisina" como puentes transversales interpeptídicos del peptidoglucano de la pared celular.^{292,866,979} A diferencia de las especies de *Corynebacterium*, arabinosa, galactosa y ácidos micólicos no son componentes de la pared celular. Antes de 1998, el género *Microbacterium* contenía seis especies válidas aisladas en suelo, aguas cloacales y productos lácteos.⁸⁶⁸ En 1998, Takeuchi e Hitano analizaron las especies de *Microbacterium* y *Aureobacterium* utilizando secuenciación de rRNA 16S y observaron que la especie en estos dos géneros formaba una asociación intermezclada monofilética. Esta y otras características fisiológicas y quimiotaxonómicas condujeron a la unificación de estos géneros en un género redefinido de *Microbacterium* que contenía 13 ex especies de *Aureobacterium*.^{173,979,980}

Los miembros del género *Microbacterium* están compuestos por bacilos grampositivos irregulares, cortos, catalasa positivos y aerobios estrictos. La producción de ácido a partir de hidratos de carbono es el resultado de procesos de oxidación y no de fermentación. Al contrario de las especies de *Cellulomonas*, las especies de *Microbacterium* no hidrolizan celulosa. Los miembros de este género contienen ornitina en el peptidoglucano de la pared celular junto con residuos de glicina dentro de los puentes interpeptídicos.¹⁷³ También contienen altas concentraciones de glucolato en el peptidoglucano, lo que sugiere que el ácido murámico en la pared celular aparece en la forma *N*-glucolilo en lugar de la forma *N*-acetilo habitual. Además de D-ornitina y glicina, la pared celular contiene alanina, ácido glutámico y homoserina. Desde 1998, se han aislado más de 15 otras especies de *Microbacterium* en alimentos, plantas, suelo, aguas cloacales e insectos.

Se han aislado especies de *Microbacterium* en muestras clínicas humanas y algunas ex cepas de los grupos corineformes A-4 y A-5 de los CDC han sido asignadas al género *Microbacterium* sobre la base de los análisis fenotípicos, quimiotaxonómicos y genotípicos. Funke y cols. examinaron 22 cepas

de bacilos grampositivos con pigmento amarillo y anaranjado mediante distintas técnicas quimiotaxonómicas y fenotípicas.²⁹² Éstas incluyeron cepas de tipo *Microbacterium*, cepas ambientales y 13 cepas clínicas, 10 de las cuales fueron aisladas en hemocultivos. Todas eran especies de *Microbacterium* por el análisis de la pared celular; tres de las muestras clínicas eran fenotípicamente idénticas a *M. imperiale* y otras dos eran idénticas a la cepa tipo de *M. arborescens*. Las cepas clínicas restantes no se asemejaban a ninguna otra especie de *Microbacterium* reconocida desde el punto de vista fenotípico, aunque eran especies de *Microbacterium* de acuerdo con el análisis quimiotaxonómico.

Las especies de *Microbacterium* se han asociado con infecciones humanas graves, que incluyen una infección diseminada mortal en un hombre de 75 años y bacteriemia persistente por celulitis en un hombre de 39 años con leucemia mieloide aguda y porfiria cutánea tardía.^{641,769} En el último caso, la cepa era resistente a la vancomicina. Estos microorganismos también han sido asociados con bacteriemias hospitalarias y relacionadas con catéteres en pacientes con leucemia, y con la contaminación de productos de células madre en sangre periférica infundidos en receptores de trasplantes de células madre.^{20,127,418,520} En una comunicación de un caso reciente, se aisló una cepa corineforme con pigmento amarillo en los hemocultivos de un niño con leucemia. Las comparaciones genéticas y quimiotaxonómicas con las especies de *Microbacterium* existentes condujeron a la caracterización de *M. paraoxydans*, otra especie de *Microbacterium* nueva.⁵⁰⁹ Funke y cols. en Suiza y Alemania comunicaron un caso de endoftalmitis debido a una especie de *Microbacterium* luego de una lesión ocular penetrante.²⁹³ Desde el punto de vista filogenético, el microorganismo se agrupaba con especies de *Microbacterium* reconocidas, lo que sugiere que la cepa puede representar en realidad otra especie nueva de *Microbacterium*.²⁹³ La cepa era sensible a cefazolina, cefotetán, ciprofloxacina, clindamicina, imipenem, piperacilina, teicoplanina y vancomicina y era resistente a gentamicina y tobramicina.

Las especies de *Microbacterium* forman colonias de pigmentación amarilla blanquecina, amarilla o anaranjada en SBA (véase lámina en color 14-6E). Todas las especies son catalasa positivas y algunas especies (*M. arborescens*, *M. imperiale*, *M. paraoxydans*) son móviles. La mayoría hidrolizan la esculina y no la urea. Se produce ácido de forma oxidativa a partir de distintos hidratos de carbono. Los miembros originales del género *Microbacterium* tienden a ser fermentadores, mientras que las primeras especies de *Aureobacterium* que fueron transferidas al género *Microbacterium* son oxidativas en su utilización de hidratos de carbono. Las especies de *Microbacterium* están incluidas en la base de datos API Coryne, pero se necesitan otras pruebas para separarlas de las especies de *Cellulomonas* y "*C. aquaticum*" (véase lámina en color 14-6F). Como algunas microbacterias producen ácido a partir de los hidratos de carbono en forma oxidativa y no fermentativa, es posible que la acidificación de los hidratos de carbono no sea evidente después de 24 horas de incubación. Los biocódigos API Coryne (0470004, 0452004, 0472004, 0570004, 0572004) incluidos en la base de datos suelen dar resultados cruzados con "*C. aquaticum*" y la incubación de las galerías de API Coryne más allá de las 24 horas puede ser necesaria para determinar la acidificación de los hidratos de carbono. Las especies fermentadoras pueden producir algunas reacciones de acidificación positivas en API Coryne, pero puede ser necesaria una incubación mayor de 24 horas. En el cuadro 14-18 se encuentran otros datos fenotípicos.

Especies de *Rothia* y "similares a *Rothia*" (grupo 4 de los CDC)

Las especies de *Rothia* son miembros del filo recién descrito Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomycetales. En la próxima edición del *Manual Bacteriológico Sistemático de Bergey*, el género *Rothia* está incluido en la familia *Micrococcaceae*, que también incluye los géneros *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia* y *Stomatococcus*.³²⁹ Desde el punto de vista histórico, el género *Rothia* incluía una especie única, *Rothia dentocariosa*. Sobre la base de datos de secuenciación de rDNA 16S y quimiotaxonómicos, se ha ampliado *Stomatococcus mucilaginosus*, el coco grampositivo catalasa variable hallado en la orofaringe humana, está estrechamente relacionado con los microorganismos en el género *Rothia* y ha sido transferido como *Rothia mucilaginosus*.¹⁷² Se describió una tercera especie en el género, *Rothia nasimurium*; esta especie se encuentra en la parte posterior de las fosas nasales de los ratones. Mientras que *R. mucilaginosus* y *R. nasimurium* son cocos grampositivos, *R. dentocariosa* es un bacilo corineforme grampositivo que muestra ramificación rudimentaria, aunque en los cultivos de caldo más viejos pueden predominar las células cocoides. *R. dentocariosa* no produce cantidades importantes de ácido succínico a partir de glucosa, característica que distingue este microorganismo de especies facultativas de *Actinomyces*. Al igual que las corinebacterias y los actinomicetos aerobios, estos microorganismos son catalasa positivos y tienden a crecer mejor en condiciones aerobias. Sin embargo, a diferencia de las especies de *Nocardia*, estos microorganismos son fermentadores y se prestan a la identificación por las pruebas fenotípicas utilizadas de rutina para las especies de *Corynebacterium* y los grupos corineformes descritos antes.

Rothia dentocariosa es parte de la flora orofaríngea y gingival humana normal y puede ser aislado en la saliva y la placa supragingival. Durante las décadas de 1950 y 1960, la Rama de Bacteriología Especial en los CDC recogieron varias cepas, la mayoría de las cuales provenían de abscesos, muestras del aparato respiratorio, quistes pilonidiales, líquido cefalorraquídeo, orina y sangre.^{562,610,773,933} Desde 1972, han aparecido varias comunicaciones de endocarditis por *R. dentocariosa* que afectaba tanto válvulas nativas como válvulas protésicas.^{26,87,101,105,499,944} En varios casos, la infección se asoció con complicaciones graves y potencialmente mortales, entre ellas la afectación de múltiples válvulas cardíacas y abscesos paravalvulares de la raíz aórtica.^{270,852} Las infecciones valvulares a menudo conducen a la formación de grandes vegetaciones, que pueden causar infartos pulmonares, hemorragias intracraneales y abscesos encefálicos.^{444,722} También se ha informado bacteriemia sin endocarditis.⁷⁵⁸ *R. dentocariosa* ha sido aislado en la secreción de una fístula arteriovenosa en un hombre diabético de 46 años con insuficiencia renal.⁶³⁹ Las comunicaciones recientes de casos han documentado a *R. dentocariosa* como causa de endoftalmitis, osteomielitis vertebral con absceso paraespinal y peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria crónica.^{83,547,568} Aunque raro, también se lo ha reconocido como causa de neumonía en pacientes con enfermedades subyacentes graves, como leucemia mielocítica aguda y adenocarcinoma del pulmón.

Las afinidades de *R. dentocariosa* con otros actinomicetos aerobios son evidentes en el examen de la morfología de las colonias. Después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂, las colonias suelen ser secas, rugosas y de color blanco hueso. A menudo aparecen apiladas y cerebriiformes, sobre todo en las áreas de crecimiento confluyente (véase lámina en

color 14-7A). La inspección de los bordes de las colonias pone en evidencia que tienden a "hundirse" en la superficie del agar como las de las especies de *Nocardia*. Las cepas de *R. dentocariosa* también tienen características fenotípicas relativamente uniformes y son muy activas desde el punto de vista bioquímico. *R. dentocariosa* es catalasa positivo, reduce nitrato a nitrito y produce pirazinamidasas y pirrolidonil arilamidasa (véase cuadro 14-19). El microorganismo hidroliza esculina pero no urea ni gelatina, y se produce ácido de forma fermentativa a partir de glucosa, maltosa y sacarosa. Los ácidos acético y láctico con cantidades pequeñas de ácido pirúvico y *R. dentocariosa* están incluidos en la base de datos tanto de API Coryne como de RapID CB-Plus. En API Coryne, la mayoría de las cepas producen los biocódigos 7050125, 7052125, 7050165 o 7052165 (véase lámina en color 14-7B). Aunque estos microorganismos suelen ser uniformemente sensibles a todas las clases de antibióticos, se han aislado cepas resistentes a los β -lactámicos a causa de la producción de β -lactamasas.⁶¹⁰ Las últimas cepas contienen plásmidos que sostienen los genes estructurales de las β -lactamasas.

Los microorganismos pertenecientes al grupo 4 de corineformes fermentadores de los CDC están estrechamente relacionados con *R. dentocariosa*. Estos microorganismos han sido aislados principalmente en muestras del aparato genital femenino, aunque no se han comunicado infecciones humanas específicas por cepas del grupo 4 de los CDC. Desde el punto de vista morfológico, algunas forman colonias de color negro carbón en medios de agar, semejantes a las de *C. nigricans* (véase recuadro 14-2). Recientemente, Daaneshvar y cols. en los CDC investigaron varias cepas formadoras de colonias negras categorizadas transitoriamente como bacterias del grupo 4.²⁰² Estos microorganismos fueron separados en dos grupos por análisis genético molecular. Un grupo (que sólo incluía una muestra del aparato genital) estaba más estrechamente relacionado con *R. dentocariosa*, mientras que el otro grupo, que incluía cepas aisladas principalmente en muestras del aparato genital femenino, estaban más estrechamente relacionados con *C. aurimucosum*, una especie de *Corynebacterium* recién descrita aislada predominantemente en el aparato genital femenino (véase recuadro 14-2). Esta investigación condujo a enmiendas de las descripciones de las especies tanto de *R. dentocariosa* como de *C. aurimucosum* para incluir variantes que formaban colonias de color negro carbón en medios de agar. En el cuadro 14-19 se presentan las características fenotípicas de *R. dentocariosa* y el grupo 4 de corineformes fermentadores de los CDC. Las características fenotípicas de *C. aurimucosum* y *C. nigricans* también están incluidas en el cuadro 14-19 como comparación para ayudar en la identificación de los corineformes que producen colonias de pigmentación negro carbón.

Especies de *Turicella*

En 1993, Simonet y cols., en Francia, comunicaron el aislamiento de una cepa corineforme en cultivo puro de los líquidos del oído medio recogidos mediante timpanocentesis de niños con otitis media aguda.⁸⁰⁹ Estas cepas contenían meso-DAP, arabinosa y galactosa en sus paredes celulares, pero estaban ausentes los ácidos corinemicólicos. La cepa creció como colonias convexas, blancuzcas, cremosas y no hemolíticas en agar sangre que se volvían amarillentas con el tiempo. Esta morfología de las colonias era definidamente diferente de las colonias planas, blanco grisáceas y no hemolíticas producidas por subespecies de *C. afermentans* o de las colonias secas convexas, adherentes y ligeramente amarillentas de *C. auris*, corine-

Cuadro 14-19 Características bioquímicas para la identificación de *Rothia dentocariosa*, bacterias corineformes fermentadoras del grupo 4 de los CDC "similares a *Rothia*", *Corynebacterium aurimucosum* y *Corynebacterium nigricans*

CARACTERÍSTICA	BACTERIAS CORINEFORMES FERMENTADORAS DEL GRUPO 4 DE LOS CDC "SIMILARES A ROTHIA"			
	<i>ROTHIA DENTOCARIOSA</i>	<i>C. AURIMUCOSUM</i>	<i>C. NIGRICANS</i>	
Lipofílico	—	—	—	—
Morfología de las colonias	Blanco hueso, color hueso, secas, rugosas, adherentes o convexas, lisas o negro carbón, enteras y de consistencia blanda	Color negro carbón, circulares, convexas, lisas o rugosas y adherentes, de bordes continuos (lisos)	Pegajosas, amarillentas a blancas o color negro carbón	Negro carbón, adherentes
Hemólisis, SBA	—	—	—	—
Catalasa	V	V	+	+
Pirazinamidasa	+	ND	+	+
Fosfatasa alcalina	V	ND	+	+
Motilidad	—	—	—	—
Reducción de NO ₃	+	+	—	—
Hidrólisis de esculina	+	+	V	—
Ureasa	—	—	V—	—
Hidrólisis de hipurato	ND	ND	+	ND
Acetoína	+	ND	+	ND
H ₂ S (papel de acetato de plomo)	+	+	ND	ND
Hidrólisis de:				
Gelatina	V	+	V—	—
Almidón	—	ND	—	—
Caseína	—	ND	ND	—
Ácido producido a partir de:				
Glucosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
Manitol	—	—	V	—
Lactosa	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—
LAP	ND	ND	+	ND
PYR	+	ND	—	—
α-GAL	—	ND	—	ND
β-GAL	—	ND	—	—
α-GLU	+	ND	—	—
β-GLU	+	ND	—	—
α-GUR	—	ND	—	—
NAGA	—	ND	—	ND

+, reacción positiva; —, reacción negativa; V, reacción variable; V—, reacción variable, mayoría de cepas negativas; ND, datos no disponibles.

formes asociadas con otitis media aguda y crónica.^{298,726} En el análisis quimiotaxonómico, los patrones de menaquinona celulares de esta cepa del oído medio también eran diferentes de las dos especies de *Corynebacterium*. Aun cuando estos microorganismos mostraban morfologías de colonias muy diferentes, las dos especies de *Corynebacterium* y la tercera cepa tenían características fenotípicas idénticas. Estas cepas han sido asignadas al género nuevo *Turicella* (que hace referencia a

Turicum, el nombre latino para Zurich, Suiza, donde se aislaron las primeras cepas) como *Turicella otitidis*.³¹¹ Desde su descripción, *T. otitidis* ha sido aislado en otras infecciones de cabeza y cuello (p. ej., absceso auricular posterior) y en hemocultivos.^{200,550,721}

En las tinciones de Gram, *T. otitidis* aparece como bacilos largos y, en cultivo, las colonias del microorganismo son gris blancuzcas, convexas y tienen bordes enteros. En SBA miden

1,5 a 2 mm de diámetro después de 48 horas de incubación. Todas las cepas de *T. otitidis* producen el número de biocódigo 2100004 en el sistema API Coryne, lo que indica resultados positivos de las pruebas para pirazinamidas, fosfatasa alcalina y catalasa, y pruebas negativas para glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y fermentación de glucógeno, nitrato reductasa, ureasa, hidrólisis de esculina, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, hidrólisis de esculina, ureasa e hidrólisis de gelatina. Estas características fenotípicas son similares tanto a *C. afermentans* subespecie *afermentans* como a *C. auris*. *T. otitidis*, las subespecies de *C. afermentans* y *C. auris* pueden ser diferenciadas más eficientemente mediante análisis genéticos y quimiotaxonómicos. Sin embargo, Renaud y cols. han mostrado que la morfología de las colonias, la prueba de CAMP, ciertas actividades enzimáticas (p. ej., LAP, DNasa) y las asimilaciones de sustratos de carbono son útiles para separar estas especies, como se muestra en el cuadro 14-20.⁷¹⁸ Las cepas de *T. otitidis* son sensibles a ampicilina, cefalosporinas, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, tetraciclinas y cloranfenicol; algunas son resistentes a clindamicina y eritromicina.^{306,729}

Gardnerella vaginalis

Taxonomía y morfología celular

Gardnerella vaginalis fue descrito por primera vez en 1953 por Leopold y luego denominado *Haemophilus vaginalis* por Gardner y Dukes en 1955.^{326,362} En 1963, Zinnemann y Turner propusieron el nombre *Corynebacterium vaginale* para este microorganismo debido a su tendencia a ser grampositivo y la falta de requerimientos de factor X o factor V.⁹⁸⁹ En 1980, fue colocado formalmente en el nuevo género, *Gardnerella*, por Greenwold, Pickett y otros sobre la base de los datos de microscopia electrónica, bioquímicos y quimiotaxonómicos, y los estudios de hibridación de DNA-DNA.^{361,362} Los estudios ultraestructurales de *G. vaginalis* indican que este microorganismo tiene un tipo grampositivo de pared celular, pero la capa de peptidoglucano es mucho más delgada que la hallada en las paredes celulares de las especies de *Corynebacterium*, *Lactobacillus* o *Staphylococcus*. El contenido de peptidoglucano de la pared celular de *G. vaginalis* constituye aproximadamente el 20% del peso de la pared celular total, que es similar al hallado en los entéricos gramnegativos, como *Escherichia coli*, en el cual el peptidoglucano constituye cerca del 23% del

peso de la pared celular.¹⁹² En consecuencia, diferentes cepas de *G. vaginalis* pueden parecer predominantemente grampositivas, gramnegativas o gramvariables.⁷⁵⁵ Los extractos de la pared celular de *G. vaginalis* no contienen compuestos normalmente presentes en los lipopolisacáridos de la pared celular de los gramnegativos (p. ej., meso-DAP, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-2-octonoico, ácidos grasos hidroxil). La ausencia de meso-DAP, arabinogalactanos y ácidos micólicos confirma que la pared celular de *G. vaginalis* también es distinto del tipo de pared celular de los grampositivos hallados en las especies de *Corynebacterium*. Los componentes obtenidos por digestión de la pared celular de *G. vaginalis* incluyen los aminoácidos alanina, ácido glutámico, glicina y lisina, y los hidratos de carbono glucosa, galactosa y 6-desoxitalosa.^{647,755}

Algunos estudios de hibridación de ácidos nucleicos han mostrado que *G. vaginalis* no está relacionado genéticamente con las especies de *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* o *Propionibacterium*. En un estudio reciente que utilizó el análisis de secuencias de genes rRNA 16S para examinar las cepas tipo de 21 especies de *Bifidobacterium*, Miyake y cols. observaron que *G. vaginalis* se agrupaban juntos con 19 de las 21 especies de *Bifidobacterium*.⁶¹¹ Otro estudio, de van Esbroeck y cols. en Bélgica, utilizó análisis fenotípico, quimiotaxonómico (p. ej., análisis de proteínas de células enteras y ácidos grasos) y de secuencia de rRNA 16S para caracterizar las cepas de *G. vaginalis* y "similares a *G. vaginalis*".⁹¹² Los métodos quimiotaxonómicos condujeron al reconocimiento de dos "grupos" mayores de los cuales se demostró mediante análisis de secuencia que representaban diferentes géneros. Por su parte, estos géneros, podrían ser distinguidos mediante métodos fenotípicos. En su estudio, las cepas del grupo I representaban *G. vaginalis*, y su pariente más cercano eran los miembros del género *Bifidobacterium*. Las cepas de *G. vaginalis* mostraron un nivel de similitud del 93,1% con *Bifidobacterium bifidum*.⁹¹² Sin embargo, estos investigadores creían que el contenido G + C de *G. vaginalis* y de las especies de *Bifidobacterium* eran lo suficientemente diferentes como para que *G. vaginalis* no pueda ser considerada miembro del género *Bifidobacterium*. El análisis de las secuencias de los genes de las proteínas del choque térmico también indicó una relación filogenética entre *G. vaginalis* y bifidobacterias, pero esta relación era más distante de lo sugerido por el análisis de rRNA 16S y confirmó el estado del género de *Gardnerella*.⁴⁵⁵ En la actualidad, este género contiene una única especie y no es asignada a ninguna familia bacteriana existente. Además de los biotipos, que son determinados mediante pruebas fenotípi-

Cuadro 14-20 Diferenciación de *Turicella otitidis*, *Corynebacterium afermentans* subespecie *afermentans* y *Corynebacterium auris*

CARACTERÍSTICA	<i>T. OTITIDIS</i>	<i>C. AFERMENTANS</i> SUBESPECIE <i>AFERMENTANS</i>	<i>C. AURIS</i>
Morfología de las colonias	Creosas, convexas, circulares	Planas, lisas	Circulares, convexas, secas, ligeramente adherentes
Pigmentación de las colonias	Amarillo pálido con la incubación prolongada	Blanco grisácea	Ligeramente amarillenta
Prueba de CAMP	+	V	+
DNasa	+	—	—
Leucina arilamidasa	+	—	+

+ , reacción positiva; — , reacción negativa; V, reacción variable.

cas, el análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado ha mostrado que las cepas de *G. vaginalis* son bastante heterogéneas y pueden ser divididas al menos en tres o cuatro genotipos según las enzimas de restricción utilizadas.⁴⁴³ En cultivo, puede ser difícil diferenciar algunas cepas de *G. vaginalis* de los microorganismos “de aspecto similar”, que se denominan bacterias “corineformes catalasa negativas no clasificadas”.

Factores de virulencia de *G. vaginalis*

Además de la estructura singular de la pared celular, *G. vaginalis* tiene otras propiedades que pueden contribuir a su capacidad para causar procesos infecciosos. Estos microorganismos tienen un exopolisacárido fibrilar que ha sido observado mediante microscopia electrónica y que funciona en la adherencia del microorganismo a las células epiteliales vaginales.^{755,786} También se han demostrado pili sobre la superficie de la célula de *G. vaginalis* y se cree que contribuyen a la adherencia mucosa.¹⁰³ En 1990, Rottini y cols. describieron una citolisina (hemolisina) extracelular producida por *G. vaginalis*.⁷⁴⁶ Esta citolisina es una proteína con un peso molecular de 59 a 63 kDa que tiene especificidad por los eritrocitos humanos; se necesitan concentraciones de esta citolisina 100 veces mayores para la lisis de otros eritrocitos animales. Esta citolisina también puede lisar otras células humanas, incluidas las células epiteliales y los leucocitos polimorfonucleares.⁷⁴⁶ La citolisina produce la formación de pequeños poros en la membrana del eritrocito; la formación de estos poros es inhibida competitivamente por el colesterol que forma complejos con los fosfolípidos con carga negativa.¹³⁷ Las pruebas de que esta citolisina puede desempeñar un papel en la patogenicidad del microorganismo son sostenidas por el hallazgo de IgA específica de citolisina en el líquido vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana, una infección en la cual *G. vaginalis* desempeña un papel importante pero hasta ahora indefinido.^{135,136,138} Algunas cepas de *G. vaginalis* también pueden producir fosfolipasa C, una enzima que hidroliza lecitina en fosforilcolina y 1,2-diglicérido.⁵⁹⁸ Se sabe que la fosfolipasa C daña los tejidos del aparato reproductor tanto por mecanismos directos como indirectos. Al parecer, las cepas de *G. vaginalis* no producen sialidasas (neuraminidasas), que son factores de virulencia reconocidos en otros microorganismos.¹¹⁴

Importancia clínica de *G. vaginalis*

G. vaginalis se asocia con el síndrome clínico denominado **vaginosis bacteriana**.⁸²¹ Este trastorno se denomina así porque no hay ningún microorganismo como el único responsable y no se observan células inflamatorias (observadas con las infecciones por *Candida* y *Trichomonas*) en los frotis teñidos con Gram de la secreción vaginal (véase lámina en color 14-8C). La vaginosis bacteriana se caracteriza clínicamente por secreción maloliente asociada con un aumento importante de la cantidad de *G. vaginalis* y distintos anaerobios estrictos (p. ej., que incluyen *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, especies de *Mycoplasma*, peptostreptococos y especies de *Mobiluncus*) con una disminución simultánea de la cantidad de lactobacilos vaginales normales.^{403,415,821} La vaginosis bacteriana es un factor de riesgo para las infecciones obstétricas, distintos tipos de resultados adversos del embarazo y enfermedad inflamatoria pelviana.^{248,415} Cuando este trastorno fue descrito originalmente por Gardner y Duker, se propuso que *G. vaginalis* era el agente etiológico.³²⁶ Algunos estudios ulteriores determinaron que también podían participar otros microorganismos y que,

aunque *G. vaginalis* siempre estaba presente en la vagina de las mujeres con vaginosis bacteriana, también lo estaba en más del 50% de las mujeres sanas.⁶⁰⁵ Utilizando medios semiselectivos, *G. vaginalis* puede hallarse en el 14-70% de las mujeres sin vaginosis bacteriana.^{191,891} Sin embargo, parece que la presencia de gran cantidad de estos microorganismos en la vagina es indicativa de la enfermedad. Utilizando una sonda de oligonucleótidos radiomarcada específica para rRNA 16S de *G. vaginalis*, Sienes y cols., en Seattle, mostraron que la presencia de estas bacterias en concentraciones $\geq 2 \times 10^7$ UFC/mL de líquido vaginal, junto con un pH vaginal superior a 4.5, tenía una sensibilidad y una especificidad del 95% y el 99%, respectivamente, para clasificar a las mujeres con vaginosis bacteriana y sin ella cuando se compararon con criterios diagnósticos estrictamente clínicos.⁷⁹² Las técnicas de inmunofluorescencia han demostrado que los microorganismos predominantes adherentes a las “células clave” clásicas sugestivas de vaginosis bacteriana son en realidad *G. vaginalis*.¹⁸³ Entre el 93% y el 100% de las mujeres infectadas tienen una colonización importante por *G. vaginalis* y la cantidad de UFC por mililitro de líquido vaginal es mucho mayor en las muestras provenientes de mujeres infectadas que en muestras similares de mujeres sanas.^{23,248,415,425,891}

El diagnóstico se logra mejor con criterios clínicos junto con una tinción de Gram de la secreción vaginal.^{415,644} No se recomienda el cultivo de rutina de las muestras vaginales para *G. vaginalis* para el diagnóstico dado que no proporciona pruebas decisivas de infección debido a la presencia de *G. vaginalis* como parte de la microflora vaginal residente. *G. vaginalis* ha sido aislado en muestras rectales del 56% de 148 mujeres con vaginosis bacteriana, el 12% de 69 mujeres sanas, el 9% de 83 compañeros sexuales masculinos de mujeres con vaginosis bacteriana y el 6% de 49 parejas sexuales masculinas de mujeres sanas.^{425,919} Estos últimos datos sugieren que *G. vaginalis* no se transmite sexualmente, sino que es probable que colonice la vagina por vía endógena desde el tubo digestivo.⁴²⁵ Por otra parte, Villegas y cols. realizaron hace poco un estudio ultraestructural de las secreciones vaginales de 10 mujeres con vaginosis bacteriana y muestras de semen de sus compañeros sexuales asintomáticos utilizando microscopia óptica y microscopia electrónica.⁹¹⁹ *G. vaginalis* fue aislado en muestras de semen del 50% de los hombres. Con el microscopio electrónico se observó que los microorganismos se adherían a las membranas celulares y penetraban en el citoplasma de las células epiteliales de la vagina y de la uretra masculina. Estos investigadores sugirieron que la colonización asintomática del aparato genital masculino inferior por *G. vaginalis* puede tener cierta relevancia en relación con el papel del compañero masculino en la “recolonización” (“reinfección”) de la vagina.

Además de su papel en la vaginosis bacteriana, *G. vaginalis* también ha sido aislado en infecciones del aparato genital femenino asociadas con complicaciones del embarazo y de lactantes hijos de madres con estas complicaciones, sobre todo durante el parto y después de él. Estas complicaciones incluyen infecciones intrauterinas, infecciones intraamnióticas, corioamnionitis, enfermedad inflamatoria pelviana posaborto y endometritis posparto después de cesárea.^{337,417,504,526,743} En estas infecciones, los tejidos obtenidos por procedimientos quirúrgicos pueden permitir el aislamiento de *G. vaginalis* en cultivos puros o mixtos con otros microorganismos anaerobios facultativos o estrictos. En estos contextos clínicos pueden producirse bacteriemias posparto o posaborto por *G. vaginalis* y otros microorganismos del aparato genital.^{96,277,712} La bacteriemia por microflora del aparato genital ocurre cuando estos

microorganismos ganan acceso a canales venosos del lecho placentario, que son interrumpidos antes de los partos por vía vaginal y cesárea y durante su transcurso. También se han comunicado infecciones sistémicas y localizadas con *G. vaginalis* en recién nacidos hijos de madres con estas complicaciones. Estas infecciones han incluido amnionitis, infección de herida de episiotomía, bacteriemias neonatales, meningitis, celulitis, conjuntivitis y osteomielitis por hematomas infectados causados por la aplicación de monitores sobre el cuero cabelludo fetal.^{22,72,153,154,528,635,850} Los cultivos orofaríngeos, de muestras de aspiración gástrica y traqueal de recién nacidos también han aislado *G. vaginalis*, adquirida tal vez durante el pasaje a través de un canal de parto muy colonizado.³¹⁷ Tanto en mujeres embarazadas como en no embarazadas, se ha aislado *G. vaginalis*, en cultivo puro o mixto, en abscesos de la glándula de Bartolino y en infecciones de heridas quirúrgicas luego de cesáreas, cirugías abdominales, histerectomías y episiotomías.^{153,503,850}

G. vaginalis también ha sido causa de infecciones en hombres. Se ha comunicado bacteriemia por *G. vaginalis* luego de una prostatectomía transuretral y corrección quirúrgica de estrecheces uretrales.^{63,953} También fue aislado en hemocultivos de un hombre de 65 años con retención urinaria debida a un adenoma de la próstata.²¹³ Las infecciones extragenitales inusuales por *G. vaginalis* han incluido un absceso hepático piógeno en una mujer de 23 años luego de una cesárea, bacteriemia con absceso pulmonar y empiema en un hombre alcohólico con neumonía aspirativa, infección de espacios intervertebrales en una mujer posmenopáusica de 50 años e infecciones de los espacios articulares.^{253,419,527}

G. vaginalis también puede desempeñar un papel en las infecciones urinarias tanto en hombres como en mujeres.⁶⁶ Dado su ecosistema como parte de la flora vaginal, no es sorprendente que haya sido aislado en muestras urinarias de mujeres más a menudo que de varones.^{466,513} *G. vaginalis* ha sido aislado tanto de las vías urinarias altas (uréteres, pelvis renal y cálices) como bajas (vejiga) de pacientes sintomáticas y asintomáticas.^{255,597} Las tasas de aislamiento de las muestras de orina son mayores en las mujeres embarazadas que en las no embarazadas y muchas de estas pacientes están asintomáticas.⁵⁹⁷ La piuria parece rara vez asociada con infecciones urinarias por *G. vaginalis* y puede estar ausente aun en presencia de una enfermedad grave de las vías urinarias altas.^{255,256,466} En un estudio del papel de *G. vaginalis* en las infecciones urinarias en hombres, dos tercios de 15 pacientes con cantidades importantes de *G. vaginalis* en la orina tenían signos y síntomas atribuibles al aparato urinario (micción imperiosa, polaquiuria, hematuria).⁸²⁰ La mayoría de estos pacientes también tenían enfermedades subyacentes, como diabetes, hipertensión, lesiones medulares, infecciones previas de las vías urinarias y accidentes cardiovasculares. Como en los estudios anteriores de *G. vaginalis* y del aparato urinario, se presentó piuria sólo en 7 de los 15 hombres evaluados. Es difícil evaluar una cantidad importante (es decir, $> 10^4$ UFC/mL) de *G. vaginalis* en muestras de orina porque estas cantidades pueden observarse en cultivos de hombres asintomáticos y de pacientes con enfermedades renales subyacentes, como obstrucción uretral, prostatitis crónica y enfermedad renal en estadio terminal.^{466,849} Pocas veces, *G. vaginalis* puede causar una infección urinaria ascendente complicada en hombres sanos, aunque estos escenarios son más probables en huéspedes inmunodeprimidos, como los receptores de trasplantes renales.^{273,953} El consenso es que *G. vaginalis* puede desempeñar un papel importante en las infecciones urinarias complicadas y no complicadas tanto en

hombres como en mujeres y, si se presenta en cantidades sustanciales, debe ser identificado y comunicado. *G. vaginalis* y otros microorganismos que están estrechamente relacionados también pueden ser aislados en los animales (p. ej., yeguas).⁷⁶² Todavía se desconoce si pueden causar patología en estos animales, o si las bacterias forman parte de la flora residente del aparato genital equino.

Aislamiento e identificación

El aislamiento de *G. vaginalis* en muestras clínicas se logra mejor utilizando medios semiselectivos, aunque el microorganismo crece en los medios habituales de agar SBA, agar CNA y agar chocolate (véase lámina en color 14-8D). Los medios semiselectivos incluyen agar sangre humana con bicapa-Tween (agar HBT) o agar V.⁸⁹¹ El agar HBT contiene una capa inferior de agar colistina-ácido nalidíxico de Columbia con suplemento de peptona proteosa n° 3 (BD Microbiology Systems, Sparks, MD), anfotericina B (2 µg/mL) y Tween 80 al 0,0075%, recubierto con una capa superior de la misma composición, salvo en que se agrega sangre humana al 5%. El Tween 80 en el medio mejora el crecimiento y aumenta la β-hemólisis producida por cepas de *G. vaginalis*. El agar V contiene base de agar de Columbia con peptona proteosa al 1% y sangre humana al 5%. En lo concerniente a los medios de rutina, *G. vaginalis* crece mejor en agar CNA que contiene sangre de carnero que en agar sangre preparada con una base de tripticasa soja.³⁴⁴ *G. vaginalis* es un β-hemolítico en medios que contienen sangre humana, pero no en medios que contienen sangre de carnero. Los cultivos que crecen en agar CNA con sangre de carnero pueden mostrar una hemólisis "difusa" sutil que rodea a las colonias, sobre todo después de una incubación prolongada (> 72 horas). El microorganismo crece mejor a 35-37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5-7% (una incubadora con CO₂ o una jarra de anaerobiosis por extinción con vela). En general, los cultivos tardan más de 24 horas en crecer y la mayoría de las cepas se aíslan luego de 48 a 72 horas de incubación. El microorganismo también crece en la mayoría de los medios de cultivo con sangre; sin embargo, el aditivo anticoagulante polianetol sulfonato de sodio (SPS) es inhibidor de *G. vaginalis* y puede comprometer su aislamiento en estos hemocultivos.^{712,713} Como sucede con *Neisseria* patógenas, esta inhibición del crecimiento por SPS puede superarse agregando gelatina (1% v/v) a los frascos de hemocultivo.⁷¹³

La identificación presuntiva de *G. vaginalis* se basa sobre la morfología celular típica en los frotis teñidos con Gram (pequeños cocobacilos grampositivos, gramnegativos o gramvariables), el crecimiento característico y la hemólisis en agar HBT (pequeñas zonas claras de colonias β-hemolíticas que rodean a colonias con bordes difusos, colonias de 0,3-0,5 mm de diámetro después de 48 horas de incubación) y las pruebas de oxidasa y catalasa negativas (véase lámina en color 14-8E). La identificación definitiva puede hacerse de acuerdo con las reacciones que se muestran en el cuadro 14-21. Otras características que confirman la identificación de *G. vaginalis* y ayudan a separarlo de otros microorganismos corineformes catalasa negativos denominados no clasificados son la presencia de α-glucosidasa, la ausencia de β-glucosidasa y las reacciones positivas de hidrólisis de almidón e hipurato.³⁶¹ Es mejor realizar las pruebas de utilización de hidratos de carbono en un medio que contenga peptona proteosa N° 3, indicador rojo fenol e hidratos de carbono esterilizado con filtro al 1%. Este medio puede tener un suplemento de agar al 0,5% o suero de caballo al 5%. Estos medios deben tener un inóculo importan-

Cuadro 14-21 Características bioquímicas para la identificación de *Gardnerella vaginalis*

CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
Hemólisis en agar-bicapa de sangre humana-Tween (HBT)	β
Oxidasa	—
Catalasa	—
Hidrólisis de hipurato	+
Producción de ácido a partir de:	
Glucosa	+
Maltosa	+
Sacarosa	+
Manitol	—
Almidón	+
Zona de inhibición de crecimiento con:	
Metronidazol (disco de 50 μ g)	+
Trimetoprim	+
Sulfonamida	+

+, reacción positiva; —, reacción negativa.

te de microorganismos que crecen durante 18-24 horas y son incubados durante 5 días. Se produce ácido a partir de glucosa, maltosa y almidón, pero no de manitol, sorbitol, rafinosa, ramnosa o salicina (véase lámina en color 14-8F).^{236,362} El microorganismo no tiene lisina ni ornitina descarboxilasas ni arginina dihidrolasa, no reduce el nitrato y no produce indol, ureasa ni acetoina. Las cepas de *G. vaginalis* muestran zonas de inhibición alrededor de los discos que contienen metronidazol (50 μ g) y trimetoprim (5 μ g).

Se pueden utilizar otros métodos convencionales modificados rápidos y sistemas para identificar *G. vaginalis*. Greenwood y cols. describieron un método de identificación que utiliza una solución de sales con buffer-rojo fenol, hidratos de carbono esterilizados con filtro y un inóculo importante.³⁶³ En la University of Illinois hemos utilizado este método para la identificación de *G. vaginalis* mediante una serie de pruebas que consisten en glucosa (reacción positiva), maltosa (reacción positiva), manitol (reacción negativa) y almidón soluble (reacción positiva) junto con una prueba de hidrólisis de hipurato de 4 horas desarrollada con Ninhydrin® (reacción positiva). El sistema de intensificación RIM (rapid identification method, método de identificación rápido) (Austin Biologicals, Austin, TX) es un método comercial que utiliza la fermentación de almidón y rafinosa e hidrólisis de hipurato para identificar *G. vaginalis*. En un estudio, este método identificó correctamente el 91,4% de 105 cepas de *G. vaginalis*.⁵³⁸ Este microorganismo también está incluido en la base de datos del sistema API Coryne (BioMérieux, Hazelwood, MO) para la identificación de bacilos grampositivos y en las bases de datos de dos sistemas —el Panel de identificación para *Haemophilus-Neisseria* (HNIA) (American MicroScan, West Sacramento, CA) y la tarjeta de identificación para *Neisseria-Haemophilus* Vitek (NHI) (BioMérieux, Hazelwood, MO)— para la identificación de los bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales.^{310,449,450}

Las cepas de *G. vaginalis* también pueden ser divididas en biotipos sobre la base de reacciones para lipasa, hidrólisis de hipurato y producción de β -galactosidasa.⁶⁸⁵ Utilizando estas tres reacciones, se describieron ocho biotipos (todas las combinaciones de reacciones positivas y negativas). En ese estudio, los biotipos más frecuentes fueron aquellos en los cuales la reacción de hipurato era positiva y las otras dos reacciones eran positivas o negativas. Piot y cols. no observaron ninguna relación entre los biotipos vaginales y la presencia o la ausencia de vaginosis bacteriana.⁶⁸⁵ Se aislaron biotipos idénticos antes y después del tratamiento cuando el intervalo entre las recolecciones de muestras vaginales fue menor de una semana. Además, se aislaron biotipos similares de las vaginas de mujeres con vaginosis bacteriana y las uretras de sus compañeros sexuales. Por otra parte, Briselden y Hillier observaron que la distribución de biotipos de *G. vaginalis* de las mujeres con vaginosis bacteriana y sin ella era diferente; los biotipos lipasa positivos (p. ej., biotipos 1, 2, 3 y 4) eran más predominantes en las mujeres infectadas.¹¹² Wu y cols. examinaron 20 cepas biotipo 1 (que son positivos para hidrólisis de hipurato, lipasa y β -galactosidasa [ONPG]) y observaron que estas cepas eran genéticamente heterogéneas; no se pudo discriminar entre las cepas biotipo 1 aisladas en mujeres con vaginosis bacteriana y en mujeres sanas.⁹⁶⁸ Estos investigadores no investigaron otros biotipos lipasa positivos o lipasa negativos en este estudio. Los resultados del último estudio sugieren que las huellas digitales genómicas de otros biotipos de *G. vaginalis* probablemente no ofrecen ninguna idea adicional sobre el reconocimiento de cepas que son más “virulentas” que otras.

También se han utilizado técnica de sondas y amplificación de ácidos nucleicos para detectar e identificar *G. vaginalis* en muestras clínicas, incluidas las muestras vaginales y los líquidos amnióticos.^{122,542,645,902} Van Belkum y cols. secuenciaron la región entre los genes de rRNA 16S y 23S de *G. vaginalis* y crearon un ensayo basado sobre PCR confirmado con sonda y específico para este microorganismo.⁹⁰² Utilizando este método de PCR, se detectó *G. vaginalis* en el 40% de las muestras vaginales de las mujeres sin tener en cuenta su estado clínico. De las 11 pacientes con diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana, 10 fueron positivas para *G. vaginalis* con el ensayo basado sobre PCR y sonda. Pao y cols. utilizaron DNA de *G. vaginalis* clonado, marcado y digerido con endonucleasas de restricción como sonda en un ensayo de transferencia por ranuras (dot-blot) para la detección de *G. vaginalis* en muestras vaginales y observaron que la sonda podía detectar hasta 10⁴ microorganismos.⁶⁵⁸ La Prueba de Identificación Affirm VP Microbial® (Becton-Dickson, Sparks, MD), un sistema comercial, utiliza sondas sintéticas de oligonucleótidos para la detección simultánea de *G. vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* y especies de *Candida* de un único hisopado vaginal.¹¹³ Cuando se comparó con preparados húmedos de rutina para la detección de células clave, la prueba Affirm VP mostró una sensibilidad y una especificidad del 90% y el 97%, respectivamente, lo que sugiere que podría utilizarse en reemplazo del microscopio de montaje húmedo para la detección de células clave. Como la sonda fue más sensible que el cultivo de *G. vaginalis* en medio HBT, se pensó que la prueba se podía hacer más específica utilizándola junto con otros criterios diagnósticos (pH vaginal, presencia de olor a aminas con KOH [“prueba del olor”]) para la vaginosis bacteriana. Globalmente, Briselden y Hillier observaron que la prueba Affirm VP para *G. vaginalis* era positiva para el 97% de las mujeres que tenían vaginosis bacteriana sobre la base de criterios clínicos y tenía una especificidad del 71%.¹¹³ Witt y cols. observaron que la prueba Affirm VP III tenía una especi-

ficidad mayor del 97% cuando se comparó con los frotis teñidos con Gram.⁹⁵⁸ La sensibilidad del ensayo varió de acuerdo con la puntuación dada al frotis teñido con Gram por los criterios de puntuación establecidos y varió del 73,2% al 89,5%.^{644,958}

Sensibilidad a los antibióticos

Las cepas de *G. vaginalis* por lo general son sensibles a penicilina, ampicilina, eritromicina, clindamicina, trimetoprim y vancomicina.⁴⁸⁸ Ciprofloxacina e imipenem muestran actividad variable. Algunas cepas son resistentes a tetraciclina y minociclina, y se observa una resistencia pronunciada a amikacina, aztreonam y sulfametoxazol en la mayoría de las cepas. Debido a la resistencia al sulfametoxazol, no se observa ninguna actividad sinérgica contra *G. vaginalis* con cotrimoxazol (sulfametoxazol y trimetoprim en una relación 19:1).

Como se mencionó, *G. vaginalis* se asocia con vaginosis bacteriana, que se sabe tiene una etiología polimicrobiana, pero también se puede aislar en las vaginas de mujeres sanas. En consecuencia, no se recomienda el cultivo de muestras vaginales para ese microorganismo. El uso sistemático de medios semiselectivos como los agares HBT y V para cultivo de muestras vaginales representa un costo innecesario que contribuye con poca información útil, dado que el diagnóstico de laboratorio reside en el examen clínico cuidadoso y la interpretación de un frotis teñido con Gram recogido correctamente de las secreciones vaginales.^{415,644,821} Se puede aislar *G. vaginalis* en un medio convencional de agar CNA después de una incubación prolongada y la identificación presuntiva suele bastar en estas circunstancias.³⁴⁴ Sin embargo, los aislamientos en sitios corporales sistémicos (p. ej., sangre, líquido articular) deben confirmarse con otras pruebas bioquímicas, como ya se describió.

Especies de *Lactobacillus*

Taxonomía y epidemiología

Los lactobacilos son bacilos grampositivos que forman parte de la flora normal de la vagina, el tubo digestivo y la orofaringe humanos. Están ampliamente distribuidos en diversos ámbitos (agua de fuentes naturales, aguas servidas, silos) y comprenden parte de la flora normal de muchas otras especies animales. También se encuentran en distintos alimentos (p. ej., productos lácteos, granos, comidas, peces, chucrut) en gran parte debido a su amplia gama de capacidades fermentativas. Algunas especies de *Lactobacillus* se agregan ahora a alimentos como prebióticos, tal vez por sus efectos beneficiosos para la salud. Las células individuales de especies de *Lactobacillus* a menudo son largas y delgadas, aunque pueden observarse bacilos "corineformes" o "cocobacilos" más pequeños. Algunas especies pueden formar cadenas largas de bacilos (véase lámina en color 14-2H e I). La mayoría de las especies son inmóviles; las raras especies móviles tienen flagelos peritricos.⁴⁷⁸ La mayoría de las especies son acrobias facultativas, aunque algunas crecen mejor en condiciones anaerobias o microaerófilas, sobre todo en el aislamiento primario. Los lactobacilos se denominan así porque más del 50% de los productos terminales de la fermentación de la glucosa es ácido láctico; algunas especies pueden producir también ácidos acético, fórmico y succínico, junto con CO₂. Los lactobacilos son uniformemente catalasa negativos y oxidasa negativos, no reducen nitrato, no producen indol ni H₂S, no licúan la gelatina y no forman esporas. Las paredes

celulares de las especies de *Lactobacillus* contienen un peptidoglucano grueso y ácidos teicoicos ligados a la membrana. Lisina, meso-DAP y ornitina son los diaminoácidos que comprenden los enlaces cruzados de peptidoglucanos. Las menaquinonas de transporte de electrones están ausentes. Algunas especies (p. ej., *L. confusus*) producen "limo" extracelular a partir de sacarosa. En la edición de 1986 de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* se mencionan más de 45 especies de *Lactobacillus* o similares a *Lactobacillus* y se describieron varias más desde entonces. En la próxima edición, los lactobacilos son clasificados en el filo Firmicutes en la clase Bacilos, orden propuesto Lactobacillales. En este orden, se incluyen el género *Lactobacillus* y el género *Pediococcus* en la familia Lactobacillaceae.³²⁹

Importancia clínica

Aunque los lactobacilos son intrínsecamente de baja virulencia, causan raras infecciones oportunistas sobre todo en huéspedes inmunodeprimidos. Se informó que las especies de *Lactobacillus* causan endocarditis en pacientes con malformaciones congénitas (p. ej., comunicación interventricular, defectos de válvula aórtica bicúspide), defectos adquiridos de válvulas nativas (p. ej., endocarditis previa, cardiopatía reumática), injertos vasculares y válvulas protésicas.^{43,322,366,439,696,778,882,922} La bacteriemia transitoria originada en abscesos localizados (p. ej., abscesos dentales periapicales), manipulaciones dentales (p. ej., extracciones, tratamiento de conducto radicular), endometritis posparto, perionfalitis neonatal y endoscopia gastrointestinal puede sembrar las válvulas anormales e iniciar lesiones endocárdicas. En los que tienen enfermedad de válvulas nativas, se pueden observar mediante ecocardiogramas grandes vegetaciones que contienen los lactobacilos en las válvulas aórtica, mitral, tricúspide y pulmonar.⁶⁹⁶ Estas vegetaciones cardíacas tienen una tendencia pronunciada a embolizar hacia el encéfalo. En la serie de pacientes revisada por Gallemore y cols., se desarrollaron embolias sépticas en 14 de 35 pacientes; 5 de ellos fallecieron y 9 requirieron cirugía.³²² Para los pacientes con endocarditis debida a especies de *Lactobacillus*, la terapia sinérgica con un β-lactámico más un aminoglucósido por lo menos durante 4 a 6 semanas parece ser el tratamiento óptimo. Sin embargo, a menudo es difícil la curación médica sin recaída o sin necesidad de reemplazo valvular. En una serie, sólo se logró la curación con antibióticos únicamente en el 39% de los pacientes.³⁶⁶

La bacteriemia por *Lactobacillus* sin endocarditis simultánea es relativamente infrecuente y ocurre sobre todo en pacientes con trastornos subyacentes, como cáncer tratado con quimioterapia, trasplante de médula ósea y órganos (en especial hígado), diabetes, enfermedad renal y cirugía ginecológica.^{28,30,37,667,770,776} Las puertas de entrada de los cuadros de sepsis por lactobacilos reflejan los hábitos normales de estos microorganismos dentro de la orofaringe, el aparato genitourinario y el tubo digestivo. Estos microorganismos no forman parte de la flora cutánea residente y no se ha demostrado que produzcan infecciones relacionadas con catéteres intravenosos.³⁰ Los factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia por *Lactobacillus* son neutropenia persistente, uso de antibióticos de amplio espectro, trasplante de aloinjertos con terapia inmunosupresora, quimioterapia para cáncer e instrumentación y procedimientos invasivos sobre los aparatos digestivo y respiratorio.^{151,184,284,477,770} La bacteriemia por *Lactobacillus* también se ha asociado con infección por HIV y SIDA.^{2,427,741} En los pacientes con inmunosupresión profunda, puede ocurrir una

bacteriemia por cepas de *Lactobacillus* resistentes a la vancomicina durante la administración de este antibiótico (y otros agentes de amplio espectro) o poco después de ella.

La bacteriemia por *Lactobacillus* también se asocia con infecciones ginecológicas o pleuropulmonares. En general, las mujeres con lactobacilemia tienen enfermedad o anomalías subyacentes o han sufrido procedimientos ginecológicos u obstétricos invasivos, que han incluido endometritis luego de procedimientos de dilatación y curetaje, abscesos pelvianos y neoplasias del aparato genitourinario (p. ej., cáncer de ovario con invasión de intestino grueso, coriocarcinoma).^{28,66,181} En estos casos, la fuente del microorganismo suele ser la propia microflora vaginal de las pacientes. También se han comunicado infecciones pleuropulmonares y abscesos pulmonares debidos a especies de *Lactobacillus* en pacientes inmunodeprimidos. Estas infecciones han incluido neumonía necrosante secundaria a una fístula traqueobronquial en un paciente con carcinoma pavimentoso del esófago, empiema pleural debido a várices esofágicas sangrantes, absceso pulmonar extrahospitalario y neumonías aspirativas en pacientes con SIDA.^{625,699,741} Sriskanden y cols. también documentaron una neumonía debida a especies de *Lactobacillus* en tres pacientes con neutropenia profunda secundaria a inmunosupresión por SIDA y por quimioterapia citotóxica para vasculitis y trasplante medular ulterior.⁸³⁸ Un único informe de caso describió la neumonía por *Lactobacillus* en un hombre de 52 años en el cual al parecer el microorganismo se transmitió al paciente por el propio pulmón trasplantado.⁴⁶⁵ En 2002, Wood y cols. informaron sobre el primer caso de neumonía asociada con el respirador en un paciente inmunocompetente en estado crítico.⁹⁶⁵

También se han comunicado infecciones por *Lactobacillus* en recién nacidos. Broughton y cols. informaron un caso de meningitis debida a lactobacilos que ocurrió en un lactante recién nacido inmunariamente normal.¹¹⁶ En este caso, se creyó que la transmisión vertical del microorganismo de la madre al lactante durante el pasaje a través del canal de parto era la fuente del microorganismo aislado en el líquido cefalorraquídeo del neonato. Thompson y cols. comunicaron un caso de sepsis por *L. acidophilus* en un lactante de 2 meses de vida en el cual la fuente del microorganismo fue un catéter venoso central infectado.⁸⁸³

Varias comunicaciones de casos han documentado lactobacilos como agentes etiológicos en otros distintos tipos de infecciones. Las presentaciones clínicas infrecuentes han incluido abscesos asociados con cuerpos extraños retenidos (p. ej., astillas), endoftalmítis secundaria a lesiones oculares penetrantes, condritis secundaria a perforación de orejas, empiema de la vesícula biliar, absceso esplénico con empiema, colecistitis bacteriémica, infección intravascular luego de rotura intraesplénica de un aneurisma micótico y peritonitis primaria.^{18,55,222,364,707,756,848,963} También se documentó una sepsis por *Lactobacillus* en un paciente con colitis ulcerosa, en la cual se había dañado la microestructura fisiológica de la mucosa intestinal mediante procedimientos endoscópicos y quirúrgicos.²⁵⁸ Al igual que muchos otros agentes oportunistas, también se han aislado lactobacilos en infecciones peritoneales en pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua.^{492,766} A pesar del uso creciente y amplio de los lactobacilos en distintos productos como prebióticos (p. ej., *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GC), no ha aumentado la incidencia de infecciones o la proporción de infecciones bacteriémicas por lactobacilos.^{760,761}

En su nicho ecológico normal en la vagina humana, los lactobacilos pueden desempeñar un papel clave en la defensa contra el desarrollo de vaginitis por *Candida*, vaginosis bacteriana,

infecciones urinarias e infecciones de transmisión sexual como gonorrea (véase lámina en color 14-8B).^{247,376,416,843} Los lactobacilos facultativos constituyen la flora normal predominante de la vagina sana, mientras que las especies anaerobias de lactobacilos son más a menudo aisladas en mujeres con diagnóstico clínico de vaginosis. Las especies facultativas producen gran cantidad de peróxido de hidrógeno, mientras que las especies anaerobias no lo hacen. Se postula que la colonización de la vagina por microorganismos facultativos, productores de peróxido de hidrógeno, puede representar un mecanismo de defensa antimicrobiano inespecífico para la vagina normal y puede impedir el desarrollo de vaginosis bacteriana y vaginitis por *Candida* por el efecto tóxico directo de los radicales libres de peróxido sobre los microorganismos facultativos y anaerobios estrictos asociados con las infecciones vaginales.^{399,416,491}

Aislamiento e identificación

Después del crecimiento durante 24 horas en SBA, las colonias de las especies de *Lactobacillus* suelen ser pequeñas (2-5 mm), convexas y lisas con bordes enteros; también puede observarse cierta α -hemólisis o "descoloración gris" de los medios (véase lámina en color 14-6G y H). Debido a la gran cantidad de especies de *Lactobacillus* que se describieron, en general no se identifica la categoría de especie de las cepas aisladas.⁴⁷⁸ En comunicaciones en las cuales se realizaron identificaciones específicas, la mayoría de los investigadores han utilizado los métodos fenotípicos descritos por Holdeman y Moore en el *Virginia Polytechnic Institute (VPI) Anaerobe Manual*, con referencias cruzadas a descripciones de especies en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.^{422,478} Además de los métodos fenotípicos convencionales, los patrones proteicos de células enteras altamente estandarizados obtenidos por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) han probado ser útiles para la identificación de especies de *Lactobacillus*.^{613,691} También se han desarrollado métodos taxonómicos por hibridación de oligonucleótidos y moleculares (PCR, secuenciación de rRNA 16S) para la identificación tanto de género como de especie de lactobacilos.^{47,233,660,807,963}

El reconocimiento y la confirmación de lactobacilos en el laboratorio de microbiología clínica se pueden obtener con precisión con algunas pruebas fenotípicas. Algunas especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, y esta característica es útil para su identificación.⁴²³ En general, las cepas resistentes crecen hasta el borde de una prueba de vancomicina por difusión en disco (véase lámina en color 14-7A). Las cepas resistentes a la vancomicina deben ser diferenciadas de las especies de *Leuconostoc* y *Pediococcus*, ambas resistentes a la vancomicina y que pueden parecer cocobacilares en las tinciones de Gram. Las especies de *Leuconostoc* producen gas a partir de glucosa en caldo de Mann-Rugosa-Sharp (MRS), mientras que la mayoría de las especies de *Lactobacillus* aisladas en el laboratorio clínico no producen gas. Los lactobacilos son PYR positivos, en tanto las especies de *Leuconostoc* como de *Pediococcus* son PYR negativas. Los lactobacilos también son LAP negativos, en tanto las especies de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus* son LAP positivas. Por supuesto, se puede utilizar cromatografía gas-líquido a partir de cultivos de caldo de glucosa para obtener una identificación precisa de la categoría de género de las cepas aisladas, debido a la formación de gran cantidad de ácido láctico por estos microorganismos. Las especies de *Lactobacillus* que se han identificado en asociación con infecciones humanas son *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. leishmanii*, *L.*

fermentum, *L. casei* subespecie *casei*, *L. paracasei*, *L. confusus* y el grupo de *L. acidophilus*. En particular, las cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum* pueden ser intrínsecamente resistentes a la vancomicina y la teicoplanina.⁸⁵⁸

Sensibilidad a los antibióticos

En general, los lactobacilos son sensibles a penicilina G, ampicilina, cefalosporinas y clindamicina.^{389,407} Sin embargo, se observó que varias especies de *Lactobacillus* son tolerantes a las penicilinas y las cefalosporinas. Se han demostrado relaciones de concentración bactericida mínima con concentración inhibidora mínima (CBM:CIM) desde 30:1 para cefalotina hasta 266:1 para ampicilina en varias cepas de importancia clínica.^{66,67} Estos datos in vitro se correlacionan con el dilema del tratamiento antibiótico para los pacientes con endocarditis por *Lactobacillus* causada por cepas tolerantes a penicilina/ampicilina. En un estudio de nueve pacientes con endocarditis, las nueve cepas de lactobacilos tenían CIM para penicilina y cefalotina que estaban en el rango de sensibilidad, pero sólo el 52% tenía CBM para estos agentes que se pudieron lograr en suero mediante regímenes de dosificación estándares.^{43,66} Se observó una situación similar para clindamicina en estas cepas. Ocho de las nueve cepas tuvieron CIM para clindamicina que estaban en el intervalo de sensibilidad, aunque las nueve tenían CBM que excedían en mucho las concentraciones séricas alcanzables para clindamicina.

Como ya se mencionó, el tratamiento combinado con penicilina y un aminoglucósido parece ser el enfoque terapéutico de elección para el tratamiento de las infecciones graves por *Lactobacillus* como endocarditis e infecciones profundas (p. ej., infección intrauterina). Bayer y cols. demostraron actividad sinérgica con penicilina/ampicilina y gentamicina o estreptomina.⁶⁶ Además, no se puede considerar que las cefalosporinas ni la vancomicina sean alternativas justificadas en lugar de penicilina/ampicilina.³⁶⁶ Las cepas de *Lactobacillus* que son resistentes a la penicilina y la ampicilina también tienden a serlo a las cefalosporinas (p. ej., cefalotina, ceftazidima, cefuroxima, cefotaxima) y a las cefamicinas (cefotixina) o a tener CIM elevadas de estos antibióticos.⁵⁵ Los lactobacilos son casi uniformemente resistentes a fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que la mayoría de las cepas son sensibles a gentamicina, tobramicina y cloranfenicol.^{30,66,67,203} Las CIM de los lactobacilos para imipenem y antibióticos macrólidos suelen caer dentro del intervalo de sensibilidad y parecen ser eficaces en los pacientes con alergia a las penicilinas.^{30,151,858}

Además de las penicilinas y las cefalosporinas, algunas especies de lactobacilos son resistentes a los antibióticos glucopéptidos vancomicina y teicoplanina (véase antes). La sensibilidad de las distintas especies de lactobacilos a estos agentes está relacionada con la estructura de su pared celular. El análisis de las paredes celulares de las cepas resistentes a la vancomicina (p. ej., *L. rhamnosus*) pone de manifiesto que los precursores peptidoglucanos de estas especies tienen un depsipéptido terminal "D-alanina-D-lactato", mientras que las especies que son sensibles a la vancomicina (p. ej., el grupo de *L. acidophilus*) tienen una estructura final "D-alanina-D-alanina".^{86,390} Esta diferencia en un solo aminoácido de la estructura de peptidoglucanos altera eficazmente el sitio diana para la vancomicina, lo que permite que ocurra la síntesis de peptidoglucanos en presencia de vancomicina. Es interesante señalar que se ha demostrado que la sensibilidad a los glucopéptidos está relacionada con la especie.²⁶² Por ejemplo, *L. rhamnosus* (ex *L. casei* subespecie *rhamnosus*), especie que se ha asociado con infecciones graves

en huéspedes inmunodeprimidos, y *L. paracasei* subespecie *paracasei*, son intrínsecamente resistentes a los glucopéptidos, y las CIM de vancomicina exceden los 256 µg/mL.^{151,262} Otras especies aisladas en infecciones graves han sido sensibles a la vancomicina por las pruebas de CIM pero, como sucede con las CBM para las penicilinas y la clindamicina, las CBM de vancomicina pueden ser diluciones varias veces mayores que la CIM.³⁶⁶

REFERENCIAS

1. Aalbaek B, Christensen H, Bisgaard M, et al. *Actinomyces hyovaginalis* associated with disseminated necrotic lung lesions in slaughter pigs. *J Comp Pathol* 2003; 129:70-77.
2. Abgrall S, Joly V, Derkinderen P, et al. *Lactobacillus casei* infection in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:180-182.
3. Adderson EE, Croft A, Leonard K, Carroll K. Septic arthritis due to *Arcanobacterium bernardiae* in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* 1998;27: 211-212.
4. Agata N, Mori M, Ohta M, et al. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:31-34.
5. Agata N, Ohta M, Arakawa Y, Mori M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology* 1995;143:983-988.
6. Agata N, Ohta M, Mori M. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol* 1996;33:67-69.
7. Agata N, Ohta M, Mori M, Isoe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;129:17-20.
8. Aguado JM, Morales JM, Saito E, et al. Encrusted pyelitis and cystitis by *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2): a new and threatening complication following renal transplant. *Transplantation* 1993;56:617-622.
9. Aguado JM, Ponte C, Soriano F. Bacteriuria with a multiply resistant species of *Corynebacterium* (*Corynebacterium* group D2): an unnoticed cause of urinary tract infection. *J Infect Dis* 1987;156:144-150.
10. Ahmed K, Kawakami K, Watanabe K, et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis* 1995;20:41-46.
11. Ahme S, Stenstrom I-M, Jensen NE, et al. Classification of *Erysipelothrix* strains on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45: 382-385.
12. Ajal M, Turner J, Fagan P, Walker P. Actinomycosis oto-mastoiditis. *J Laryngol Otol* 1997;111:1069-1071.
13. Akesson A, Hedstrom SA, Ripa T. *Bacillus cereus*: a significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds in orthopaedic wards. *Scand J Infect Dis* 1991; 23:71-77.
14. Albuquerque L, Rainey FA, Chung AP, et al. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic specie from solfatatic soils of Sao Miguel in the Azores. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:451-457.
15. Alexander AV, Walker RL, Johnson BJ, et al. Bovine abortion attributable to *Listeria ivanovi*: four cases (1988-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1993;200:711-714.
16. Alfaro DV, Roth D, Liggett PE. Posttraumatic endophthalmitis. Causative organisms, treatment, and prevention. *Retina* 1994;14:201-211.
17. Allerberger F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:183-189.
18. Allison D, Galloway A. Empyema of the gall-bladder due to *Lactobacillus casei*. *J Infect* 1988;17:191.
19. Almuzara MN, De Mier C, Barberis CM, et al. *Arcanobacterium haemolyticum*: identification and susceptibility to nine antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:828-829.
20. Alonso-Echanove J, Shah SS, Valenti AJ, et al. Nosocomial outbreak of *Microbacterium* species bacteremia among cancer patients. *J Infect Dis* 2001;184:754-760.
21. Alos JJ, Barros C, Gomez-Garcés JL. Endocarditis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1085-1088.
22. Amaya RA, Al-Dossary F, Demmler GJ. *Gardnerella vaginalis* bacteremia in a premature neonate. *J Perinatol* 2002;22:585-587.
23. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiological associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
24. Anaisie E, Kontoyiannis DP, Kantarjian H, et al. Listeriosis in patients with chronic lymphocytic leukemia who were treated with fludarabine and prednisone. *Ann Intern Med* 1992;117:466-459.
25. Andavolu RH, Jagadha V, Lue Y, McLean T. Lung abscess involving *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in a patient with AIDS-related complex. *NY State J Med* 1986;86:594-596.
26. Anderson MD, Kennedy CA, Walsh TP, Bowler WA. Prosthetic valve endocarditis due to *Rothia dentocariosa*. *Clin Infect Dis* 1993;17:945-946.
27. Andersson MA, Mikkola R, Helin J, et al. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1338-1343.

28. Andriessen MP, Mulder JG, Sleijfer DT. *Lactobacillus* septicemia. an unusual complication during the treatment of choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1991;40:87-89.
29. Antoniou S, Dimitriadis A, Polydorou F, Malaka E. *Brevibacterium iodinum* peritonitis associated with acute urticaria in a CAPD patient. *Perit Dial Int* 1997;17:614-615.
30. Antony SJ, Stratton CW, Dummer JS. *Lactobacillus* bacteremia: description of the clinical course in patients without endocarditis. *Clin Infect Dis* 1996;23:773-778.
31. Antos H, Mollison LC, Richards MC, et al. Diphtheria: another risk of travel. *J Infect* 1992;25:307-310.
32. Apotheloz C, Regamey C. Disseminated infection due to *Actinomyces meyeri*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;22:621-625.
33. Arahall DR, Marquez MC, Volcani BE, et al. Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1501-1503.
34. Aravena-Roman M, Bowman R, O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pathology* 1995;27:71-73.
35. Armstrong RW, Fung PC. Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:689-702.
36. Amaout MK, Tamburro RF, Bodner SM, et al. *Bacillus cereus* causing fulminant sepsis and hemolysis in two patients with acute leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21:431-435.
37. Arpi M, Vancanneyt M, Swings J, Leisner JJ. Six cases of *Lactobacillus* bacteraemia: identification of organisms and antibiotic susceptibility and therapy. *Scand J Infect Dis* 2003;35:404-408.
38. Artz AL, Szabo S, Zabel LT, Hoffmeister HM. Aortic valve endocarditis with paravalvular abscesses caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:587-588.
39. Ash C, Collins MD. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 1992;73:75-80.
40. Ash C, Farrow JA, Dorsch M, et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:242-246.
41. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* 1991;13:202-206.
42. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacillus (Ash, Farrow, Wallbanks, Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993/1994; 64:253-260.
43. Atkins MC, Nicolson L, Harrison GAJ, et al. *Lactobacillus jensenii* prosthetic valve endocarditis. *J Infect* 1990;21:322-324.
44. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 2000;342:1236-1241.
45. Austin G, Hill E. Endocarditis due to *Corynebacterium* CDC group G-2. *J Infect Dis* 1983;147:1106.
46. Auzias A, Bollet C, Ayari R, et al. *Corynebacterium freneyi* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41:2777-2778.
47. Baele M, Vaneechoutte M, Verhelst R, et al. Identification of *Lactobacillus* species using (tDNA-PCR). *J Microbiol Meth* 2002;50:263-271.
48. Baida GE, Kuzmin NP. Mechanism of action of hemolysin ID from *Bacillus cereus*. *Biochem Biophys Acta* 1996;1284:122-124.
49. Baillie LW, Jones MN, Turnbull PC, Manchee RJ. Evaluation of the Biolog system for the identification of *Bacillus anthracis*. *Lett Appl Microbiol* 1995;20:209-211.
50. Bakalidou A, Kampfer P, Berchtold M, et al. *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1185-1192.
51. Balci I, Eksi F, Bayram A. Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. *J Int Med Res* 2002;30:422-427.
52. Ball SC, Sepkowitz K. Infection due to *Bacillus cereus* in an injection drug user with AIDS: bacteremia without morbidity. *Clin Infect Dis* 1994;19:216-217.
53. Bandera A, Gori A, Rossi MC, et al. A case of costochondral abscess due to *Corynebacterium minutissimum* in an HIV-infected patient. *J Infect* 2000;41:103-105.
54. Bannerman E, Yersin M-N, Bille J. Evaluation of the Organon-Teknika Micro-ID *Listeria* system. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2011-2015.
55. Bantar CE, Rellosa S, Castell FR, et al. Abscess caused by vancomycin-resistant *Lactobacillus confusus*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2063-2064.
56. Barakett V, Morel G, Lesage G, Petit IC. Septic arthritis due to non-toxicogenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies *mitis*. *Clin Infect Dis* 1993;17:520-521.
57. Barksdale I, Linder R, Sulea T, Pollice M. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* 1981;13:335-343.
58. Barnham M. *Actinomyces pyogenes* bacteraemia in a patient with carcinoma of the colon. *J Infect* 1988;17:231-234.
59. Barr JG, Murphy PG. *Corynebacterium striatum*: an unusual organism isolated in pure culture from sputum. *J Infect* 1986;13:297-315.
60. Barreau C, Himet F, Kireddjian M, et al. Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. *J Clin Microbiol* 1994;31:2085-2090.
61. Barrett SLR, Cookson BT, Carlson, LC, et al. Diversity within reference strains of *Corynebacterium matruchotti* includes *Corynebacterium durum* and a novel organism. *J Clin Microbiol* 2001;39:943-948.
62. Bassiri AG, Girgis RE, Theodore J. *Actinomyces odontolyticus* thoracopulmonary infections. Two cases in lung and heart-lung transplant recipients. *Chest* 1996;109:1109-1111.
63. Bastida-Vila MT, Lopez-Onrubia P, Rovira-Lledos J, et al. *Gardnerella vaginalis* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:400-401.
64. Batson JH, Mikkamala R, Byrd RP Jr, Roy TM. Pulmonary abscess due to *Corynebacterium striatum*. *J Tenn Med Assoc* 1996;89:115-116.
65. Baybek M, Caner H, Atslan H, et al. Cerebral *Dermabacter hominis* abscess. *Infection* 1998;26:181-183.
66. Bayer AS, Chow AW, Betts D, Guze LB. Lactobacillemia: report of nine cases: important clinical and therapeutic considerations. *Am J Med* 1978;64:808-813.
67. Bayer AS, Chow AW, Concepcion N, Guze LB. Susceptibility of 40 lactobacilli to six antimicrobial agents with broad gram-positive anaerobic spectra. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:720-722.
68. Beckwith DG, Jahre JA, Haggerty S. Isolation of *Corynebacterium aquaticum* from spinal fluid of an infant with meningitis. *J Clin Microbiol* 1986;23:375-376.
69. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 1995;63:4423-4428.
70. Beecher DJ, Wong AC. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 1994;62:980-986.
71. Bekemeyer WB, Zimmerman GA. Life threatening complications associated with pneumonia due to *Bacillus cereus*. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:466-469.
72. Berardi-Grassias L, Roy O, Berardi JC, Furioli J. Neonatal meningitis due to *Gardnerella vaginalis*. *Eur J Clin Microbiol* 1988;7:406-407.
73. Berenguer, Solera J, Diaz MD, et al. Listeriosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1991;13:115-119.
74. Berger SA, Gorea A, Stadler J, et al. Recurrent breast abscess caused by *Corynebacterium minutissimum*. *J Clin Microbiol* 1984;20:1219-1220.
75. Bernard KA, Bellefeuille M, Ewan EP. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *J Clin Microbiol* 1991;29:83-89.
76. Bernard K, Bellefeuille M, Hollis DG, et al. Cellular fatty acid composition and phenotypic and cultural characterization of CDC fermentative coryneform groups 3 and 5. *J Clin Microbiol* 1994;32:1217-1222.
77. Bernard KA, Munro C, Weibe D, Ongansoy E. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. *J Clin Microbiol* 2002;40:4375-4381.
78. Berner R, Leitis JU, Furste HO, Brandis M. Bacterial tracheitis caused by *Corynebacterium diphtheriae*. *Eur J Pediatr* 1997;156:207-2081.
79. Berner R, Pelz K, Wilhelm C, et al. Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. *J Clin Microbiol* 1997;35:1011-1012.
80. Bert F, Ouahes O, Lambert-Zechovsky N. Brain abscess due to *Bacillus magerans* following a penetrating periorbital injury. *J Clin Microbiol* 1995;33:1950-1953.
81. Bhandari S, Meigh JA, Sellars L. CAPD peritonitis due to *Corynebacterium striatum*. *Perit Dial Int* 1995;15:88-89.
82. Biavasco F, Giovanetti E, Miele A. *In vitro* co-transfer of vanA vancomycin resistance between enterococci and listeria of different species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:50-59.
83. Bibashi E, Kokolina E, Mitsopoulos E, et al. Peritonitis due to *Rothia dentocariosa* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Infect Dis* 1999;28:696.
84. Bille J, Catimel B, Bannerman E, et al. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl Environ Microbiol* 1992;59:1857-1860.
85. Billington SJ, Post KW, Jost BH. Isolation of *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:159-162.
86. Billot-Klein D, Gutmann L, Sable S, et al. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin resistant VanB type *Enterococcus* D366 and of the naturally vancomycin-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol* 1994;176:2398-2405.
87. Binder D, Zbinden R, Widmer U, et al. Native and prosthetic valve endocarditis caused by *Rothia dentocariosa*. *Infection* 1997;25:22-26.
88. Bizette GA, Kemmerly SA, Cole JT, et al. Sepsis due to coryneform group A-4 in an immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 1995;21:1334-1336.
89. Blachman U, Gilardi GL, Pickett MJ. *Bacillus* species strains posing as nonfermentative gram-negative rods. *Clin Microbiol Newslett* 1980;2:8.
90. Blackmon DM, Calvert HM, Henry PM, Westfall CT. *Bacillus cereus* endophthalmitis secondary to self-inflicted periorbital injection. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1585-1586.
91. Blue SR, Singh VR, Sauboulle MA. *Bacillus licheniformis* bacteremia: five cases associated with central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1995;20:629-633.
92. Boc SF, Martone JD. Osteomyelitis caused by *Corynebacterium jeikeium*. *J Am Podiatr Med Assoc* 1995;85:338-339.
93. Boerlin P, Piffaretti J-C. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:59-64.
94. Boerlin P, Rocourt J, Grimont F, et al. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:69-73.
95. Boerlin P, Rocourt J, Piffaretti J-C. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:59-64.
96. Boggess JA, Watts DH, Hillier SL, et al. Bacteremia shortly after placental separation during cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 1996;87:779-784.

101. Boone DR, Liu Y, Zhao Z-J, et al. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:441-448.
102. Booth LV, Ellis C, Wale MC, et al. An atypical case of *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis and subsequent outbreak control measures. *J Infect* 1995;31:63-65.
103. Borer S, Kleinfeld M. Peritonitis caused by *Oerskovia xanthineolytica* in a patient on chronic ambulatory peritoneal dialysis (letter). *Am J Kidney Dis* 1996;27:458.
104. Bosstock AD, Gilbert FR, Lewis D, Smith DC. *Corynebacterium ulcerans* infection associated with untreated milk. *J Infect* 1984;9:286-288.
105. Boudewijns M, Magerman J, Verhaegen J, et al. *Rothia dentocariosa* endocarditis and mycotic aneurysms: case report and review of the literature. *Clin Microbiol Infect* 1993;9:222-229.
106. Bourgeois N, Jacobs F, Tavares ML, et al. *Listeria monocytogenes* hepatitis in a liver transplant recipient: a case report and review of the literature. *J Hepatol* 1993;18:284-289.
107. Boustoulier YL, Johnson AP, Taylor-Robinson D. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. *J Med Microbiol* 1987;23:327-329.
108. Bowstead TT, Santiago SM Jr. Pleuropulmonary infection due to *Corynebacterium striatum*. *Br J Dis Chest* 1980;74:198-200.
109. Braden DS, Feldman S, Palmer AL. *Rothia* endocarditis in a child. *South Med J* 1999;92:815-816.
110. Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. *J Dent Res* 1999;78:1525-1534.
111. Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, et al. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1996;34:2089-2094.
112. Braun TI, Travis D, Dee RR, Nieman RE. Liver abscess due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:267-269.
113. Brazzola P, Zbinden R, Rudin C, et al. *Brevibacterium casei* sepsis in an 18-year-old female with AIDS. *J Clin Microbiol* 2000;38:3513-3514.
114. Bregenzer T, Frei R, Ohnacker H, Zimmerli W. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:696-698.
115. Brennan NM, Brown R, Goodfellow M, et al. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of smear-ripened cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:843-852.
116. Briselden AM, Hillier SL. Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2761-2764.
117. Briselden AM, Hillier SL. Evaluation of Affirm VP microbial identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:148-152.
118. Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SL. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J Clin Microbiol* 1992;30:663-666.
119. Brooke CJ, Riley TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology, and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 1999;48:789-799.
120. Broughton RA, Gruber WC, Hafar AAM, Baker CJ. Neonatal meningitis due to *Lactobacillus*. *Pediatr Infect Dis* 1983;2:382-384.
121. Brownstein DG, Barthold SW, Adams RL, et al. Experimental *Corynebacterium kutscheri* infection in rats: bacteriology and serology. *Lab Anim Sci* 1985;35:135-138.
122. Brunner S, Graf S, Riegel P, Altwegg M. Catalase-negative *Actinomyces neuii* subsp. *neuii* isolated from an infected mammary prosthesis. *Int J Med Microbiol* 2000;290:285-287.
123. Bubert A, Riebe J, Schnitzler N, et al. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:179-183.
124. Bula CJ, Bille J, Glauser MP. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin Infect Dis* 1995;20:66-72.
125. Burke GJ, Malouf MA, Glanville AR. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. *Med J Aust* 1997;166:362-364.
126. Burton JP, Dixon JL, Reid G. Detection of *Bifidobacterium* species and *Gardnerella vaginalis* in the vagina using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Int J Obstet Gynecol* 2003;81:61-63.
127. Cai J, Collins MD. Phylogenetic analysis of species of the meso-diaminopimelic acid-containing genera *Brevibacterium* and *Dermabacter*. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:583-585.
128. Cai S, Kabuki DY, Kuaye AY, et al. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2002;40:3319-3324.
129. Cain DB, McCann VL. An unusual case of cutaneous listeriosis. *J Clin Microbiol* 1996;23:976-977.
130. Callegan MC, Kane ST, Cochran DC, et al. Relationship of *plcR*-regulated factors to *Bacillus* endophthalmitis virulence. *Infect Immun* 2003;71:3116-3124.
131. Campbell PB, Palladino S, Flexman JP. Catheter-related septicemia caused by a vancomycin-resistant coryneform CDC group A-5. *Pathology* 1994;26:56-58.
132. Capita R, Alonso-Calleja C, Merghetti L, et al. Evaluation of the international phage typing set and some experimental phages for typing of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *J Appl Microbiol* 2002;92:90-96.
133. Carlson P. Comparison of the E test and agar dilution methods for susceptibility testing of *Arcanobacterium haemolyticum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:891-893.
134. Carlson P, Kontiainen S, Renkonen OV. Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium haemolyticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:142-143.
135. Carlson P, Korpela J, Walder M, Nyman M. Antimicrobial susceptibilities and biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum* blood isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:915-917.
136. Carretto E, Barbarini D, Poletti F, et al. *Bacillus cereus* fatal bacteremia and apparent association with nosocomial transmission in an intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 2000;32:98-100.
137. Casella P, Bosoni MA, Tommasi A. Recurrent *Corynebacterium aquaticum* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Newslett* 1988;10:62-63.
138. Castedo E, Castro A, Manin P, et al. *Bacillus cereus* prosthetic valve endocarditis. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2351-23452.
139. Cauci S, Driussi S, Monte R, et al. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:511-515.
140. Cauci S, Hitti J, Noonan C, et al. Vaginal hydrolytic enzymes, immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* toxin, and risk of early preterm birth among women in preterm labor with bacterial vaginosis or intermediate flora. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:877-881.
141. Cauci S, Monte R, Ropele M, et al. Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytotoxin. *Mol Microbiol* 1993;9:1143-1155.
142. Cauci S, Scrimin F, Driussi S, et al. Specific immune response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin in patients with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1601-1605.
143. Cauda R, Tamburrini E, Ventura G, Ortona L. Effective vancomycin therapy for *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* endocarditis. *South Med J* 1987;80:1598.
144. Cavendish J, Cole JB, Ohl CA. Polymicrobial central venous catheter sepsis involving a multiantibiotic-resistant strain of *Corynebacterium minutissimum*. *Clin Infect Dis* 1994;19:204-205.
145. Centers for Disease Control. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese—California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1985;34:357-359.
146. Centers for Disease Control. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1987;36:267-268.
147. Centers for Disease Control and Prevention. Update: foodborne listeriosis—United States, 1988-1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:251.
148. Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*—Terre Haute, Indiana, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:330-332.
149. Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Response Guide for Clinical Laboratories. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2002.
150. Centers for Disease Control and Prevention. Use of anthrax vaccine in response to terrorism: supplemental recommendations of the Advisory Committee on Immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1024-1026.
151. Chang J, Powles R, Mehta J, et al. Listeriosis in bone marrow transplant recipients: incidence, clinical features, and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;21:1289-1290.
152. Chiner E, Arriero JM, Signes-Costa J, et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi Arch Chest Dis* 1999;54:325-327.
153. Chirgwin K, Gleich S. *Listeria monocytogenes* osteomyelitis. *Arch Intern Med* 1989;149:931-932.
154. Chomarat M, Breton P, Dubost J. Osteomyelitis due to *Corynebacterium D2*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:43.
155. Chomarat M, Espinouse D. *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in patients with prolonged aplasia receiving ceftazidime-vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:44.
156. Chooromoney KN, Hampson DJ, Eamens JG, Turner MJ. Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994;32:371-376.
157. Chowdhury MNH, Desilva SK. Episiotomy wound infection due to *Gardnerella vaginalis*. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5:164-165.
158. Chowdhury MNH, Kambal AM. A case of conjunctivitis in a neonate due to *Gardnerella vaginalis*. *Trop Geogr Med* 1985;37:365-366.
159. Christenson JC, Byington C, Korgenski WK, et al. *Bacillus cereus* infections among oncology patients at a children's hospital. *Am J Infect Control* 1999;27:543-546.
160. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM Jr. Biological warfare: a historical perspective. *JAMA* 1997;278:412-417.
161. Chu WP, Que TL, Lee WK, Wong SN. Meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a neonate. *Hong Kong Med J* 2001;7:89-92.
162. Cintron JR, Del Pino A, Duarte B, Wood D. Abdominal actinomycosis. Report of two cases and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 1996;39:103-108.
163. Claeys G, Vanhouteghem H, Riegel P, et al. Endocarditis of native aortic and mitral valves due to *Corynebacterium accolens*: report of a case and application of phenotypic and genotypic techniques for identification. *J Clin Microbiol* 1996;34:1290-1292.
164. Clark AC, McLauchlin J. A simple colour test based on an alanyl peptidase reaction which differentiates *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. *J Clin Microbiol* 1997;35:2155-2156.
165. Clarke R, Qamruddin A, Taylor M, Panigrahi H. Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. *J Infect* 1999;38:126-127.
166. Clarridge JE III, Zhang Q. Genotypic diversity of clinical *Actinomyces* species: phenotype, source, and disease correlation among genospecies. *J Clin Microbiol* 2002;40:3442-3448.

163. Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1105-1139.
164. Collins MD. Reclassification of *Bacterionema matruchotii* (Mendal) in the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium matruchotii* comb. nov. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt Orig C 1983;3:399-400.
165. Collins MD, Bernard KA, Hutson A, et al. *Corynebacterium sundsvallense* sp. nov., from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1999;49:361-366.
166. Collins MD, Burton RA, Jones D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. FEMS Microbiol Lett. 1988;49:349-352.
167. Collins MD, Falsen E, Akervall E, et al. *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. Int J Syst Bacteriol 1998;48:1449-1454.
168. Collins MD, Hoyles L, Foster G, et al. *Corynebacterium capitovis* sp. nov., from a sheep. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:857-860.
169. Collins MD, Hoyles L, Hutson RA, et al. *Corynebacterium testudinoris* sp. nov., from a tortoise, and *Corynebacterium felinum* sp. nov., from a Scottish wild cat. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1349-1352.
170. Collins MD, Hoyles L, Kalfas S, et al. Characterization of *Actinomyces* isolates from infected root canals of teeth: description of *Actinomyces radicidentis*. J Clin Microbiol 2000;38:3399-3403.
171. Collins MD, Hoyles L, Lawson PA, et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. J Clin Microbiol 1999;37:3443-3447.
172. Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E. Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus muciloginosus* as *Rothia mucilaginosa* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50:1247-1251.
173. Collins MD, Jones D, Keddle RM, et al. Classification of some corynebacteria in a new genus *Aureobacterium*. Syst Appl Microbiol 1983;4:236-252.
174. Collins MD, Jones D, Schofield GM. Reclassification of "*Corynebacterium haemolyticum*" (MacLean, Liebow, and Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov. J Gen Microbiol 1982;128:1279-1281.
175. Collins MD, Stubbs S, Hommez J, Devriese LA. Molecular taxonomic studies of *Actinomyces*-like bacteria isolated from purulent lesions in pigs and description of *Actinomyces hyovaginalis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1993;43:471-473.
176. Collins MD, Wallbanks S, Lane D, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. Int J Syst Bacteriol 1991;41:240-246.
177. Colmegna I, Rodriguez-Barradas M, Rauch M, et al. Disseminated *Actinomyces meyeri* infection resembling lung cancer with brain metastases. Am J Med Sci 2003;326:152-155.
178. Colt HG, Morris JF, Marston BJ, Sewell DL. Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review. Rev Infect Dis 1991;13:73-76.
179. Cone LA, Curry N, Wuesthoff MA, et al. Septic synovitis and arthritis due to *Corynebacterium striatum* following an accidental scalpel injury. Clin Infect Dis 1998;27:1532-1533.
180. Come LA, Leung MM, Hirschberg J. *Actinomyces odontolyticus* bacteremia. Emerg Infect Dis 2003;9:1629-1632.
181. Connor JP, Buller RE. *Lactobacillus* sepsis with pelvic abscess. Gynecol Oncol 1994;54:99-100.
182. Connor MP, Green AD. Erysipeloid infection in a sheep farmer with coexisting orf. J Infect 1995;30:161-163.
183. Cook RL, Reid G, Pond DG, et al. Clue cells in bacterial vaginosis: immunofluorescent identification of the adherent gram-negative bacteria as *Gardnerella vaginalis*. J Infect Dis 1989;160:490-496.
184. Cooper CD, Vincent A, Greene JN, et al. *Lactobacillus* bacteremia in febrile neutropenic patients in a cancer hospital. Clin Infect Dis 1998;26:1247-1248.
185. Coudron PE, Harris RC, Vaughan MG, Dalton HP. Two similar but atypical strains of coryneform group A-4 isolated from patients with endophthalmitis. J Clin Microbiol 1985;22:475-477.
186. Coudron PE, Payne JM, Markowitz SM. Pneumonia and empyema infection associated with a *Bacillus* species that resembles *B. alvei*. J Clin Microbiol 1991;29:1777-1779.
187. Cowling P, Hall L. *Corynebacterium striatum*: a clinically significant isolate from sputum in chronic obstructive airway disease. J Infect 1993;26:335-336.
188. Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clin Microbiol Rev 1990;3:227-246.
189. Craig J, Grigor W, Doyle B, Arnold D. Pyelonephritis caused by *Corynebacterium minutissimum*. Pediatr Infect Dis J 1994;13:1151-1152.
190. Craig TJ, Maguire FE, Wallace MR. Tracheobronchitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. South Med J 1991;84:504-506.
191. Cristiano L, Coffetti N, Dalvai G, et al. Bacterial vaginosis: prevalence in outpatients, association with some microorganisms, and laboratory indices. Genitourin Med 1989;65:382-387.
192. Criswell BS, Stenback WA, Black SH, Gardner HL. Fine structure of *Haemophilus vaginalis*. J Bacteriol 1972;109:930-932.
193. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovi* infection in a patient with AIDS. J Infect 1994;28:89-91.
194. Curtis JR, Wing AJ, Coleman JC. *Bacillus cereus* bacteremia: a complication of intermittent haemodialysis. Lancet 1967;1:136-138.
195. Czajka J, Batt CA. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. J Clin Microbiol 1994;32:1280-1287.
196. Dai Z, Sirard J-C, Mock M, Koehler TM. The *atxA* gene product activates transcription of anthrax toxin genes and is essential for virulence. Mol Microbiol 1995;16:1171-1181.
197. Dall L, Barnes WG, Hurdford D. Septicaemia in a granulocytopenic patient caused by *Corynebacterium striatum*. Postgrad Med J 1989;65:247-248.
198. Dalton SB, Austin CA, Sobel J, et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N Engl J Med 1997;336:100-105.
199. Dan M, Somer I, Knobel B, Gutman R. Cutaneous manifestations of infection with *Corynebacterium* group JK. Rev Infect Dis 1988;10:1204-1207.
200. Dana A, Fader R, Sterken D. *Turicella otitidis* mastoiditis in a healthy child. Pediatr Infect Dis J 2001;20:84-85.
201. Dancer SJ, McNair D, Finn P, Kolsto AB. *Bacillus cereus* cellulitis from contaminated heroin. J Med Microbiol 2002;51:278-281.
202. Daneshvar MI, Hollis DG, Weyant RS, et al. Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigrians* Shukla et al. 2003 pro synonym. *Corynebacterium aurimucosum*. J Clin Microbiol 2004;42:4189-4198.
203. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol 2003;82:1-11.
204. Dass KN, Smith MA, Gill VJ, et al. *Brevibacterium* endocarditis: a first report. Clin Infect Dis 2002;35:e20-e21.
205. Davey RT, Tauber WB. Posttraumatic endophthalmitis: the emerging role of *Bacillus cereus* infection. Rev Infect Dis 1987;9:110-123.
206. De Arriba JJ, Blanch JJ, Mateos F, et al. *Corynebacterium striatum* first reported case of prosthetic valve endocarditis. J Infect 2002;44:193.
207. DeBriel D, Couderc F, Riegel P, et al. High-performance liquid chromatography of corynemycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related microorganisms. J Clin Microbiol 1992;30:1407-1417.
208. De Carpentier JP, Flanagan PM, Singh IP, et al. Nasopharyngeal *Corynebacterium ulcerans*: a different diphtheria. J Laryngol Otol 1992;106:824-826.
209. Decker CF, Simon GL, DiGioia RA, Tuazon CU. *Listeria monocytogenes* infections in patients with AIDS: report of five cases and review. Rev Infect Dis 1991;13:413-417.
210. Dee RR, Lorber B. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes*: case report and literature review. Rev Infect Dis 1986;8:968-977.
211. De Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. Curr Microbiol 1998;37:156-158.
212. De Miguel-Maninez I, Ramos-Macias A, Martin-Sanchez AM. Otitis media due to *Corynebacterium jeikeium*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:231-232.
213. Denoyal G-A, Drouet EB, De Montclos HP, et al. *Gardnerella vaginalis* bacteremia in a man with prostatic adenoma. J Infect Dis 1990;161:367-368.
214. Dent VE, Williams RA. *Actinomyces dentoclostris* Dent and Williams sp. nov.: a new species from the renal plaque of cattle. J Appl Microbiol 1984;56:183-192.
215. Dercksen DP, Brinkhof IM, Decker-Nooren T, et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Vet Microbiol 2000;75:167-175.
216. Dessau RB, Brandt-Christensen M, Jensen OJ, Tonnesen P. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. Eur Respir J 1995;8:651-653.
217. DeVega T, Echevarria S, Crespo J, et al. Acute hepatitis by *Listeria monocytogenes* in an HIV patient with chronic HBV hepatitis. J Clin Gastroenterol 1992;15:251-255.
218. Devriese LA, Riegel P, Hommez J, et al. Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the urogenital tracts of humans and pigs. J Clin Microbiol 2000;38:4657-4659.
219. DeZoysa A, Efstratiou A. Use of amplified fragment length polymorphisms for typing *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol 2000;38:3843-3845.
220. DeZoysa AS, Efstratiou A. PCR typing of *Corynebacterium diphtheriae* by random amplification of polymorphic DNA. J Med Microbiol 1999;48:335-340.
221. DeZoysa A, Efstratiou A, George RC, et al. Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from nonwestern Russia and surrounding countries studied by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1995;33:1080-1083.
222. Dickens A, Greven CM. Posttraumatic endophthalmitis caused by *Lactobacillus*. Arch Ophthalmol 1993;111:1169.
223. Dieckmann K-P, Henke R-P, Ovenbeck R. Renal actinomycosis mimicking renal carcinoma. Eur Urol 2001;39:357-359.
224. Digenis G, Dombros N, Devlin R, et al. Struvite stone formation by *Corynebacterium* group F1: a case report. J Urol 1992;147:169-170.
225. Dobinsky S, Noesselt T, Rucker A, et al. Three cases of *Arcanobacterium haemolyticum* associated with abscess formation and cellulitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:804-806.
226. Dobler G, Braveny I. Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as a cause of intravenous catheter-related infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:72-73.
227. Doganay M, Aydin N. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Scand J Infect Dis 1991;23:333-335.
228. Dominguez EA, Patil AA, Johnson WM. Ventriculoperitoneal shunt infection due to *Listeria monocytogenes*. Clin Infect Dis 1994;19:223-224.

228. Dominguez-Gil B, Herrero JC, Carreno A, et al. Ureteral stenosis secondary to encrustation by urea-splitting *Corynebacterium urealyticum* in a kidney transplant patient. *Nephrol Dial Transplant* 14;977-978, 1999.
229. Donzis PB, Mondino BJ, Weissman BA. *Bacillus* keratitis associated with contaminated contact lens care systems. *Am J Ophthalmol* 1988;105:195-197.
231. Dramsi S, Dehoux P, Lebrun M, et al. Identification of four new members of the internalin multigene family in *Listeria monocytogenes* strain EGD. *Infect Immun* 1997;65:1615-1625.
232. Drancourt M, Oules O, Bouche V, Peloux Y. Two cases of *Actinomyces pyogenes* infection in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:55-57.
233. Dubernet S, Desmasures N, Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:271-275.
234. Dufresne S, Bousquet J, Boissinot M, Guay R. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:1056-1064.
235. Dunbar SA, Claridge IE. Potential errors in recognition of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1302-1304.
236. Dunkelberg WE, Skaggs R, Kellogg DS Jr. Method for isolation and identification of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). *Appl Microbiol* 1970;19:47-52.
237. Dykhuizen RS, Douglas G, Weir J, Gould IM. *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. *Scand J Infect Dis* 1995;27:637-639.
238. Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, Sesardic D. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *J Clin Microbiol* 1998;36:3173-3177.
239. Elad D, Aizenberg I, Soriano F, Shlomovitz S. Isolation of *Corynebacterium* group D2 from two dogs with urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 1992;30:1167-1169.
240. Ellerbroek P, Kuipers S, Rozenberg-Arska M, et al. *Oerskovia xanthineolytica*: a new pathogen in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:503-505.
241. Ellis LC, Segreti J, Gitelis S, Hubert JF. Joint infections due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1995;20:1548-1550.
242. Elsner H-A, Sobottka I, Bubert A, et al. Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing lethal sepsis and meningitis in an adult hematologic patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:965-967.
243. Ena J, Berenguer J, Palaez T, Bouza E. Endocarditis caused by *Corynebacterium* group D2. *J Infect* 1991;22:95-111.
244. Engler KH, Efstratiou A. Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of corynebacteria. *J Clin Microbiol* 2000;38:1385-1389.
245. Engler KH, Efstratiou A, Nom D, et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol* 2002;40:80-83.
246. Engler KH, Glushkevich T, Mazurova IK, et al. A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35:495-498.
247. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1989;27:251-256.
248. Eschenbach DA, Hillier S, Critchlow C, et al. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:819-828.
249. Esteban J, Bueno J, Perez-Santonia JJ, Soriano F. Endophthalmitis involving an *Arthrobacter*-like organism following intraocular lens implantation. *Clin Infect Dis* 1996;23:1180-1181.
250. Esteban J, Nieto E, Caivo R, et al. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:518-521.
251. Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, et al. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Populus annua*, and reclassification of "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:371-380.
252. Ewert DP, Lieb L, Hayes PS, et al. *Listeria monocytogenes* infection and serotype distribution among HIV-infected persons in Los Angeles County, 1985-1992. *J Acquir Immune Defic Syndr and Human Retrovirol* 1995;8:461-465.
253. Ezell JH Jr, Many WJ Jr. *Gardnerella vaginalis*: an unusual case of pyogenic liver abscess. *Am J Gastroenterol* 1988;83:1409-1411.
254. Facinella B, Magi G, Prenna M, et al. *In vitro* extracellular and intracellular activity of two newer and two earlier fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:827-833.
255. Fairley KF, Birch DF. Unconventional bacteria in urinary tract disease: *Gardnerella vaginalis*. *Kidney Int* 1989;23:862-865.
256. Fairley KF, Birch DF. Detection of bladder bacteriuria in patients with acute urinary symptoms. *J Infect Dis* 1989;159:226-231.
257. Farchaus JW, Ribot WJ, Jendrek S, Little SF. Fermentation, purification, and characterization of protective antigen from a recombinant, avirulent strain of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:982-991.
258. Farina C, Arosio M, Mangia M, Moiola F. *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sepsis in a patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:251-252.
259. Farizo KM, Strebel PM, Chen RT, et al. Fatal respiratory disease due to *Corynebacterium diphtheriae*: case report and review of guidelines for management, investigation, and control. *Clin Infect Dis* 1993;16:59-68.
260. Farrar WE. Anthrax: virulence and vaccines. *Ann Intern Med* 1994;121:379-380.
261. Farrer W. Four-valve endocarditis caused by *Corynebacterium* CDC group 11. *South Med J* 1987;80:923-925.
262. Felten A, Barreau C, Bizet C, et al. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance, and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* 1999;37:729-733.
263. Fernandez-Ayala M, Nan DN, Farinas MC. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum* (letter). *Am J Med* 2001;111:1676.
264. Fernandez-Crespo P, Serra A, Bonet J, Gimenez M. Acute oliguric renal failure in a patient with an *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia and endocarditis. *Nephron* 1996;74:231.
265. Fernandez-Garayzabal JF, Collins MD, Hutson RA, et al. *Corynebacterium mastiditis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1082-1085.
266. Fernandez-Garayzabal JF, Collins MD, Hutson RA, et al. *Corynebacterium camporealensis* sp. nov., associated with subclinical mastitis in sheep. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:463-468.
267. Fernandez-Garayzabal JF, Eguido R, Vela AI, et al. Isolation of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from eagles. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1135-1138.
268. Fernandez-Giron F, Saavedra-Martin JM, Benitez-Sanchez M, et al. *Corynebacterium minutissimum* peritonitis in a CAPD patient. *Perit Dial Int* 1998;18:345-346.
269. Fernandez-Natal I, Guerra J, Alcoba M, et al. Bacteremia caused by multiply resistant *Corynebacterium urealyticum*: six case reports and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:514-517.
270. Ferraz V, McCarthy K, Smith D, Koornhof HJ. *Rothia dentocariosa* endocarditis and aortic root abscess. *J Infect* 1998;37:292-295.
271. Fidalgo SG, Longbottom CJ, Riley TV. Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. *Pathology* 2002;34:462-463.
272. Fiedler F. Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection* 1988;16(Suppl 2):S92-S97.
273. Finkelhor RS, Wolinsky E, Kim CH, et al. *Gardnerella vaginalis* perinephric abscess in a transplanted kidney. *N Engl J Med* 1981;304:846.
274. Fiorino A-S. Intrauterine contraceptive device-associated actinomycotic abscess and *Actinomyces* detection on cervical smear. *Obstet Gynecol* 1996;87:142-149.
275. Fischer RA, Peters G, Gehrmann J, Jurgens H. *Corynebacterium aquaticum* septicemia with acute lymphoblastic leukemia (letter). *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:836-837.
276. Fitter WF, DeSa DJ, Richardson H. Chorioamnionitis and funisitis due to *Corynebacterium kutscheri*. *Arch Dis Child* 1979;55:710-712.
277. Florez C, Muchada B, Nogales MC, et al. Bacteremia due to *Gardnerella vaginalis*; report of two cases. *Clin Infect Dis* 1994;18:125.
278. Ford JG, Yeatts RP, Givner LB. Orbital cellulitis, subperiosteal abscess, sinusitis, and septicemia caused by *Arcanobacterium haemolyticum*. *Am J Ophthalmol* 1995;120:261-262.
279. Fortina MG, Mora D, Schumann P, et al. Reclassification of *Sacharococcus caldolyx* as *Geobacillus caldolyx* (Ahmad et al. 2000 comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2063-2071).
280. Fortina MG, Pukall R, Schumann P, et al. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:447-455.
281. Frederiksen B. Maternal septicemia with *Listeria monocytogenes* in second trimester without infection of the fetus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71:313-315.
282. Freeman JD, Smith HG, Haines HG, Hellyar AG. Seven patient with respiratory infections due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Pathology* 1994;26:311-314.
283. Freney J, Duperron MT, Courtier C, et al. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29:38-71.
284. Fruchart C, Salah A, Gray C, et al. *Lactobacillus* species as emerging pathogens in neutropenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:681-684.
285. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. *In vitro* activity of gemifloxacin against contemporary clinical bacterial isolates from eleven North American medical centers, and assessment of disk diffusion test interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:243-253.
286. Fudouji R, Jojima Y, Seto A, et al. *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1127-1131.
287. Fujisawa T, Mori M. Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1127-1129.
288. Funke G, Alvarez N, Pascual C, et al. *Actinomyces europaeus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:687-692.
289. Funke G, Bernard KA, Bucher C, et al. *Corynebacterium glucuronolyticum* sp. nov. isolated from male patient with genitourinary infections. *Med Microbiol Lett* 1995;4:205-215.
290. Funke G, Carlotti A. Differentiation of *Brevibacterium* spp. encountered in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994;32:1729-1732.
291. Funke G, Efstratiou A, Kuklinska D, et al. *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. *J Clin Microbiol* 1997;35:1978-1983.
292. Funke G, Falsen E, Barreau C. Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC coryneform group A 1 and A-5 bacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:188-192.

293. Funke G, Haase G, Schnitzler N, et al. Endophthalmitis due to *Microbacterium* species: case report and review of microbacterium infections. *Clin Infect Dis* 1997;24:713-716.
294. Funke G, Hoyle L, Collins MD. *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., isolated from human blood cultures. In press.
295. Funke G, Hutson RA, Bernard KA, et al. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cummingsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1996;34:2356-2363.
296. Funke G, Hutson RA, Hillerlingmann M, et al. *Corynebacterium lipophiloflavum* sp. nov. isolated from a patient with bacterial vaginosis. *FEMS Microbiol Lett* 1997;15:219-224.
297. Funke G, Lawson PA, Bernard KA, Collins MD. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1124-1128.
298. Funke G, Lawson PA, Collins MD. Heterogeneity within human-derived Centers for Disease Control and Prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:735-739.
299. Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium multifaciens* sp. nov., an unusual specie from human clinical material. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:952-957.
300. Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium riegliei* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:624-627.
301. Funke G, Lucchini GM, Pfyffer GE, et al. Characteristics of CDC group 1 and group 1-like coryneform bacteria isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:2907-2912.
302. Funke G, Osorio CR, Frei R, et al. *Corynebacterium confusum* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1291-1296.
303. Funke G, Pagano-Niederer M, Bernauer W. *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J Clin Microbiol* 1998;36:3670-3673.
304. Funke G, Pagano-Niederer M, Sjoden B, Falsen E. Characteristic of *Arthrobacter cummingsii* the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1539-1543.
305. Funke G, Peters K, Aravena-Roman M. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. *J Clin Microbiol* 1998;36:2439-2442.
306. Funke G, Punter V, von Graevenitz A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2874-2878.
307. Funke G, Ramos C, Collins MD. Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and proposal of *Cellulomonas hominis* sp. nov. for some group A-3 strains. *Int J Syst Bacteriol* 1995;33:2091-2097.
308. Funke G, Ramos CP, Collins MD. *Corynebacterium coyleae* sp. nov., isolated from human clinical specimen. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:92-96.
309. Funke G, Ramos CP, Fernandez-Garayzabal JF, et al. Description of human-derived Centers for Disease Control coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:57-60.
310. Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *J Clin Microbiol* 1997;35:3122-3126.
311. Funke G, Stubbs S, Altweg M, et al. *Turicella otitidis* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium isolated from patients with otitis media. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:270-273.
312. Funke G, Stubbs S, Pfyffer GE, et al. Characteristics of CDC group 3 and group 5 coryneform bacteria isolated from clinical specimens and assignment to the genus *Dermabacter*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1223-1228.
313. Funke G, Stubbs S, von Graevenitz A, Collins MD. Assignment of human-derived CDC group 1 coryneform bacteria and CDC group 1-like coryneform bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces neuii* subsp. *neuii* sp. nov., subsp. nov., and *Actinomyces neuii* subsp. *anitratus* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:167-171.
314. Funke G, Von Graevenitz A. Infections due to *Actinomyces neuii* (former "CDC coryneform group 1" bacteria). *Infection* 1995;23:73-75.
315. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE III, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:125-159.
316. Funke G, von Graevenitz A, Weiss N. Primary identification of *Aureobacterium* spp. isolated from clinical specimens as *Corynebacterium aquaticum*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2686-2691.
317. Furman LM. Neonatal *Gardnerella vaginalis* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:890.
318. Gagne A, Chicoine M, Morin A, Houde A. Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from an aerobic digester of swine waste. *Can J Microbiol* 2001;47:908-915.
319. Gahrn-Hansen B, Frederiksen W. Human infections with *Actinomyces pyogenes*. (*Corynebacterium pyogenes*). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:349-354.
320. Gaillard JL, Berche P, Frehel C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by Internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991;65:1127-1141.
321. Gaillard JL, Jaubert P, Berche P. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. *J Exp Med* 1996;183:359-369.
322. Gallemore GH, Mohon RT, Ferguson DA. *Lactobacillus fermentum* endocarditis involving a native mitral valve. *J Tenn Med Assoc* 1995;88:306-308.
323. Garcia I, Fainstein V, McLaughlin P. *Bacillus cereus* meningitis and bacteremia associated with an Ommaya reservoir in a patient with lymphoma. *South Med J* 1984;77:928-929.
324. Garcia-Restoy E, Espejo E, Bella F, Llobet J. Bacteremia due to *Erysipelothrix rhusiopathiae* in immunocompromised hosts without endocarditis. *Rev Infect Dis* 1991;13:1252-1253.
325. Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Munoz Bellido L, et al. In vitro activity of 79 antimicrobial agents against *Corynebacterium* group D2. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2140-2143.
326. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as "nonspecific vaginitis." *Am J Obstet Gynecol* 1955;69:962-965.
327. Garduno E, Rebollo M, Asencio MA, et al. Splenic abscess caused by *Actinomyces meyeri* in a patient with autoimmune hepatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:213-214.
328. Garelick JM, Khodabakhsh AJ, Josephberg RG. Acute postoperative endophthalmitis caused by *Actinomyces neuii*. *Am J Ophthalmol* 2002;133:145-147.
329. Garrity GM, Holt JG. An overview of the road map to the manual. New York: Bergey's Manual Trust, 2000.
330. Gattermann S, Mitusch R, Djonlagic H, et al. Endocarditis caused by *Bacillus circulans*. *Infection* 1991;19:445.
331. Gaur AH, Patrick CC, McCullers JA, et al. *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. *Clin Infect Dis* 2001;32:1456-1462.
332. Gauto AR, Cone LA, Woodard DR, et al. Arterial infections due to *Listeria monocytogenes*: report of four cases and review of world literature. *Clin Infect Dis* 1992;14:23-28.
333. Gavin SE, Leonard RB, Briselden AM, Coyle MB. Evaluation of the Rapid Coryne identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *J Clin Microbiol* 1992;30:1692-1695.
334. Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, et al. The epidemiology of listeriosis in the United States, 1986. *Am J Epidemiol* 1991;133:392.
335. Giammanco GM, Di Marco V, Priolo I, et al. *Corynebacterium macginleyi* isolation from conjunctival swab in Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:205-207.
336. Giannakopoulos S, Alivizatos G, Deliveliotis C, et al. Encrusted cystitis and pyelitis. *Eur Urol* 2001;39:447-448.
337. Gibbs RS, Weiner MH, Walmer K, St. Clair PJ. Microbiologic and serologic studies of *Gardnerella vaginalis* in intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1987;70:187-190.
338. Gilot P, Genicot A, Andre P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996;34:1007-1010.
339. Gilot P, Hermans C, Yde M, et al. Sporadic case of listeriosis associated with the consumption of a *Listeria monocytogenes*-contaminated 'Camembert' cheese. *J Infect* 1997;35:195-197.
340. Gimenez M, Fernandez P, Padilla E, et al. Endocarditis and acute renal failure due to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;5:347-348.
341. Ginsburg AS, Salazar LG, True LD, Disis ML. Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia. *Am J Hematol* 2003;2:204-208.
342. Giovannaci I, Ragimbeau C, Queguiner S, et al. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE, and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int J Food Microbiol* 1999 53:127-140.
343. Girmenia C, Mauro FR, Rahimi S. Late listeriosis after fludarabine plus prednisone treatment. *Br J Haematol* 1994;87:407-408.
344. Golberg RL, Washington JA. Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from peptone-starch-dextrose agar and Columbia colistin-nalidixic acid agar. *J Clin Microbiol* 1976;4:245-247.
345. Goldberger AC, Lipsky BA, Plorde JJ. Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis* (*pseudotuberculosis*). *Am J Clin Pathol* 1981;76:486-490.
346. Goldstein B, Abrutyn E. Pseudo-outbreak of *Bacillus* species: related to fibreoptic bronchoscopy. *J Hosp Infect* 1985;6:194-200.
347. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, et al. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 gram-positive anaerobic and 31 corynebacterium clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:337-341.
348. Golledge CL, Phillips G. *Corynebacterium minutissimum* infection. *J Infect* 1991;23:73-76.
349. Golovacheva RS, Karavaiko GL. *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic sporulating bacteria. *Mikrobiologiya* 1978;8:15-22.
350. Gomez-Garcia JL, Oteo J, Garcia G, et al. Bacteremia by *Dermabacter hominis*, a rare pathogen. *J Clin Microbiol* 2001;39:2356-2357.
351. Gordon S, Singer C. *Listeria monocytogenes* cholecystitis. *J Infect Dis* 1986;154:918.
352. Goto K, Matsubara H, Mochida K, et al. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing o-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:109-113.
353. Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovi*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun* 1994;62:3550-3553.
354. Goyache J, Ballesteros C, Vela AI, et al. *Corynebacterium sphenisci* sp. nov. isolated from wild penguins. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1009-1012.
355. Goyache J, Vela AI, Collins MD, et al. *Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:43-46.
356. Granum PE. *Bacillus cereus* and its toxins. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 1996;70:61S-66S.
357. Granum PE, O'Sullivan K, Lund T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;177:225-229.

358. Graves LM, Swaminathan B, Reeves MW, et al. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:2936-2943.
359. Green SL, LaPeter KS. Pseudodiphtheritic membranous pharyngitis caused by *Corynebacterium haemolyticum*. *JAMA* 1981;245:2330-2331.
360. Greene KA, Clark RJ, Zabransky JM. Ventricular CSF shunt infections associated with *Corynebacterium jeikeium*: report of three cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:139-141.
361. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1980;30:170-178.
362. Greenwood JR, Pickett MJ. Genus *Gardnerella* Greenwood and Pickett 1980, 170. In: Sneath MHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1283-1286.
363. Greenwood JR, Pickett MJ, Manin WJ, Mack EG. *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginalis*): method for isolation and rapid biochemical identification. *Health Lab Sci* 1977;14:102-106.
364. Greig JR, Eltringham LJ, Birthistle K. Primary peritonitis due to *Lactobacillus fermentum*. *J Infect* 1998;36:242-243.
365. Greub G, Raoult D. "*Actinobaculum massiliae*" a new species causing chronic urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:3938-3941.
366. Griffiths JK, Daiy JS, Dodge RA. Two cases of endocarditis due to *Lactobacillus* species: antimicrobial susceptibility, review, and discussion of therapy. *Clin Infect Dis* 1992;15:250-255.
367. Groman N, Schiller J, Russell J. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from corynephage β and *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* 1984;45:511-517.
368. Groschup MH, Cussler K, Weiss R, Timoney JF. Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Epidemiol Infect* 1991;107:637-649.
369. Grove DI, Der-Haroutian V, Ratcliff RM. *Aureobacterium* masquerading as "*Corynebacterium aquaticum*" infection: case report and review of the literature. *J Med Microbiol* 1999;48:965-970.
370. Gruner E, Opravil M, Altwegg M, von Graevenitz A. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from intravenous drug users. *Clin Infect Dis* 1994;18:94-96.
371. Gruner E, Pfyffer GE, von Graevenitz A. Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:1408-1412.
372. Gruner E, Steigerwalt AG, Hollis DG, et al. Human infections caused by *Brevibacterium casei*, formerly CDC groups B-1 and B-3. *J Clin Microbiol* 1994;32:1511-1518.
373. Gruner E, Steigerwalt AG, Hollis DG, et al. Recognition of *Dermabacter hominis*, formerly CDC fermentative coryneform group 3 and group 5 as a potential human pathogen. *J Clin Microbiol* 1994;82:1918-1922.
374. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin Infect Dis* 1998;27:1295-1298.
375. Guillard F, Appelbaum PC, Sparrow FB. Pyelonephritis and septicemia due to gram-positive rods similar to *Corynebacterium* group E (aerotolerant *Bifidobacterium adolescentis*). *Ann Intern Med* 1980;92:635-636.
376. Gupta K, Stapleton AE, Hooton TM, et al. Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dis* 1998;178:446-450.
377. Guss WJ, Ament ME. *Oerskovia* infection caused by contaminated home parenteral nutrition solution. *Arch Intern Med* 1989;149:1457-1458.
378. Gutierrez-Rodero F, Ortiz de la Tabla V, Martinez C, et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: an easily missed respiratory pathogen in HIV-infect patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:209-216.
379. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, et al. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl):S116-S120.
380. Haggblom MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus* produced under various conditions. *Appl Env Microbiol* 2002;68:2479-2483.
381. Hall V, Collins MD, Hutson R, Falsen E, Duerden BI. *Actinomyces cardiffensis* sp. nov. from human clinical sources. *J Clin Microbiol* 2002;40:3427-3431.
382. Hall V, Collins MD, Hutson RA, et al. *Actinobaculum urinale* sp. nov., from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:679-682.
383. Hall V, Collins MD, Hutson R, et al. *Actinomyces vaccinae* sp. nov., from the jaw of a cow. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:603-606.
384. Hall V, Collins MD, Hutson RA, et al. *Actinomyces oricola* sp. nov., from a human dental abscess. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1515-1518.
385. Hall V, Collins MD, Hutson R, et al. *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1065-1068.
386. Hall V, Collins MD, Lawson PA, et al. *Actinomyces nasicola* sp. nov., isolated from a human nose. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1445-1448.
387. Hall V, Talbot PR, Stubbs SL, Duerden BI. Identification of clinical isolates of *Actinomyces* species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3555-3562.
388. Hambleton P, Turnbull PC. Anthrax vaccine development: a continuing story. *Adv Biotechnol Processes* 1990;13:105-122.
389. Hamilton-Miller JMT, Shah S. Susceptibility patterns of vaginal lactobacilli to eleven oral antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1059-1060.
390. Handwerker S, Pucci MJ, Volk KJ, et al. Vancomycin resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J Bacteriol* 1994;176:260-264.
391. Hanna P. Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;225:13-35.
392. Hanscom T, Maxwell WA. *Corynebacterium endophthalmitis*: laboratory studies and report of a case treated by vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 1979;97:500-502.
393. Harisdangkul V, Songcharoen S, Lin AC. Listerial infections in patients with systemic lupus erythematosus. *South Med J* 1992;85:957-960.
394. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis*, and related species. *J Clin Microbiol* 1995;33:1847-1850.
395. Harrington RD, Lewis CG, Aslanzadeh J, et al. *Oerskovia xanthineolytica* infection of a prosthetic joint: case report and review. *J Clin Microbiol* 1996;34:1821-1824.
396. Hatanaka A, Tsunoda A, Okamoto M, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1-4.
397. Haupt CL, Postel EA, Khawly JA. Posttraumatic endophthalmitis due to CDC coryneform group A-3 bacteria. *Retina* 2000;20:412-413.
398. Havaladar PV, Santhala CC. Diphtheria presenting as abdominal pain and arthralgia. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:538-539.
399. Hawes SE, Hillier SI, Benedetti J, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* 1996;74:1058-1063.
400. Hayek LJ. *Erysipelothrix* endocarditis affecting a porcine xenograft heart valve. *J Infect* 1993;7:203-204.
401. Hayes PS, Graves LM, Swaminathan B, et al. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. *J Food Prot* 1992;55:952-959.
402. Helgason E, Ostkdal OA, Caugant DA, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2627-2630.
403. Hellberg D, Nilsson S, Mardh PA. The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:11-15.
404. Hemady R, Zalts M, Paton B, et al. *Bacillus*-induced endophthalmitis: new series of 10 cases and review of the literature. *Br J Ophthalmol* 1990;74:26-29.
405. Hemsley C, Abraham S, Rowland-Jones S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a skin pathogen. *Clin Infect Dis* 1999;29:938-939.
406. Heimaiz C, Picardo A, Alos JJ, Gomez-Garcia JL. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:973-975.
407. Herra CM, McCafferty MT, Keane CT. The *in-vitro* susceptibilities of vaginal lactobacilli to four broad spectrum antibiotics as determined by agar dilution and E-test methods. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:775-783.
408. Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, et al. Proposal of *Virgibacillus proomii* sp. nov., and emended description of *Virgibacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950) Heyndrickx et al. 1998. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1083-1090.
409. Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, et al. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash, et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash, et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:270-279.
410. Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Scheldeman P, et al. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty, et al. 1986) Ash et al., 1994 is a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash, et al. 1994: emended description of *P. validus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:661-669.
411. Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Scheldeman P, et al. A polybasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco, et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and *P. peoriae*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:988-1003.
412. Heyman J, Logan NA, Busse HJ, et al. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov., and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus* as *Virgibacillus marismortui* comb. nov., and *Virgibacillus salicigenis* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:501-511.
413. Hill DC, Ghassemian JN. *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis: clinical features of an occupational disease. *South Med J* 1997;90:1147-1148.
414. Hilliard NJ, Schelonka RL, Waites KB. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *J Clin Microbiol* 2003;41:3441-3444.
415. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:455-459.
416. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, et al. The normal vaginosis flora H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993;16(Suppl 4):S273-S281.
417. Hillier SL, Martius J, Frohn M, et al. A case-control study of chorioamnionitis infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988;319:972-978.
418. Hirji Z, Saragosa R, Dedier H, et al. Contamination of bone marrow products with an actinomycete resembling *Microbacterium* species and reinfection into autologous stem cell and bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2003;36:e115-e121.
419. Hodge TW Jr, Levy CS, Smith MA. Disk space infection due to *Gardnerella vaginalis*. *Clin Infect Dis* 1995;21:443-445.
420. Hof H, Hefner P. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* 1988;16(Suppl. 2):S141-S144.
421. Hof N, Nichterlein T, Kretschmar M. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:345-357.
422. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th Ed. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

423. Holliman RE, Bone GP. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. *J Infect* 1988;16:279-283.
424. Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the toxin gene. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl):S156-S167.
425. Holst E. Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission. *J Clin Microbiol* 1990;28:2035-2039.
426. Holthouse DJ, Power B, Kermode A, Gollidge C. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: two cases and review of the literature. *J Infect* 1998;37:62-66.
427. Horwitch CA, Furseth HA, Larson AM, et al. Lactobacillemia in three patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;21:1460-1462.
428. Hou XG, Kawamura Y, Sultana F, et al. Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. nov., isolated from human urine. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:423-429.
429. Hoyles L, Falsen E, Foster G, Collins MD. *Actinomyces coleocanis* sp. nov., from the vagina of a dog. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1201-1203.
430. Hoyles L, Falsen E, Foster G, et al. *Actinomyces canis* sp. nov., isolated from dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1547-1551.
431. Hoyles L, Falsen E, Foster G, et al. *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:617-619.
432. Hoyles L, Falsen E, Holmstrom G, et al. *Actinomyces suimastitidis* sp. nov., isolated from pig mastitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1323-1326.
433. Hoyles L, Falsen E, Pascual C, et al. *Actinomyces catuli* sp. nov., from dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:679-682.
434. Hoyles L, Pascual C, Falsen E, et al. *Actinomyces marimammalium* sp. nov., from marine mammals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:151-156.
435. Hsu CL, Shih LY, Leu HS, et al. Septicemia due to *Arthrobacter* species in a neutropenic patient with acutelymphoblastic leukemia. *Clin Infect Dis* 1998;27:1334-1335.
436. Huang CJ, Huang TJ, Hsieh JS. Pseudo-colonic carcinoma caused by abdominal actinomycosis: report of two cases. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:286-286.
437. Huang KL, Beutler SM, Wang C. Endocarditis due to *Actinomyces meyeri*. *Clin Infect Dis* 1998;27:909-910.
438. Hudspeth MK, Gerardo SH, Citron DM, Goldstein EJ. Evaluation of the RapID CB Plus system for identification of *Corynebacterium* species and other grampositive rods. *J Clin Microbiol* 1998;36:543-547.
439. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL. *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis* 1997;25:1048-1055.
440. Hussain Z, Gonder JR, Lannigan R, Stoakes L. Endophthalmitis due to *Oerskovia xanthineolytica*. *Can J Ophthalmol* 1987;22:234-236.
441. Ieven M, Verhoeven J, Gentens P, Goossens H. Severe infection due to *Actinomyces bernardiae*: case report. *Clin Infect Dis* 1996;22:157-158.
442. Imada Y, Goto N, Ishikawa H, et al. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype Ia elicits protection against challenge with serotypes Ia and 2b in pigs. *Infect Immun* 1999;57:4376-4382.
443. Ingiani A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei R. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;18:61-66.
444. Isaacson JH, Grenko RT. *Rothia dentocariosa* endocarditis complicated by brain abscess. *Am J Med* 1988;84:352-354.
445. Ishikawa M, Ishizaki S, Yamamoto Y, Yamamoto K. *Paralobococcus ryukyuensis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, slightly halophilic, extremely halotolerant, facultative anaerobe isolated from a decomposing marine alga. *J Gen Appl Microbiol* 2002;48:269-279.
446. Izurieta HS, Strebel PM, Youngblood T, et al. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphthericum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria. *Emerg Infect Dis* 1997;3:65-68.
447. Jackman PHG, Pitcher DG, Pelczynska S, Borman P. Classification of corynebacteria associated with endocarditis (group JK) as *Corynebacterium jeikeium* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 1987;9:83-90.
448. Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Casatiya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett Appl Microbiol* 1995;21:103-105.
449. Janda WM, Bradna JJ, Ruther P. Identification of *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., and other fastidious gram-negative bacteria with the MicroScan Haemophilus-*Neisseria* identification panel. *J Clin Microbiol* 1989;27:869-873.
450. Janda WM, Malloy PJ, Schreckenberger PC. Clinical evaluation of the Vitek *Neisseria*-*Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol* 1987;25:37-41.
451. Janda WM, Tipirneni P, Novak RM. *Brevibacterium casei* bacteremia and line sepsis in an AIDS patient. *J Infect* 2003;46:61-64.
452. Janssen TL, van Heereveld HA, Laan RF, et al. Septic arthritis with *Listeria monocytogenes* during low-dose methotrexate. *J Intern Med* 1998;244:87-90.
453. Jayaraj K, Bisceglie AM, Gibson S. Spontaneous bacterial peritonitis caused by infection with *Listeria monocytogenes*: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1556-1558.
454. Jevon GP, Dunne WM, Hicks MJ, et al. *Bacillus cereus* pneumonia in premature neonates: a report of two cases. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:251-253.
455. Jian W, Zhu L, Dong X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1633-1638.
456. Johnson A, Hulse P, Oppenheim BA. *Corynebacterium jeikeium* meningitis and transverse myelitis in a neutropenic patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:473-479.
457. Johnson AP, Warner M, Malnick H, Livermore DM. Activity of the oxazolidinones AZD2563 and linezolid against *Corynebacterium jeikeium* and other *Corynebacterium* spp. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:745-747.
458. Johnson JL, Moore LVH, Kaneko B, Moore WEC. *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:273-286.
459. Jones D. Genus *Erysipelothrix* Rosenback 1909, 367. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1245-1249.
460. Jones D. The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection* 1988;16 (Suppl 2):S85-S88.
461. Jones D, Collins MD. Taxonomic studies on some human cutaneous coryneform bacteria: description of *Dermabacter hominis* gen. nov., sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* 1988;51:51-56.
462. Jones D, Keddie RM. Genus *Brevibacterium*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1301-1313.
463. Jones EM, MacGowan AP. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:165-175.
464. Jones N, Khoosal M. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in a neonate. *Clin Infect Dis* 1997;24:511.
465. Jones SD, Fullerton DA, Zamora MR, et al. Transmission of *Lactobacillus pneumoniae* by a transplanted lung. *Ann Thorac Surg* 1994;58:887-889.
466. Josephson S, Thomason JL, Sturino K, et al. *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract: incidence and significance in a hospital population. *Obstet Gynecol* 1988;71:245-250.
467. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, et al. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th Ed. Belmont, CA: Starr Publishing Company, 2002.
468. Joussem AM, Funke G, Joussem F, Herberich G. *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva-specific pathogen. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1420-1422.
469. Judson R, Songer JG. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet Microbiol* 1991;27:145-150.
470. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, et al. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1993;17:224-227.
471. Juurlink DN, Borczyk A, Simor AE. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:963-965.
472. Kabel PJ, Lorie CAM, Vos MC, Buiting AGM. Prosthetic hip-joint infection due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* 1995;20:1080-1081.
473. Kadirova R, Kartoglu HU, Strebel PM. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl):S110-S115.
474. Kailath EJ, Goldstein E, Wagner FH. Meningitis caused by *Oerskovia xanthineolytica*. *Am J Med Sci* 1988;295:216-217.
475. Kales CP, Holzman RS. Listeriosis in patients with HIV infection: clinical manifestations and response to therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3:139-143.
476. Kalfas S, Figdor D, Sundqvist C. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radicidentis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:208-214.
477. Kalima P, Masterton RG, Roddie PH, Thomas AE. *Lactobacillus rhamnosus* infection in a child following bone marrow transplantation. *J Infect* 1996;32:165-167.
478. Kandler O, Weiss N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1209-1234.
479. Kaplan A, Israel F. *Corynebacterium aquaticum* infection in a patient with chronic granulomatous disease. *Am J Med Sci* 1988;296:57-58.
480. Karpathios T, Drakonaki S, Zervoudaki A, et al. *Arcanobacterium haemolyticum* in children with presumed streptococcal pharyngotonsillitis or scarlet fever. *J Pediatr* 1992;121:735-737.
481. Karunasagar I, Kroehe G, Goebel W. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect Immun* 1993;61:162-169.
482. Kaufmann D, Ott P, Ruegg C. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. *Infection* 2002;30:168-170.
483. Yaukoranta-Tolvanen SSE, Sivonen A, Kostiala AAI, et al. Bacteremia caused by *Brevibacterium* species in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:801-804.
484. Kerr JR, Murphy PG, Doherty CC. *Corynebacterium* CDC group G1 infection in a patient receiving maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:559.
485. Kerr KG, Hawkey PM, Lacey RW. Evaluation of the API Coryne system for identification of *Listeria* species. *J Clin Microbiol* 1993;31:749-750.
486. Kerr KG, Rotowa NA, Hawkey PM, Lacey RW. Evaluation of the Mast ID and API 50CH systems for identification of *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:657-660.
487. Keslin MH, McCoy EL, McCusker JJ, Lutch JS. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. *Am J Med* 1978;64:228-231.
488. Kharsany ABM, Hoosen AA, Van Den Ende J. Antimicrobial susceptibilities of *Gardnerella vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2733-2735.
489. Kinnear W, MacFarlane J. A survey of thoracic actinomycosis. *Respir Med* 1990;84:57-59.
490. Kiuchi A, Hara M, Pham HS, et al. Phylogenetic analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* based upon 16S rRNA. *DNA Seq* 2000;11:257-260.
491. Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis* 1991;164:94-100.

482. Klein G, Zill E, Schindler R, Louwers J. Peritonitis associated with vancomycin-resistant *Lactobacillus rhamnosus* in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient: organism identification, antibiotic therapy, and case report. *J Clin Microbiol* 1998;36:1781-1783.
483. Kaenen R, Phan NG, Solomon T, et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheria. *Clin Infect Dis* 1998;27:845-850.
484. Kates KL, Holmes AH. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg Infect Dis* 2002;8:97-99.
485. Knudsen JD, Nielsen CJ, Espersen F. Treatment of shunt-related cerebral ventriculitis due to *Corynebacterium jeikeium* with vancomycin administered intraventricularly. *APMIS* 1994;102:317-320.
486. Ko S-B, Kim D-E, Kwon H-M, Roh J-K. A case of multiple brain infarctions associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. *Arch Neurol* 2003;60:434-436.
487. Kocks C, Gouin E, Tabouret M, et al. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 1992;68:521-531.
488. Koehler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J Bacteriol* 1994;176:586-595.
489. Kong R, Mebazaa A, Heitz B, et al. Case of triple endocarditis caused by *Rothia dentocariosa* and results of a survey in France. *J Clin Microbiol* 1998;36:309-310.
490. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* 2000;2:189-198.
491. Kotrajaras R, Togami H. *Corynebacterium pyogenes*: its pathogenic mechanism in epidemic leg ulcers in Thailand. *Int J Dermatol* 1987;26:45-50.
492. Krause A, Freeman R, Sisson PR, Murphy OM. Infection with *Bacillus cereus* after close-range gunshot injuries. *J Trauma* 1996;41:546-548.
493. Kristiansen FV, Frost L, Korsager B, Moller R. *Gardnerella vaginalis* in posthysterectomy infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;35:69-73.
494. Kristiansen FV, Oster S, Frost L, et al. Isolation of *Gardnerella vaginalis* in pure culture from the uterine cavity of patients with irregular bleedings. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:978-984.
495. Kumari P, Tyagi A, Marks P, Kerr KG. *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical patient. *J Infect* 1997;35:201-202.
496. Kumazawa N, Yanagawa R. DNA base composition of the three types of *Corynebacterium renale*. *Infect Immun* 1969;5:27-30.
497. Kwon YJ, Lee DY. *Corynebacterium aquaticum* peritonitis in a patient on CAPD. *Perit Dial Int* 1997;17:98-99.
498. Kwong KL, Que TL, Wong SN, So KT. Fatal meningoencephalitis due to *Bacillus anthracis*. *J Paediatr Child Health* 1997;33:539-541.
499. Laffineur K, Avesani V, Comu G, et al. Bacteremia due to a novel *Microbacterium* species in a patient with leukemia and description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2003;41:2242-2246.
500. LaForce FM. Anthrax. *Clin Infect Dis* 1994;19:1009-1013.
501. Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, et al. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:7-15.
502. Lair MI, Bentolila S, Grenet D, et al. *Oerskovia turbata* and *Comamonas acidovorans* bacteremia in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:424-426.
503. Lam MH, Birch DF, Fairley KF. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract. *J Clin Microbiol* 1988;26:1130-1133.
504. Lane HC, Fauci AS. Bioterrorism on the home front: a new challenge for American medicine. *JAMA* 2001;286:2595-2597.
505. Lanmerding AM, Glass KA, Gendron-Fitzpatrick, Doyle MP. Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3991-4000.
506. LaRocco M, Robinson C, Robinson A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* associated with suppurative lymphadenitis. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:79.
507. Larsson P, Lundin O, Falsen E. "*Corynebacterium aquaticum*" wound infection after high-pressure water injection into the foot. *Scand J Infect Dis* 1996;28:635-635.
508. LaScala B, Fournier PE, Musso D, Tissot-Dupont H. Pseudo-outbreak of listeriosis elucidated by pulsed-field gel electrophoresis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:756-760.
509. Latsios G, Petrogiannopoulos C, Hartzoulakis G, et al. Liver abscess due to *Bacillus cereus*: a case report. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1234-1237.
510. Lau SK, Woo PC, Woo GK, Yuen KY. Catheter-related *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2681-2685.
511. Lawrence D, Heitefuss S, Seifert HS. Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *J Clin Microbiol* 1991;29:1508-1512.
512. Lawson PA, Falsen E, Akervall E, et al. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratt) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaefferi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:899-903.
513. Lawson PA, Falsen E, Foster G, et al. *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:55-59.
514. Lawson PA, Nikolaitchouk N, Falsen E, et al. *Actinomyces funkei* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:853-855.
515. Lecuit M, Ohayon H, Braun L, et al. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 1997;65:5309-5319.
516. Lee W, Phillips LE, Carpenter RJ, et al. *Gardnerella vaginalis* chorioamnionitis: a report of two cases and a review of the pathogenic role of *G. vaginalis* in obstetrics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987;8:107-111.
517. Legrand JC, Alewaeters A, Leenaerts L, et al. *Gardnerella vaginalis* bacteremia from pulmonary abscess in a male alcohol abuser. *J Clin Microbiol* 1989;27:1132-1134.
518. Leighton PM, Bulleid B, Taylor R. Neonatal cellulitis due to *Gardnerella vaginalis*. *Pediatr Infect Dis J* 1982;1:339-340.
519. Leonard RB, Nowowiejski DJ, Warren JJ, et al. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. *J Clin Microbiol* 1994;32:164-169.
520. Lepargneur JP, Heller R, Soulie R, Riegel P. Urinary tract infection due to *Arcanobacterium bernardiae* in a patient with urinary tract diversion. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:399-401.
521. LeProwse CR, McNeil MM, McCarty IM. Catheter-related bacteremia caused by *Oerskovia turbata*. *J Clin Microbiol* 1989;27:571-572.
522. Lequerre T, Nouvellon M, Kraznowska K, et al. Septic arthritis due to *Actinomyces naeslundii*: report of a case. *Joint Bone Spine* 2002;9:499-501.
523. Lessing MP, Curtis GD, Bowler JC. *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.* 1994; 29:230-231.
524. Levett PN, Bennett P, O'Donoghue K, et al. Relapsed infection due to *Listeria monocytogenes* confirmed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J Infect* 1994;27:205-207.
525. Lewis RP, Sutter VL, Finegold SM. Bone infections involving anaerobic bacteria. *Medicine (Baltimore)* 1978;57:278-305.
526. Li A, Lal S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* keratitis and conjunctivitis: a report. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28:60-61.
527. Liaudet L, Erard P, Kaeser P. Cutaneous and muscular abscesses secondary to *Actinomyces meyeri* pneumonia. *Clin Infect Dis* 1996;22:185-186.
528. Lien EA, Hillier SL. Evaluation of the enhanced rapid identification method for *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989;27:566-567.
529. Lifshitz A, Arber N, Pras E, et al. *Corynebacterium* CDC group A-4 native valve endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:1056-1057.
530. Limaye AP, Perkins JD, Kowdley KV. Listeria infection after liver transplantation: report of a case and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1942-1944.
531. Limjoco-Antonio AD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Arcanobacterium haemolyticum* sinusitis and orbital cellulitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:465-467.
532. Lin HM, Tsui MS, Tu FC. Detection of *Gardnerella vaginalis* in the vagina and amniotic fluid using the polymerase chain reaction. *In J Obstet Gynecol* 2000;71: 221-222.
533. Lina B, Carloti A, Lesaint V, et al. Persistent bacteremia due to *Brevibacterium* species in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* 1994;18:487-488.
534. Lindgren P, Pla JC, Hogberg U, Tarnvik A. *Listeria monocytogenes*-induced liver abscess in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:486-488.
535. Litwin KA, Jadbabaie F, Villanueva M. Case of pleuropulmonary disease caused by *Actinomyces odonoliticus* that resulted in cardiac tamponade. *Clin Infect Dis* 1999; 29:219-220.
536. Liu PY, Ke SC, Chen SL. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J Clin Microbiol* 1997;35: 1533-1535.
537. Llopis F, Carratala J. Vertebral osteomyelitis complicating *Rothia dentocariosa* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:562-563.
538. Loeb M, Wilcox L, Thornley D, et al. *Bacillus* species pseudobacteremia following hospital construction. *Can J Infect Contr* 1995;10:37-40.
539. Logan NA, Berkeley RCW. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J Gen Microbiol* 1984;130:1871-1882.
540. Loiez C, Wallet F, Fruchart A, et al. *Turicella otitidis* in a bacteremic child with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:758-759.
541. Lopez R, Martino R, Brunet S, et al. Infection by *Listeria monocytogenes* in the early period post-bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 1994;53:251-252.
542. Lorber B. Listeriosis following shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991;13:865-866.
543. Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis* 1997;24:1-11.
544. Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, et al. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 1996;34:15-19.
545. Love DN, Vekselstein R, Collings S. The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal feline gingival margin. *Vet Microbiol* 1990;22:267-275.
546. Ludwig W, Kirchhoff G, Weizenegger M, Weiss N. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium suis* to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces suis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:161-165.
547. Lujan-Zilbermann J, Jones D, DeVincenzo J. *Oerskovia xanthineolytica* peritonitis: case report and review. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:738-739.
548. Lund NM, Messina JM, Swartz RD. Unusual causes of peritonitis in patients undergoing continuous peritoneal dialysis with emphasis on *Listeria monocytogenes*. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:1092-1097.
549. Lund T. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 1990;336:982-986.
550. Lund T, DeBuyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 2000;38:254-261.
551. Lund T, Granum PE. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* 1996;141:151-156.
552. Lutwick LJ, Rockhill RC. Abscess associated with *Rothia dentocariosa*. *J Clin Microbiol* 1978;8:612-613.
553. Lynch M, O'Leary J, Murnaghan ZD, Cryan B. *Actinomyces pyogenes* septic arthritis in a diabetic farmer. *J Infect* 1998;37:71-73.
554. MacGowan AP, Cartledge PHT, MacLeod F, MacLaughlin J. Maternal listeriosis in pregnancy without fetal or neonatal infection. *J Infect* 1991;22:53-57.

565. MacGowan AP, Reeves DS, Wright C, Glover C. Tricuspid valve infective endocarditis and pulmonary sepsis due to *Erysipelothrix rhusiopathiae* successfully treated with high doses of ciprofloxacin but complicated by gynaecomastia. *J Infect* 1991;22:100-101.
566. Machado LS, Sleasman JW, Ford MJ. *Bacillus* species infection of the skin as a presentation of severe combined immunodeficiency disease. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:285-287.
567. Mackenzie A, Fuite LA, Chan FTH, et al. Incidence and pathogenicity of *Arcanobacterium haemolyticum* during a 2-year study in Ottawa. *Clin Infect Dis* 1995;21:177-181.
568. Mackinnon MM, Amezaga MR, Mackinnon JR. A case of *Rothia dentocariosa* endophthalmitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:756-757.
569. Madgwick PJ, Waley SG. β -Lactamase I from *Bacillus cereus*. *Biochem J* 1987;37:10173-10180.
570. Maguire JD, McCarthy MC, Decker CF. *Oerskovia xanthineolytica* bacteremia in an immunocompromised host: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;22:554-556.
571. Makinen KK, Makinen PL. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain Soc 67). *J Biol Chem* 1998;262:12488-12495.
572. Makino S, Okada Y, Maruyama T, et al. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:1526-1531.
573. Makino S-I, Uchida I, Terakado N, et al. Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1989;171:722-730.
574. Malanoski GJ, Parker R, Eliopoulos GM. Antimicrobial susceptibilities of a *Corynebacterium* CDC group 12 strain isolated from a patient with endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1329-1331.
575. Mallon E, McKee PH. Extraordinary case report: cutaneous anthrax. *Am J Dermatopathol* 1997;19:79-82.
576. Mann C, Dertinger S, Hartmann G, et al. *Actinomyces neuii* and neonatal sepsis. *Infection* 2002;30:178-180.
577. Manzella IP, Kellogg JA, Parsey KS. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clin Infect Dis* 1995;20:37-40.
578. Maple PAC, Efstratiou A, Tseneva G, et al. The *in-vitro* susceptibilities of toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in northwestern Russia and surrounding areas to ten antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:1037-1040.
579. Marley EF, Saini NK, Venkatraman C, Orenstein JM. Fatal *Bacillus cereus* meningoenzephalitis in an adult with acute myelogenous leukemia. *South Med J* 1995;88:969-972.
580. Marshman LA, Hardwidge C, Donaldson PM. *Bacillus cereus* meningitis complicating cerebrospinal fluid fistula repair and spinal drainage. *Br J Neurosurg* 2000;14:580-582.
581. Marston CK, Jamieson F, Cahoon F, et al. Persistence of a distinct *Corynebacterium diphtheriae* clonal group within two communities in the United States and Canada where diphtheria is endemic. *J Clin Microbiol* 2001;39:1586-1590.
582. Martinez-Martinez L, Joyanes P, Suarez AI, Perea EJ. Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2390-2392.
583. Martinez-Martinez L, Ortega MC, Suarez AI. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:1318-1321.
584. Martinez-Martinez L, Pascual A, Suarez AI, Perea EJ. *In vitro* activity of levofloxacin, ofloxacin, and D-ofloxacin against coryneform bacteria and *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43(Suppl C):27-32.
585. Martinez-Martinez L, Suarez AI, Rodriguez-Bano J, et al. Clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from human samples. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:634-639.
586. Martinez-Martinez L, Suarez AI, Winstanley J, et al. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995;33:2458-2461.
587. Mascola L, Sorvillo F, Goulet V, et al. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*: observations during a community-wide, common-source outbreak. *Clin Infect Dis* 1992;15:557-558.
588. Mascola L, Sorvillo F, Lashley N, Steinberg E. Fatal listeria meningitis in an immunocompromised infant: therapeutic implications. *J Infect* 1991;23:287-291.
589. Matar GM, Slieman TA, Nabbut NH. Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction. *Eur J Epidemiol* 1996;12:309-314.
590. Matsubara H, Goto K, Matsumura T, et al. *Alicyclobacillus acidophilus* sp. nov., a novel thermacidophilic o-allylcyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1681-1685.
591. Mazzulli T, Salit IE. Pleural fluid infection caused by *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:564-570.
592. McBride BW, Moggs A, Telfer JL, et al. Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* 1998;16:810-817.
593. McBride ME, Ellner KM, Black HS, et al. A new *Brevibacterium* sp. isolated from infected genital hair of patients with white piedra. *J Med Microbiol* 1993;39:255-261.
594. McCambridge MM, Vogelgesang SA, Ockenhouse CF, et al. *Listeria monocytogenes* infection in a patient treated with methotrexate for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:786-787.
595. McCaughey C, Damani NN. Central venous line infection caused by *Brevibacterium epidermidis*. *J Infect* 1991;23:211-212.
596. McDonald CL, Chapin-Robertson K, Dill SR, Martino RL. *Oerskovia xanthineolytica* bacteremia in an immunocompromised patient with pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:259-261.
597. McDowell DRM, Buchanan JD, Fairley KF, Gilbert GL. Anaerobic and other fastidious microorganisms in asymptomatic bacteriuria in pregnant women. *J Infect Dis* 1982;44:114-122.
598. McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd K. Phospholipase C activity in microorganisms associated with reproductive tract infection. *Am Obstet Gynecol* 1991;164:682-686.
599. McLauchlin J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985: a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol Infect* 1990;104:181-189.
600. McLauchlin J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985: a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect* 1990;104:191-201.
601. Melero-Bascones M, Munoz P, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. *Corynebacterium striatum*: an undescribed agent of pacemaker-related endocarditis. *Clin Infect Dis* 1996;22:576-577.
602. Mengaud H, Ohayon H, Gounon P, et al. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996;84:923-932.
603. Merle-Melet M, Dossou-Glete L, Maurer P, et al. Is amoxicillin-cotrimoxazole the most appropriate antibiotic regimen for listeria meningoenzephalitis? Review of 22 cases and the literature. *J Infect* 1996;33:79-85.
604. Messina OD, Maldonado-Cocco JA, Pescio A, et al. *Corynebacterium kutscheri* septic arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:1053.
605. Mikamo H, Sato Y, Hayasaka I, et al. Vaginal microflora in healthy women with *Gardnerella vaginalis*. *Infect Chemother* 2000;6:173-177.
606. Mikhailovich VM, Melnikov G, Mazurova IK, et al. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. *J Clin Microbiol* 1995;33:3061-3063.
607. Mikkola R, Saris NEL, Grigoriev PA, et al. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cerulide, the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem* 1999;263:112-117.
608. Mills AE, Mitchell RD, Lim EK. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotizing granulomatous lymphadenitis. *Pathology* 1997;29:231-233.
609. Miller PH, Wiggs LS, Miller JM. Evaluation of API An-IDENT and RapID ANA II systems for identification of *Actinomyces* species from clinical specimens. *Clin Microbiol* 1995;33:329-330.
610. Minato K, Abiko Y. β -lactam antibiotic-resistant *Rothia dentocariosa* from infected postoperative maxillary cyst: studies on R-plasmid and β -lactamase. *Gen Pharmacol* 1984;15:287-292.
611. Miyake T, Watanabe K, Watanabe T, Oyaizu H. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol Immunol* 1998;42:661-667.
612. Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:647-671.
613. Molin G, Jeppsson B, Johansson ML, et al. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J Appl Bacteriol* 1993;74:314-323.
614. Moore C, Norton R. *Corynebacterium aquaticum* septicaemia in a neutropenic patient. *Clin Pathol* 1995;48:971-972.
615. Moore LS, Schneider B, Holloway WJ. Minimal inhibitory concentrations and minimal bactericidal concentrations of quinupristin/dalfopristin against clinical isolates of *Corynebacterium jeikeium* and *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39(Suppl A):67-68.
616. Moore MS, Parsons EI. A study of modified Tinsdale medium for the primary isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Dis* 1958;102:88-93.
617. Mori T, Tokuhira M, Takae Y, et al. Successful non-surgical treatment of brain abscess and necrotizing fasciitis caused by *Bacillus cereus*. *Intern Med* 2002;41:671-673.
618. Morris A, Guild I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Rev Infect Dis* 1991;13:887-892.
619. Mothershead EA, Cassidy PK, Pierson K, et al. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *Clin Microbiol* 2002;40:2713-2719.
620. Musa MO, Al Douri M, Khan S, et al. Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three cases. *Infect* 1999;39:154-156.
621. Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:313-336.
622. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol* 1997;35:1651-1655.
623. Nakao H, Popovic T. Use of random amplified polymorphic DNA for rapid molecular typing of *Corynebacterium diphtheriae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:167-172.
624. Nakato H, Shinomiya K, Mikawa H. Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to cultured rat aortic endothelial cells: role of bacterial neuraminidase in the induction of arteritis. *Pathol Res Pract* 1987;182:255-260.
625. Namnyak SS, Blair AL, Hughes DF, et al. Fatal lung abscess due to a *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Thorax* 1992;47:666-667.
626. National Committee for Clinical Laboratory Standards. MIC Testing Supplemental Tables M100-S13 (M7). Wayne, PA: NCCLS, 2003.
627. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and

- Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus* *searothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. searothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, and *G. thermodenitrificans*. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:433-446.
628. Nebreda-Mayoral T, Munoz-Bellido JL, Garcia-Rodriguez JA. Incidence and characteristics of urinary tract infections caused by *Corynebacterium urealyticum*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:600-604.
629. Neubauer M, Sourek I, Ryc M, et al. *Corynebacterium accolens* sp. nov., a gram-positive rod exhibiting satellitism, from clinical maternal. Syst Appl Microbiol 1991;14:46-51.
630. Neumeister B, Mandel T, Gruner E, Pfyffer GE. *Brevibacterium* species as a cause of osteomyelitis in a neonate. Infection 1993;21:177-178.
631. Niamut SM, van der Vorm ER, van Luyn-Wiegers CG, Gokemeijer ID. *Oerskovia xanthineolytica* bacteremia in an immunocompromised patient without a foreign body. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:274-275.
632. Nielsen P, Rainey FA, Outtrup FA, et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. FEMS Microbiol Lett 1994;117:61-66.
633. Nielsen PB, Koch C, Friss H, et al. Double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol 1987;25:1280-1284.
634. Nieto E, Vindel A, Valero-Guillen PL, et al. Biochemical, antimicrobial susceptibility, and genotyping studies on *Corynebacterium urealyticum* isolates from diverse sources. J Med Microbiol 2000;49:759-763.
635. Nightingale LM, Eaton CB, Fruehan AE, et al. Cephalohematoma complicated by osteomyelitis presumed due to *Gardnerella vaginalis*. JAMA 1996;256:1936-1937.
636. Nikolaichouk N, Hoyle L, Falsen E, et al. Characterization of *Actinomyces* isolates from samples from the human urogenital tract: description of *Actinomyces urogenitalis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50:1649-1654.
637. Nimura Y, Koh E, Yanagida F, et al. *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinones, and catalase. Int J Syst Bacteriol 1990;40:297-301.
638. Ninet B, Bannerman E, Bille J. Assessment of the AccuProbe *Listeria monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths. Appl Environ Microbiol 1992;58:4055-4059.
639. Nivar-Aristy RA, Krajewski LP, Washington JA. Infection of an arteriovenous fistula with *Rothia dentocariosa*. Diagn Microbiol Infect Dis 1991;14:167-169.
640. Nocera D, Altwegg M, Martinetti-Lucchini G, et al. Characterization of *Listeria* strains from a foodborne listeriosis outbreak by rDNA gene restriction patterns, compared to four other typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:162-169.
641. Nolte FS, Arnold KE, Sweat H, et al. Vancomycin-resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukemia. J Clin Microbiol 1996;34:1992-1994.
642. Norris PR, Clark DA, Owen JP, Waterhouse SW. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. Microbiology 1996;142:775-783.
643. Noskin GA, Suriano T, Collins S, et al. *Paenibacillus macerans* pseudobacteremia resulting from contaminated blood culture bottles in a neonatal intensive care unit. Am J Infect Control 2001;29:126-129.
644. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991;29:297-301.
645. Obata-Yasuoka, Ba-Thein W, Hamada HG, Hayashi H. A multiplex polymerase chain reaction-based diagnostic method for bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 2002;100:759-764.
646. Oberreuter H, Seiler H, Scherer S. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:91-100.
647. O'Donnell AG, Minnikin DE, Goodfellow M, Piot P. Fatty acid, polar lipid and wall amino acid composition of *Gardnerella vaginalis*. Arch Microbiol 1984;138:68-71.
648. Ogunc D, Gultekin M, Colak D, et al. Bacteremia caused by *Brevibacterium* species in a patient with chronic lymphocytic leukemia. Haematologia 2002;32:151-153.
649. Ohl C, Tribble DR. *Corynebacterium* group D2 infection of a complex renal cyst in a debilitated patient. Clin Infect Dis 1992;14:1160-1161.
650. Ojeda-Vargas M, Gonzalez-Fernandez MA, Romero D, et al. Pericarditis caused by *Corynebacterium urealyticum*. Clin Microbiol Infect 2000;6:560-561.
651. Okwumabua O, Swaminathan B, Edmonds P, et al. Evaluation of a chemiluminescent DNA probe assay for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes*. Res Microbiol 1992;143:183-189.
652. Olson ME, Goemans I, Bolingbroke D, Lundberg S. Gangrenous dermatitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in Richardson ground squirrels. J Am Vet Med Assoc 1993;193:367-368.
653. Orellano EG, Girardini JE, Cricco JA, et al. Spectroscopic characterization of a bio-nuclear metal site in *Bacillus cereus* β -lactamase II. Biochemistry 1998;27:10173-10180.
654. Orrett FA. Fatal *Bacillus cereus* bacteremia in a patient with diabetes. J Natl Med Assoc 2000;2:206-208.
655. Paillard D, Dubois V, Duran R, et al. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments. Appl Environ Microbiol 2003;69:6386-6392.
656. Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH, Efstratiou A. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. J Clin Pathol 1994;47:353-356.
657. Pang DK, Abdalla M. Osteomyelitis of the foot due to *Actinomyces meyeri*: a case report. Foot Ankle 1987;8:169-171.
658. Pao CC, Lin SS, Hsieh TT. The detection of *Gardnerella vaginalis* DNA sequences in uncultured specimens with cloned *G. vaginalis* DNA as probes. Mol Cell Probes 1990;4:367-373.
659. Parida SK, Domann E, Rohde M, et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. Mol Microbiol 1998;28:81-93.
660. Parola P, Maurin M, Alimi Y, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing to identify *Lactobacillus casei* in septicemia secondary to a paraprosthetic enteric fistula. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:203-205.
661. Pascual C, Collins MD. *Brevibacterium avium* sp. nov., isolated from poultry. Int J Syst Bacteriol 1999;49:1527-1530.
662. Pascual C, Collins MD, Funke G, Pitcher DG. Phenotypic and genotypic characterization of two *Brevibacterium* strains from the human ear: description of *Brevibacterium otitis* sp. nov. Med Microbiol Lett 1996;5:113-123.
663. Pascual C, Foster G, Alvarez N, Collins MD. *Corynebacterium phocae* sp. nov., isolated from the common seal (*Phoca vitulina*). Int J Syst Bacteriol 1998;48:601-604.
664. Pascual C, Foster G, Falsen E, et al. *Actinomyces bowdenii* sp. nov., isolated from canine and feline clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 1999;49:1873-1877.
665. Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol 1995;45:724-728.
666. Patel R. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. FEMS Microbiol Lett 2000;185:1-7.
667. Patel R, Cockrell FR, Porayko MK, et al. Lactobacillemia in liver transplant patients. Clin Infect Dis 1994;18:207-212.
668. Patey O, Bimet F, Riegel P, et al. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. Coryne Study Group. J Clin Microbiol 1997;35:441-445.
669. Paul ML, Dwyer DE, Chow C, et al. Listeriosis: a review of eighty-four cases. Med J Aust 1994;160:489-493.
670. Paviour S, Musaad S, Roberts S, et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. Clin Infect Dis 2002;35:1434-1440.
671. Paziak-Domanska B, Boguslawska E, Wiecekowska-Szakiel M, et al. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. FEMS Microbiol Lett 1999;171:209-214.
672. Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. Clin Infect Dis 1997;24:185-191.
673. Peiris V, Fraser S, Knowles C, et al. Isolation of *Corynebacterium striatum* from three hospitalized patients (letter). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:36-38.
674. Pejaver RK, Watson AH, Mucklow ES. Neonatal cross-infection with *Listeria monocytogenes*. J Infect 1993;26:301-303.
675. Pelle G, Makrai L, Fodor L, et al. Actinomycosis in dogs caused by *Actinomyces hordeovulneris*. J Comp Pathol 2000;123:72-76.
676. Penn CC, Klotz SA. Anthrax pneumonia. Semin Respir Infect 1997;12:28-30.
677. Pennkamp A, Punter V, Zbinden R. Disk diffusion, agar dilution, and the E-test for susceptibility testing of *Corynebacterium jeikeium*. Clin Microbiol Infect 1996;2:209-213.
678. Perrin M, Berner M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. J Clin Microbiol 2003;41:5308-5309.
679. Petit PLC, Bok W, Thompson J, et al. Native-valve endocarditis due to CDC coryneform group ANF-3: report of a case and review of corynebacterial endocarditis. Clin Infect Dis 1994;19:897-901.
680. Philippon P, Bimet F. *In vitro* susceptibility of *Corynebacterium* group D2 and *Corynebacterium jeikeium* to twelve antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:892-895.
681. Pinedo S, Bos AJ, Siebert CE. Relapsing *Bacillus cereus* peritonitis in two patients on peritoneal dialysis. Perit Dial Int 2002;22:424-426.
682. Pinna A, Sechi LA, Zanetti S, et al. *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. Ophthalmology 2001;108:1830-1834.
683. Pinner RW, Schuchat A, Swaminathan B, et al. Role of food in sporadic listeriosis: II. Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA 1992;267:2046-2050.
684. Pionkowski MD, Shivers DW. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. J Am Vet Med Assoc 1998;212:1765-1768.
685. Piot P, Van Dyck E, Peeters M, et al. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol 1984;20:677-679.
686. Pitcher D, Soto A, Soriano F, Valero-Guillen P. Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1992;42:178-181.
687. Poilane I, Fawaz F, Nathanson M, et al. *Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child: a case report. Eur J Pediatr 1995;154:381-383.
688. Popova NA, Nikolaev IA, Turova TP, et al. *Geobacillus uraticus*, a new species of thermophilic bacteria. Mikrobiologia 2002;71:391-398.
689. Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossa P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect Immun 1992;60:1263-1267.
690. Portnoy DA, Tweten RK, Kehoe M, Bielecki J. Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. Infect Immun 1992;60:2710-2717.
691. Pot B, Hertel C, Ludwig W, et al. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotide probe hybridization. J Gen Microbiol 1993;139:513-517.

692. Pourshaban M, Gianfranceschi M, Gattuso A, et al. Identification of *Listeria monocytogenes* contamination sources in two fresh sauce production plants by pulsed-field gel electrophoresis. *Food Microbiol* 2000;17:393-400.
693. Power EG, Abdulla YH, Talsania HG, et al. *VanA* genes in vancomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium* (*Corynebacterium*) *haemolyticum*. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:595-606.
694. Poyart C, Abachin E, Razafimanantsoa I, Berche P. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 1993;61:1576-1580.
695. Psiachou-Leonard E, Sidi V, Tsivitanidou M, et al. Brain abscesses resulting from *Bacillus cereus* and an *Aspergillus*-like mold. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:569-571.
696. Puleo JA, Shammass NW, Kelly P, Allen M. *Lactobacillus* isolated pulmonic valve endocarditis with ventricular septal defect detected by transesophageal echocardiography. *Am Heart J* 1994;128:1248-1250.
697. Pulverer G, Schutt-Gerowitt H, Schaal KP. Human cervicofacial actinomycoses: microbiological data for 1997. *Clin Infect Dis* 2003;37:490-497.
698. Putnins EE, Bowden GH. Antigenic relationships among oral *Actinomyces* isolates. *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2, *Actinomyces howellii*, *Actinomyces denticolens*, and *Actinomyces slackii*. *J Dent Res* 1993;72:1374-1385.
699. Querol-Borras JM, Manresa F, Barbe F, Císal M. Lactobacilli and pleuropulmonary infection. *Eur Resp J* 1989;2:1021.
700. Quinn AG, Comaish JS, Pedler SJ. Septic arthritis and endocarditis due to group G-2 coryneform organism. *Lancet* 1991;338:62-63.
701. Radtke A, Bergh K, Oien CM, Bevanger LS. Peritoneal dialysis-associated peritonitis caused by *Dermabacter hominis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3420-3421.
702. Rainey FA, Fritze D, Stackebrandt E. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:205-212.
703. Rainey FA, Weiss N, Stackebrandt E. Phylogenetic analysis of the genera *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, and *Jonesia* and proposal to exclude the genus *Jonesia* from the family *Cellulomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;45:649-652.
704. Ramos CP, Falsen E, Alvarez N, et al. *Actinomyces graevenitzii* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:885-888.
705. Ramo CP, Foster C, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:46-53.
706. Ramos CP, Lawson PA, Farrow JAE, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:724-728.
707. Razavi B, Schilling M. Chondritis attributable to *Lactobacillus* after ear piercing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:75-76.
708. Razzi L, Sanchez MR. Progressively enlarging painful annular plaque on the hand. *Erysipeloid*. *Arch Dermatol* 1994;130:1314-1315.
709. Reboli AC, Farrar WE. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:354-359.
710. Reddy CA, Cornell CP, Fraga AM. Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:419-429.
711. Reddy GS, Prakash JS, Srinivas R, et al. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* species nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:977-984.
712. Reimer LG, Reller LB. *Gardnerella vaginalis* bacteremia: a review of thirty cases. *Obstet Gynecol* 1984;64:170-172.
713. Reimer LG, Reller LB. Effect of sodium polyanethol sulfonate and gelatin on the recovery of *Gardnerella vaginalis* from blood culture media. *J Clin Microbiol* 1985;21:686-688.
714. Reinert RR, Schnitzler N, Haase G, et al. Recurrent bacteremia due to *Brevibacterium casei* in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1082-1085.
715. Reller LB, Maddoux GL, Eckman MR, Pappas G. Bacterial endocarditis caused by *Oerskovia turbata*. *Ann Intern Med* 1975;83:664-666.
716. Renaud PN, Aubel D, Riegel P, et al. *Corynebacterium freneyi* sp. nov., α -glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1723-1728.
717. Renaud FN, Dutaur M, Daoud S, et al. Differentiation of *Corynebacterium amycolum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *J Clin Microbiol* 1998;36:3698-3702.
718. Renaud FNR, Gregory A, Barreau C, et al. Identification of *Turicella otitidis* isolated from a patient with otorrhea associated with surgery: differentiation from *Corynebacterium afermentans* and *Corynebacterium auris*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2625-2627.
719. Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1361-1371.
720. Reva ON, Yunitskaya VA, Resnick SR, et al. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:409-411.
721. Reynolds SJ, Behr M, McDonald J. *Turicella otitidis* as a unusual agent causing a posterior auricular abscess. *J Clin Microbiol* 2001;39:1672-1673.
722. Ricaurte JC, Klein O, LaBombardi V, et al. *Rothia dentocariosa* endocarditis complicated by multiple intracranial hemorrhages. *South Med J* 2001;94:438-440.
723. Richardson AJ, Rothburn MM, Roberts C. Pseudo-outbreak of *Bacillus* species: related to fibreoptic bronchoscopy. *J Hosp Infect* 1986;7:208-210.
724. Riedo FX, Pinner RW, Tosca MD, et al. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis* 1994;170:693-696.
725. Riegel P, DeBriel D, Prevost G, et al. Proposal of *Corynebacterium propinquum* sp. nov. for *Corynebacterium* group ANF-3 strains. *FEMS Microbiol Lett* 1993;113:229-234.
726. Riegel P, DeBriel D, Prevost G, Jehl P, Monteil H, Minck R, et al. Taxonomic study of *Corynebacterium* group ANF-1 strains: proposal of *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subspecies *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:287-292.
727. Riegel P, Grimont PAD, DeBriel D, et al. *Corynebacterium* group D2 ("*Corynebacterium urealyticum*") constitutes a new genomic species. *Res Microbiol* 1992;143:307-313.
728. Riegel P, Heller R, Prevost G, et al. *Corynebacterium durum* sp. nov., from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1107-1111.
729. Riegel P, Ruimy R, Christen R, Monteil H. Species identification and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:657-662.
730. Riegel P, Ruimy R, DeBriel D, et al. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov., nom. rev. *FEMS Microbiol Lett* 1995;126:271-276.
731. Riegel P, Ruimy R, DeBriel D, et al. Genomic diversity and phylogenetic relationships among lipid-requiring diphtheroids from humans and characterization of *Corynebacterium macginleyi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:128-133.
732. Riegel P, Ruimy R, DeBriel D, et al. *Corynebacterium argentoratense* sp. nov., from the human throat. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:533-537.
733. Riegel P, Ruimy R, DeBriel D, et al. *Corynebacterium seminale* sp. nov., a new species associated with genital infections in male patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2244-2249.
734. Riegel P, Ruimy R, Renaud FNR, et al. *Corynebacterium singulare* sp. nov., a new species for urease-positive strains related to *Corynebacterium minutissimum*. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1092-1096.
735. Riegert-Johnson DL, Sandhu N, Rajkumar SV, Patel R. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with a hepatic abscess due to *Actinomyces turicensis*. *Clin Infect Dis* 2002;35:636-637.
736. Rihs JD, McNeil MM, Brown JM, Yu VL. *Oerskovia xanthineolytica* implicated in peritonitis associated with peritoneal dialysis and review of *Oerskovia* infections in humans. *J Clin Microbiol* 1990;28:1934-1937.
737. Robson JM, McDougall R, van der Valk S, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an uncommon but ever present zoonoses. *Pathology* 1998;30:391-394.
738. Rocourt J. Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* 1988;16(Suppl 2):S89-S91.
739. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, et al. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:171-174.
740. Rocourt J, Wehmeyer U, Stackebrandt E. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov. as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:266-270.
741. Rogasi PG, Vigano S, Pecile P, Leoncini F. *Lactobacillus casei* pneumonia and sepsis in a patient with AIDS. Case report and review of the literature. *Ann Ital Med Int* 1998;13:180-182.
742. Rosato AE, Lee BS, Nash KA. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1982-1989.
743. Rosene K, Eschenbach DA, Tompkins LS, et al. Polymicrobial early postpartum endometritis with facultative and anaerobic bacteria, genital mycoplasmas, and *Chlamydia trachomatis*: treatment with piperacillin or cefoxitin. *J Infect Dis* 1984;153:1028-1037.
744. Ross MJ, Sakoulas G, Manning WJ, et al. *Corynebacterium jeikeium* native valve endocarditis following femoral access for coronary angiography. *Clin Infect Dis* 2001;32:E120-E121.
745. Rossler D, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. *Syst Appl Microbiol* 1991;14:266-269.
746. Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, et al. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect Immun* 1990;58:3751-3758.
747. Roy M, Chen JC, Miller M, et al. Epidemic *Bacillus* endophthalmitis after cataract surgery: I. Acute presentation and outcome. *Ophthalmology* 1997;104:1768-1772.
748. Rufael DW, Cohn SE. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*. *Clin Infect Dis* 1994;19:1054-1061.
749. Ruimy R, Riegel P, Boiron P, et al. Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal RNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:740-746.
750. Ruiz ME, Richards JS, Kerr GS, Kan VL. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1156-1157.
751. Rupp ME, Stiles KG, Tarantolo S, Goering RV. Central venous catheter-related *Corynebacterium minutissimum* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:786-789.
752. Ryan PA, MacMillan JD, Zilinskas BA. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 1997;179:2551-2556.
753. Saavedra J, Rodriguez JN, Fernandez-Jutado A, et al. A necrotic soft-tissue lesion due to *Corynebacterium urealyticum* in a neutropenic child. *Clin Infect Dis* 1996;22:851-852.

754. Sabbe LJM, Van De Merwe D, Schouls L, et al. Clinical spectrum of infections due to the newly described *Actinomyces* species *A. turicensis*, *A. radingae*, and *A. europaeus*. J Clin Microbiol 1999;37:8-13.
755. Sadhu K, Domingue PA, Chow AW, et al. *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. J Med Microbiol 1989;29:229-235.
756. Saez Roca G, Fernandez E, Diez JM, et al. Splenic abscess and empyema due to *Lactobacillus* species in an immunocompetent host. Clin Infect Dis 1998;26:498-499.
757. Sakai C, Iuchi T, Ishii A, et al. *Bacillus cereus* brain abscesses occurring in a severely neutropenic patient: successful treatment with antimicrobial agents, granulocyte colony-stimulating factor, and surgical drainage. Intern Med 2001;40:654-657.
758. Salaman SA, Prag J. Three cases of *Rothia dentocariosa* bacteraemia: frequency in Denmark and a review. Scand J Infect Dis 2002;34:153-157.
759. Salamina C, Dalle Donne E, Niccolini A, et al. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol Infect 1997;119:429-436.
760. Salminen MK, Rautelin H, Tynkynen S, et al. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special emphasis on probiotic *L. rhamnosus* GG. Clin Infect Dis 2004;38:62-69.
761. Salminen MK, Tynkynen S, Rautelin H, et al. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. Clin Infect Dis 2002;35:1155-1160.
762. Salmon SA, Walker RD, Carleton CL, et al. Characterization of *Gardnerella vaginalis* and *G. vaginalis*-like organisms from the reproductive tract of the mare. J Clin Microbiol 1991;29:1157-1161.
763. Saltzgeber-Muller J, Stone BA. Detection of *Corynebacterium kutscheri* in animal tissues by DNA-DNA hybridization. J Clin Microbiol 1986;24:759-763.
764. Sanchez Hernandez J, Mora Peris B, Yague Guirao N, et al. *In vitro* activity of newer antibiotics against *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum*, and *Corynebacterium urealyticum*. Int J Antimicrob Agents 2003;22:492-496.
765. Santos MR, Gandhi S, Vogler M, et al. Suspected diphtheria in an Uzbek national: isolation of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* resulted in a false-positive presumptive diagnosis. Clin Infect Dis 1999;22:735.
766. Sanyal D, Bhandari S. CAPD peritonitis caused by *Lactobacillus rhamnosus*. J Hosp Infect 1992;22:325-327.
767. Sarkonen N, Kononen E, Summanen P, et al. Phenotypic differentiation of *Actinomyces* and related species isolated from human sources. J Clin Microbiol 2001;39:3955-3961.
768. Sato T, Matsuyama J, Takahashi N, et al. Differentiation of oral *Actinomyces* species by 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Arch Oral Biol 1998;43:247-252.
769. Saweljew P, Kunkel J, Feddersen A, et al. Case of fatal systemic infection with an *Aureobacterium* sp.: identification of isolate by 16S rRNA gene analysis. J Clin Microbiol 1996;34:1540-1541.
770. Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, et al. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. Clin Infect Dis 1996;22:564-566.
771. Schaal KP. Genus *Actinomyces*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1383-1418.
772. Schemmer GB, Driebe WT Jr. Posttraumatic *Bacillus cereus* endophthalmitis. Arch Ophthalmol 1987;105:342-344.
773. Schiff MJ, Kaplan MH. *Rothia dentocariosa* pneumonia in an immunocompromised patient. Lung 1987;165:279-282.
774. Schlech WF. Listeria gastroenteritis: old syndrome, new pathogen. N Engl J Med 1997;336:130-132.
775. Schlech WF. Foodborne listeriosis. Clin Infect Dis 2000;31:770-775.
776. Schlegel L, Lemerle S, Geslin P. *Lactobacillus* species as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:887-888.
777. Schlesner H, Lawson PA, Collins MD, et al. *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with orn-D-glucose-type peptidoglycan. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:425-431.
778. Schoon Y, Schuurman, Buiting AG, et al. Aortic graft infection by *Lactobacillus casei*: a case report. Neth J Med 1998;52:71-74.
779. Schriker ME, Thompson GH, Schreiber JR. Osteomyelitis due to *Bacillus cereus* in an adolescent: case report and review. Clin Infect Dis 1994;18:863-867.
780. Schuchat A, Deaver K, Hayes PS, et al. Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. J Infect Dis 1993;167:1261-1262.
781. Schuchat A, Deaver KA, Wenger ID, et al. Role of foods in sporadic listeriosis: I. Case-control study of dietary risk factors. JAMA 1992;267:169-183.
782. Schuchat A, Lizano C, Broome CV, et al. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. Pediatr Infect Dis J 1991;10:183-189.
783. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev 1991;4:169-183.
784. Schumann P, Weiss N, Stackerbrandt E. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackerbrandt and Keddie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., com. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1007-1010.
785. Schuster MG, Brennan PJ, Edelstein P. Persistent bacteremia with *Erysipelothrix rhusiopathiae* in a hospitalized patient. Clin Infect Dis 1993;17:783-784.
786. Scott TG, Curran B, Smith CJ. Electron microscopy of adhesive interaction between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy cells, and human red blood cells. J Gen Microbiol 1989;135:475-480.
787. Seeliger HPR, Jones D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1235-1245.
788. Sergeant ES, Love SC, McInnes A. Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii*. Aust Vet J 1921;68:39.
789. Sewell DL, Coyle MB, Funke G. Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* (CDC coryneform group ANF-1). J Clin Microbiol 1995;33:759-761.
790. Shaffer DN, Drevets DA, Farr RW. *Listeria monocytogenes* rhombencephalitis with cranial nerve palsies. WV Med J 1999;94:80-83.
791. Shah M, Gentile RC, McCormick SA, Rogers SH. *Oerskovia xanthineolytica* keratitis. CLAO J 1996;22:96.
792. Sheiness D, Dix K, Watanabe S, Hillier SL. High levels of *Gardnerella vaginalis* detected with an oligonucleotide probe combined with elevated pH as a diagnostic indicator of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1992;30:642-648.
793. Sheng WH, Hsueh PR, Hung CC, et al. Fatal outcome of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia in a patient with oropharyngeal cancer. J Formos Med Assoc 2000;99:431-434.
794. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 1996;46:939-946.
795. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, et al. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdulanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. Int J Syst Bacteriol 1997;47:289-298.
796. Shimoji Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. Microbes Infect 2000;2:965-972.
797. Shimoji Y, Mori Y, Fischetti VA. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. Infect Immun 1999;67:1646-1651.
798. Shimoji Y, Mori Y, Hyakutake K, et al. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. J Clin Microbiol 1998;36:86-89.
799. Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. Infect Immun 1996;64:1789-1793.
800. Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T, et al. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. Infect Immun 1994;62:2806-2810.
801. Shinagawa K, Ichikawa K, Matsusaka N, Sugii S. Purification and some properties of a *Bacillus cereus* mouse lethal toxin. J Vet Med Sci 1991;53:469-474.
802. Shinagawa K, Ueno S, Konuma H, et al. Purification and characterization of the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus*. J Vet Med Sci 1991;53:281-286.
803. Shukla SK, Bernard KA, Hamey M, et al. *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female genital tract. J Clin Microbiol 2003;41:4353-4358.
804. Shukla SK, Vevea DN, Frank DN, et al. Isolation and characterization of a black-pigmented *Corynebacterium* sp. from a woman with spontaneous abortion. J Clin Microbiol 2001;39:1109-1113.
805. Siegel SM, Haile CA. *Corynebacterium ulcerans* pneumonia. South Med J 1985;78:1267-1268.
806. Sieracka JK. Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. J Biochem Cell Biol 1998;30:579-595.
807. Silvester ME, Dicks LMT. Identification of lactic acid bacteria isolated from human vaginal secretions. Antonie van Leeuwenhoek 2003;83:117-123.
808. Simionescu R, Grover S, Shekar R, West BC. Necrotizing fasciitis caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. South Med J 2003;96:937-939.
809. Simonet M, DeBriel D, Boucot I, et al. Coryneform bacteria isolated from middle ear fluid. Clin Microbiol 1993;31:1667-1668.
810. Simoons-Smit AM, Savelkoul PH, Newling DW, Vandenbrouche-Grauls CM. Chronic cystitis caused by *Corynebacterium urealyticum* detected by polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:949-952.
811. Sirard C, Mock M, Fouet A. The three *Bacillus arthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. J Bacteriol 1994;176:5188-5192.
812. Sivalingam JJ, Martin P, Framow HS, et al. *Listeria monocytogenes* peritonitis: case report and literature review. Am J Gastroenterol 1992;87:1839-1845.
813. Sjoden B, Funke G, Izquierdo A, et al. Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1998;48:69-74.
814. Skov RL, Sanden AK, Danchell VH, et al. Systemic and deep-seated infections caused by *Arcanobacterium haemolyticum*. Eur Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:578-582.
815. Sliman R, Rehm S, Shlaes DM. Serious infections caused by *Bacillus* species. Medicine (Baltimore) 1987;66:218-223.
816. Smego RA Jr. Actinomycosis of the central nervous system. Rev Infect Dis 1987;9:855-865.
817. Smego RA Jr, Foglia G. Actinomycosis. Clin Infect Dis 1998;26:1255-1263.
818. Smith GA, Marquis H, Jones S, et al. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infect Immun 1995;63:4231-4237.
819. Smith KJ, Skelton HG III, Angritt P, et al. Cutaneous lesions of listeriosis in a newborn. J Cutan Pathol 1991;18:474-476.
820. Smith SM, Ogbara T, Eng RHK. Involvement of *Gardnerella vaginalis* in urinary tract infections in men. J Clin Microbiol 1991;30:1575-1577.
821. Sobel JD. Bacterial vaginosis. Annu Rev Med 2000;51:349-356.
822. Sobrino J, Marco F, Miro JM, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium pilosum*. Infection 1991;19:247-249.

823. Sofianou D, Avgoustinakis E, Dilapoulou A, et al. Soft-tissue abscess involving *Actinomyces odontolyticus* and two *Prevotella* species in an intravenous drug abuser. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:75-79.
824. Soriano F, Aguado JM, Ponte C, et al. Urinary tract infection caused by *Corynebacterium* group D2: report of 82 cases and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:1019-1034.
825. Soriano F, Fernandez-Roblas R. Infections caused by antibiotic-resistant *Corynebacterium* group D2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:337-341.
826. Soriano F, Fernandez-Roblas R, Calvo R, Garcia-Calvo G. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1028-1033.
827. Soriano F, Fernandez-Roblas R, Zapardiel J, et al. Increasing incidence of *Corynebacterium* group D2 strains resistant to norfloxacin and ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:1117-1118.
828. Soriano F, Ponte C, Galliano MJ. Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravenous and urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:453-456.
829. Soriano F, Ponte C, Ruiz P, Zapardiel J. Non-urinary tract infections caused by multiply antibiotic-resistant *Corynebacterium urealyticum*. *Clin Infect Dis* 1993;17:890-891.
830. Soriano F, Ponte C, Santamaria M, et al. *Corynebacterium* group D2 as a cause of alkaline-encrusted cystitis: report of four cases and characterization of the organisms. *J Clin Microbiol* 1985;21:788-792.
831. Soriano F, Rodriguez-Tudela JL, Fernandez-Roblas R, et al. Skin colonization by *Corynebacterium* groups D2 and JK in hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1988;26:1878-1880.
832. Soriano F, Zapardiel J, Nieto E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:208-214.
833. Soto A, Zapardiel J, Soriano F. Evaluation of the API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *J Clin Pathol* 1994;47:756-759.
834. Spach DH, Opp DR, Gabre-Kidan T. Bacteremia due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis* 1991;13:342-343.
835. Spitzer PG, Hammer SM, Karchmer AW. Treatment of *Listeria monocytogenes* infection with trimethoprim-sulfamethoxazole: case report and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1986;8:427-430.
836. Spring S, Ludwig W, Marquez MC, et al. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:492-496.
837. Spyrou N, Anderson M, Foale R. *Listeria* endocarditis: current management and patient outcome: world literature review. *Heart* 1997;77:380-383.
838. Sriskandan S, Lacey S, Fischer L. Isolation of vancomycin-resistant lactobacilli from three neutropenic patients with pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:649-650.
839. Stackebrandt E, Breyman S, Steiner U, et al. Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jager et al. 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia paurometabola* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1105-1111.
840. Stackebrandt E, Haringer M, Schleifer K-H. Molecular evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. *Arch Microbiol* 1980;127:179-185.
841. Stackebrandt E, Keddie RM. Genus *Cellulomonas* Bergey et al. 1923, 154, emend. mut. char. Clark 1952, 50^{al}. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1325-1329.
842. Stackebrandt E, Seiler H, Schleifer K-H. Union of the genera *Cellulomonas* Bergey et al. and *Oerskovia* Prauser et al. in a redefined genus. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektkrankh Hyg Abt I Orig* 1982;C3:401-409.
843. St Amant DC, Valentin-Bon IE, Jerse AE. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infect Immun* 2002;70:7169-7171.
844. Stamm AM, Smith SH, Kirklin JK, McGiffin DC. Listerial myocarditis in cardiac transplantation. *Rev Infect Dis* 1990;12:820-823.
845. Steen MK, Bruno-Murtha LA, Chau G, et al. *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:945-946.
846. Stone N, Gillen P, Burge S. Breast abscess due to *Corynebacterium striatum*. *Br J Dermatol* 1997;137:623-625.
847. Strauss R, Mueller A, Wehler M, et al. Pseudomembranous tracheobronchitis due to *Bacillus cereus*. *Clin Infect Dis* 2001;33:e39-e41.
848. Sturdee S, Bainton R, Barnham M. Intravascular infection with *Lactobacillus paracasei*. *J Infect* 1998;37:184-186.
849. Sturm AW. *Gardnerella vaginalis* in infections of the urinary tract. *J Infect* 1989;18:45-49.
850. Sturm AW, de Leeuw JHA, dePree NTCM. Postoperative wound infection with *Gardnerella vaginalis*. *J Infect* 1983;7:264-266.
851. Suarez ML, Espino L, Vila M, Santamarina G. Urinary tract infection caused by *Corynebacterium urealyticum* in a dog. *J Small Anim Pract* 2002;43:299-302.
852. Sudduth EJ, Rozich JD, Farrar WE. *Rothia dentocariosa* endocarditis complicated by perivalvular abscess. *Clin Infect Dis* 1993;17:772-775.
853. Sulea IT, Pollice MC, Barksdale L. Pyrazine carboxylamidase activity in *Corynebacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1980;30:466-472.
854. Sung MH, Kim H, Bae JW, et al. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:2251-2255.
855. Suzuki KI, Suzuki M, Sasaki J, et al. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accommodate "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subspecies *cynodontis* Davis et al. 1984. *J Gen Appl Microbiol* 1999;45:253-262.
856. Svare J, Andersen LF, Langhoff-Roos J, et al. Maternal-fetal listeriosis: two case reports. *Gynecol Obstet Invest* 1991;31:179-181.
857. Swartz MA, Welch DF, Narayanan RP, Greenfield RA. Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. *Am J Clin Pathol* 1991;96:130-133.
858. Swenson JM, Facklam RR, Thomsberry C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Thiobacillus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:543-547.
859. Tabatabaie P, Syadati A. *Bacillus anthracis* as a cause of bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:1035-1037.
860. Takahashi T, Fujisawa T, Benno Y, et al. *Erysipelothrix tonsillarum* sp. nov. isolated from tonsils of apparently healthy pigs. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:166-168.
861. Takahashi T, Fujisawa T, Tamura Y, et al. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:469-473.
862. Takahashi T, Fujisawa T, Yamamoto K, et al. Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000;47:311-312.
863. Takahashi T, Takahashi I, Tamura Y, et al. Mechanism of plasma clotting by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2161-2164.
864. Takahashi T, Tamura Y, Yoshimura H, et al. *Erysipelothrix tonsillarum* isolated from dogs with endocarditis in Belgium. *Res Vet Sci* 1993;54:264-265.
865. Takeshi K, Makino S, Ikeda T, et al. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37:4093-4098.
866. Takeuchi M, Hatano K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins, et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:739-747.
867. Takeuchi M, Sakane T, Nihira T, et al. *Corynebacterium terpenotabidum* sp. nov., a bacterium capable of degrading squalene. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:223-229.
868. Takeuchi M, Yokota A. Phylogenetic analysis of the genus *Microbacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1994;124:11-16.
869. Takiguchi Y, Terano T, Hirai A. Lung abscess caused by *Actinomyces odontolyticus*. *Intern Med* 2003;42:723-725.
870. Tamura Y, Takahashi T, Zarkasie K, et al. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:111-114.
871. Tang G, Yip H-K, Luo G, et al. Development of novel oligonucleotide probes for seven *Actinomyces* species and their utility in supragingival plaque analysis. *Oral Diseases* 2003;9:203-209.
872. Tang YW, von Graevenitz A, Waddington MG, et al. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1676-1678.
873. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KS, et al. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts? *JAMA* 1995;273:1118-1122.
874. Tassepe AI, Ulasan NG, Liman ST, et al. Thoracic actinomycosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14:578-583.
875. Tattavin P, Bremiex AC, Muller-Serieys C, Carbon C. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: first reported case of medical treatment alone. *Clin Infect Dis* 1996;23:1330-1331.
876. Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, et al. A clinicopathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology* 2003;35:109-119.
877. Taylor JP, Dimmitt DC, Ezzell JW, Whitford H. Indigenous human cutaneous anthrax in Texas. *South Med J* 1993;86:1-4.
878. Te Giffel MC, Beumer RR, Klijn N, et al. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 1997;146:47-51.
879. Telander B, Lerner R, Palmblad J, Ringertz O. *Corynebacterium* group JK in a hematological ward: infections, colonization, and environmental contamination. *Scand J Infect Dis* 1988;20:55-61.
880. Tendler C, Bottone EJ. *Corynebacterium aquaticum* urinary tract infection in a neonate and concepts regarding the role of the organism as a neonatal pathogen. *J Clin Microbiol* 1989;27:343-345.
881. Tesh MJ, Wood RL. Detection of coagulase activity in *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1058-1060.
882. Thangkiew I, Gunstone RF. Association of *Lactobacillus plantarum* with endocarditis. *J Infect* 1998;16:304-305.
883. Thompson C, McCarter YS, Krause PJ, Herson VC. *Lactobacillus acidophilus* sepsis in a neonate. *J Perinatol* 2001;21:258-260.
884. Thuler LC, Velasco E, de Souza Martins CA, et al. An outbreak of *Bacillus* species in a cancer hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:856-858.
885. Thum JR, Goodman JL. Post-traumatic ophthalmitis due to *Bacillus licheniformis*. *Am J Med* 1988;85:708-709.
886. Tiley SM, Kociuba KR, Heron LG, Munro R. Infective endocarditis due to non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:271-275.
887. Titov L, Kolodkina V, Dronina A, et al. Genotypic and phenotypic characteristic of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from patients in Belarus during an epidemic period. *J Clin Microbiol* 2003;41:1285-1288.

888. Tokieda K, Morikawa Y, Maeyama K, et al. Clinical manifestations of *Bacillus cereus* meningitis in newborn infants. *J Paediatr Child Health* 1999;35:582-584.
889. Tena C, Sisavath L, Iwanga M. Reversed passive latex agglutination assay for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol* 1997;35:3147-3149.
890. Totemchokchayakarn K, Janwityanujit S, Sathapatayavongs B, Puavilai S. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 1996;35:818-820.
891. Toten PA, Amsel R, Haie J, et al. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1982;15:141-147.
892. Touzel JP, O'Donohue M, Debeire P, et al. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:315-320.
893. Traub WH, Geipel U, Leonhard B, Bauer D. Antibiotic susceptibility testing (agar disk diffusion and agar dilution) of clinical isolates of *Corynebacterium jeikeium*. *Chemotherapy* 1998;44:230-237.
894. Truant AL, Satishchandra V, Eisenstaedt R, et al. Oersko xanthineolytica and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a patient with cirrhosis and variceal hemorrhage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:950-951.
895. Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, et al. Collagenolytic serine carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:162-169.
896. Teladhar R, Patole SK, Koh TH, et al. Refractory *Bacillus cereus* infection in a neonate. *Int Clin Pract* 2000;54:345-347.
897. Tumbarello M, Tacconelli E, Del Forno A, et al. *Corynebacterium striatum* bacteremia in a patient with AIDS (letter). *Clin Infect Dis* 1994;18:1007-1008.
898. Uchida I, Makino S, Sasakawa C, et al. Identification of a novel gene, dp, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 1993;9:487-496.
899. Umana E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an unusual pathogen of infective endocarditis. *Int J Cardiol* 2003;88:297-299.
900. Valdes-Stauber N, Scherer S, Seiler H. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *Int J Food Microbiol* 1997;34:115-129.
901. Van J-C, Nguyen L, Guillemin R, et al. Relapse of infection or reinfection with *Listeria monocytogenes* in a patient with a heart transplant: usefulness of pulsed-field gel electrophoresis for diagnosis. *Clin Infect Dis* 1994;19:208-209.
902. Van Belkum A, Koeken A, Vandamme P, et al. Development of a species-specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis*. *Mol Cell Probes* 1995;9:167-174.
903. Van Bosterhaut B, Boucquoy P, Janssens M, et al. Chronic osteomyelitis due to *Actinomyces neuii* subspecies *neuii* and *Dermobacter hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:486-487.
904. Van Bosterhaut B, Cuvelier R, Serruys E, et al. Three cases of opportunistic infection caused by propionic acid producing *Corynebacterium minutissimum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:628-631.
905. Van Bosterhaut B, Surmont I, Vandeven J, et al. *Corynebacterium jeikeium* (group JK diphtheroids) endocarditis: a report of five cases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:265-268.
906. Vandamme P, Falsen E, Vancanneyt M, et al. Characterization of *Actinomyces turicensis* and *Actinomyces radingae* strains from human clinical sample. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:503-510.
907. Van der Lelie H, Leverstein-van Hall M, Mertens M, et al. *Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scand J Infect Dis* 1995;27:581-584.
908. Van der Zwet WC, Parlevliet GA, Savelkoul PH, et al. Outbreak of *Bacillus cereus* infection in a neonatal intensive care unit traced to balloon used in manual ventilation. *J Clin Microbiol* 2000;38:4131-4136.
909. Vanechoutte M, Boerlin P, Tichy HV, et al. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:127-139.
910. Vanechoutte M, DeBleser D, Claeys G, et al. Cardioverter-lead electrode infection due to *Corynebacterium amycolatum*. *Clin Infect Dis* 1998;27:1553-1554.
911. Vanechoutte M, Riegel R, DeBriel D, et al. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species in the genus *Corynebacterium*. *Res Microbiol* 1995;146:633-641.
912. Van Esbroeck M, Vandamme P, Falsen E, et al. Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*-like coryneforms present in bacterial vaginosis. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:675-682.
913. Van Mook WN, Simonis FS, Schneeberger PM, van Opstal JL. A rare case of disseminated actinomycosis caused by *Actinomyces meyeri*. *Neth J Med* 1997;51:39-45.
914. Van Notten P, Perales I, van de Moedijk A, et al. Liquid and solid differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Int J Food Microbiol* 1989;8:299-316.
915. Van Noyen R, Reybrouck R, Peeters P, et al. *Listeria monocytogenes* infection of a prosthetic vascular graft. *Infection* 1993;21:125-126.
916. Venditti M, Gelfusa V, Castelli F, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:50-52.
917. Venditti M, Gelfusa V, Tarasi A, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2038-2040.
918. Villanueva JL, Dominguez A, Rios MJ, Iglesias C. *Corynebacterium macginleyi* isolated from urine in a patient with a permanent bladder catheter. *Scand J Infect Dis* 2002;34:699-700.
919. Villegas H, Arias F, Flores E, et al. Ultrastructural characteristics of *Gardnerella vaginalis* infection in the heterosexual couple. *Arch Androl* 1997;39:147-153.
920. Viscoli C, Garaventa A, Ferrea G, et al. *Listeria monocytogenes* brain abscesses in a girl with acute lymphoblastic leukaemia after late central nervous system relapse. *Eur J Cancer* 1991;27:435-437.
921. Vittek CR, Wharton M. Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease. *Emerg Infect Dis* 1998;4:539-550.
922. Vogt HB, Hoffman WW. A case of *Lactobacillus acidophilus* endocarditis successfully treated with cefazolin and gentamicin. *SDJ Med* 1998;51:153-156.
923. Voisin S, Deruaz D, Freney J, Renaud FN. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum*, and related species by pyrolysis gas-liquid chromatography with atomic emission detection. *Res Microbiol* 2002;153:307-311.
924. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4720-4728.
925. Von Graevenitz A, Frommelt L, Punter-Streit V, Funke G. Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. *Infection* 1998;26:36-38.
926. Von Graevenitz A, Osterhout G, Dick J. Grouping of some clinically relevant Gram-positive rods by automated fatty acid analysis. *APMIS* 1991;99:147-154.
927. Von Graevenitz A, Punter V, Gruner E, et al. Identification of coryneform and other Gram-positive rods with several methods. *APMIS* 1994;120:381-389.
928. Von Graevenitz A, Punter-Streit V, Riegel P, Funke G. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. *J Clin Microbiol* 1998;36:2087-2088.
929. Von Hunolstein C, Alfaron G, Scopetti F, et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990's. *J Med Microbiol* 2003;52:181-188.
930. Waagner DC. *Arcanobacterium haemolyticum*: biology of the organism and diseases in man. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:933-939.
931. Wagner J, Ignatius R, Voss S, et al. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin Infect Dis* 2001;33:1598-1600.
932. Waino M, Tindall BJ, Schumann P, Ingvorsen K. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov., transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:821-831.
933. Wallet F, Perez T, Roussel-Delvallez M, et al. *Rothia dentocariosa* two new cases of pneumonia revealing lung cancer. *Scand J Infect Dis* 1997;29:419-520.
934. Wang CC, Mattson D, Wald A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:445-449.
935. Watkins DA, Chachine A, Creger RG, et al. *Corynebacterium striatum*: a diphtheroid with pathogenic potential. *Clin Infect Dis* 1993;17:21-25.
936. Wattiau P, Janssens M, Wauters G. *Corynebacterium simulans* sp. nov., a non-lipophilic, fermentative *Corynebacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:347-353.
937. Wauters G, Avesani V, Laffineur K, et al. *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1321-1325.
938. Wauters G, Charlier J, Janssens M, Delmee M. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:2412-2415.
939. Wauters G, Charlier J, Janssens M, Delmee M. *Brevibacterium paucivorans* sp. nov., from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1703-1707.
940. Wauters G, Driessen A, Ageron E, et al. Propionic acid-producing strain previously designated as *Corynebacterium xerosis*, *C. minutissimum*, *C. striatum*, and CDC group 1-2 and group F-2 coryneforms belong to the species *Corynebacterium amycolatum*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:653-657.
941. Wauters G, Van Bosterhaut B, Avesani V, et al. Peritonitis due to *Brevibacterium otitidis* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4292-4293.
942. Wauters G, Van Bosterhaut B, Janssens M, Verhaegen J. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *J Clin Microbiol* 1998;36:1430-1432.
943. Weber DJ, Savitser SM, Rutala WA, Thomann CA. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:642-645.
944. Weersink AJL, Rozenberg-Arska M, Westerhof PW, Verhoef J. *Rothia dentocariosa* endocarditis complicated by an abdominal aneurysm. *Clin Infect Dis* 1994;18:489-490.
945. Weiss K, Labbo AC, Laverdiere M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect Dis* 1996;23:1246-1248.
946. Weller TMA, McLardy-Smith P, Crook DW. *Corynebacterium jeikeium* osteomyelitis following total hip joint replacement. *J Infect* 1994;29:113-114.
947. Wellinghausen N, Sing A, Kern WW, et al. A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Int J Med Microbiol* 2002;292:59-63.
948. Wesche J, Ellison JL, Falsen S, et al. Characterization of membrane translocation by anthrax protective antigen. *Biochemistry* 1998;37:15737-15746.
949. Westling K, Lidman C, Thalme A. Tricuspid valve endocarditis caused by a new species of actinomycetes: *Actinomyces funkei*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:206-207.
950. Wilhelmus KR, Robinson NM, Jones DB. *Bacterionema matruchotii* ocular infections. *Am J Ophthalmol* 1979;87:143-147.
951. Williamson LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17:359-371.
952. Wilson APR. The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxigenic strains. *J Hosp Infect* 1995;30(Suppl):306-312.

953. Wilson JA, Barratt AJ. An unusual case of *Gardnerella vaginalis* septicaemia. *Br Med J* 1986;293:309.
954. Wilson ME, Shapiro DS. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Clin Infect Dis* 1992;15:1059-1060.
955. Winslow DL, Pankey GA. *In vitro* activities of trimethoprim and sulfamethoxazole against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:51-54.
956. Winslow DL, Steele-Moore L. Ventriculoperitoneal shunt infection due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* 1995;20:1437.
957. Wisotzky JD, Jurtshuk P Jr, Fox GE, et al. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:263-269.
958. Witt A, Petricevic L, Kaufmann U, et al. DNA hybridization test: rapid diagnostic tool for excluding bacterial vaginosis in pregnant women with symptoms suggestive of infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:3057-3059.
959. Wolde Rufael D, Cohn SE. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;19:1054-1061.
960. Wong MT, Dolan MJ. Significant infections due to *Bacillus* species following abrasions associated with motor vehicle-related trauma. *Clin Infect Dis* 1992;15:855-857.
961. Wong TP, Groman H. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1984;43:1114-1116.
962. Woo PCY, Fung AMY, Lau SKP, et al. Diagnosis of pelvic actinomycosis by 16S ribosomal RNA gene sequencing and its clinical significance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:113-118.
963. Woo PCY, Fung AMY, Lau SKP, Yuen K-Y. Identification by 16S rRNA sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:265-267.
964. Wood CA, Pepe R. Bacteremia in a patient with non-urinary tract infection due to *Corynebacterium urealyticum*. *Clin Infect Dis* 1994;19:367-368.
965. Wood GC, Boucher BA, Croce MA, Fabian TC. *Lactobacillus* species as the cause of ventilator-associated pneumonia in a critically ill trauma patient. *Pharmacotherapy* 2002;22:1180-1182.
966. Wright ED, Richards AJ, Edge AJ. Discitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* following ear, nose, and throat surgery. *Br J Rheumatol* 1994;34:585-586.
967. Wright JR Jr, Stinson D, Wade A, et al. Necrotizing funisitis associated with *Actinomyces meyeri* infection: a case report. *Pediatr Pathol* 1994;14:927-934.
968. Wu S-R, Hillier SL, Nath K. Genomic fingerprint analysis of biotype 1 *Gardnerella vaginalis* from patients with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:192-195.
969. Wust J, Martinetti Lucchini G, Luthy-Hottenstein J, et al. Isolation of grampositive rods that resemble but are clearly distinct from *Actinomyces pyogenes* from mixed wound infections. *J Clin Microbiol* 1993;31:1127-1145.
970. Wust J, Stubbs S, Weiss N, et al. Assignment of *Actinomyces pyogenes*-like (CDC coryneform group E) bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces radingae* sp. nov., and *Actinomyces turicensis* sp. nov. *Lett Appl Microbiol* 1995;20:76-81.
971. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2003;29:549-552.
972. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Martin L, et al. Identification of oral *Actinomyces* species using DNA probes. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:257-265.
973. Yague G, Segovia M, Valero-Guillen PL. Detection of mycoloylglycerol by thin-layer chromatography as a tool for the rapid inclusion of corynebacteria of clinical origin in the genus *Corynebacterium*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;738:181-185.
974. Yanagawa R, Honda E. *Corynebacterium pilosum* and *Corynebacterium cystiditis*, two new species from cows. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:209-216.
975. Yassin AF, Kroppenstedt RM, Ludwig W. *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:705-709.
976. Yassin AF, Steiner U, Ludwig W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1001-1005.
977. Yassin AF, Steiner U, Ludwig W. *Corynebacterium appendicis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;52:1165-1169.
978. Yildiz S, Yildiz HY, Cetin I, Ucar DH. Total knee arthroplasty complicated by *Corynebacterium jeikeium* infection. *Scand J Infect Dis* 1995;27:635-636.
979. Yokota A, Takeuchi M, Weiss N. Proposal of two new species in the genus *Microbacterium*: *Microbacterium dextranolyticum* sp. nov. and *Microbacterium aurum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:549-554.
980. Yokota A, Takeuchi M, Sakane T, Weiss N. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium esteraromaticum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:555-564.
981. Yoon JH, Kang PH, Park YH. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:2043-2048.
982. Yoonessi M, Crickard K, Cellino IS, et al. Association of *Actinomyces* and intrauterine contraceptive devices. *J Reprod Med* 1985;30:48-52.
983. York M. *Bacillus* species pseudobacteremia traced to contaminated gloves used in collection of blood from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1990;28:2114-2116.
984. Yoonus F, Chua A, Tortura G, Jimenez VE. Lemierre's disease caused by coinfection of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Fusobacterium necrophorum*: a case report. *J Infect* 2002;45:114-117.
985. Zaman R, Abbas M, Burd E. Late prosthetic hip joint infection with *Actinomyces israelii* in an intravenous drug user: case report and literature review. *J Clin Microbiol* 2002;40:4391-4392.
986. Zapardiel J, Nieto E, Soriano F. Urinary tract infections caused by β -lactam-sensitive *Corynebacterium urealyticum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:174-176.
987. Zimmerman O, Sproer C, Kroppenstedt RM, et al. *Corynebacterium thomssenii* sp. nov., a *Corynebacterium* with N-acetyl- β -glucosaminidase activity from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:489-494.
988. Zinkernagel AS, von Graevenitz A, Funke G. Heterogeneity within *Corynebacterium minutissimum* strains is explained by misidentified *Corynebacterium amycolatum* strains. *Am J Clin Pathol* 1996;106:378-383.
989. Zinnemann K, Turner GC. The taxonomic position of "*Haemophilus vaginalis*" (*Corynebacterium vaginale*). *J Pathol Bacteriol* 1963;85:213-219.
990. Zuber PLF, Gruner E, Altwegg M, von Graevenitz A. Invasive infection with non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* among drug users. *Lancet* 1992;330:1359.

Actinomicetos aerobios

Introducción, clasificación y taxonomía

Grupo nocardioforme

Nocardia

Epidemiología, anatomía patológica y taxonomía

Enfermedad clínica

Rhodococcus

Epidemiología, anatomía patológica y patogenia

Enfermedad clínica

Otras bacterias nocardioformes

Maduromicetos y termomonosporas

Actinomadura

Epidemiología

Enfermedad clínica y anatomía patológica

Nocardiosis

Streptomicetos

Streptomyces

Actinomicetos termófilos

Otros actinomicetos

Oerskovia

Dermatophilus

Tropheryma whipplei

Historia y taxonomía

Ecología

Enfermedad clínica y anatomía patológica

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por actinomicetos aerobios

Aislamiento primario

Diferenciación de *Nocardia* de otros géneros de actinomicetos aerobios

Identificación de los actinomicetos termófilos

Identificación de *Tropheryma whipplei*

Sensibilidad in vitro de *Nocardia* y bacterias relacionadas a los antibióticos y tratamiento de las infecciones

Introducción, clasificación y taxonomía

Los actinomicetos aerobios son bacterias grampositivas que suelen ser más filamentosas y ramificadas que las bacterias explicadas en capítulos anteriores, y producen comúnmente un micelio similar a un hongo que se fragmenta o divide en formas de bacilos o cocoides cortos. Estos microorganismos, cuando son aislados en muchos laboratorios, se derivan para su identificación a la “sección de micología” o a la “sección de micobacteriología”, más que al laboratorio de bacteriología general. Las razones son que la mayoría crecen más lentamente que otras bacterias aerobias y anaerobias facultativas y pueden ser aisladas en medios comunes para hongos (p. ej., agar dextrosa de Sabouraud) o en medios para el aislamiento de micobacterias (p. ej.,

agares sintéticos de Middlebrook y medio de Lowenstein-Jensen). No obstante, estos bacilos grampositivos filamentosos, ramificados y aerobios son bacterias, no hongos. Los hongos verdaderos tienen una organización celular eucarionte. A diferencia de los hongos, los actinomicetos aerobios procariontes no tienen un núcleo rodeado por una membrana; carecen de los orgánulos intracelulares que tienen los microorganismos eucariontes (p. ej., no tienen mitocondrias); sus paredes celulares contienen ácido murámico, ácido diaminopimélico o lisina (de la cual carecen los hongos); son inhibidos por los antibióticos antibacterianos, pero no por los antimicóticos, y difieren en otras características fundamentales. Las hifas ramificadas de los actinomicetos aerobios son más estrechas que las hifas micóticas y miden 0,5 a 1,2 µm de diámetro.

Las técnicas químicas y genéticas modernas han establecido la gran diversidad de este grupo, pero las características fenotípicas descritas antes siguen constituyendo una parte importante de la definición microbiológica (cuadro 15-1).¹⁰ Los actinomicetos aerobios como un todo se ubican taxonómicamente en la clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacteriineae*. El algoritmo de la figura 15-1 muestra las relaciones entre estas bacterias. Aunque la taxonomía y la nomenclatura de estas bacterias cambian continuamente, sigue siendo útil una caracterización fenotípica ad hoc provisoria del grupo (cuadro 15-1).^{10,30,58}

El esquema de la figura 15-1 se basa en pruebas que se realizan comúnmente en los laboratorios de microbiología clínica siempre que sea posible. Los géneros no ácido-alcohol resistentes presentan el máximo problema, porque los análisis de la pared celular necesarios para su identificación se encuentran más allá de la capacidad de la mayoría de los laboratorios clínicos. Los saprófitos más frecuentes aislados en la práctica cotidiana son las especies de *Streptomyces*. Si la bacteria pro-

viene de un paciente con una enfermedad clínicamente compatible, debe ser derivado a un laboratorio de referencia para una identificación completa. Aun dentro del grupo ácido-alcohol resistente la complejidad creciente de las pruebas necesarias estimulará la derivación de muchos aislamientos de importancia clínica. Por lo general, la presencia de una especie de *Mycobacterium* se determina por la ácido-alcohol resistencia completa, la ausencia de bacilos filamentosos y la afección clínica asociada (véase cap. 19).

Brown y McNeil proporcionan un algoritmo diagnóstico diferente, sobre la base del crecimiento en lisozima,¹⁰ mientras que Kiska y cols. han presentado una serie simplificada de pruebas para la identificación de especies de *Nocardia*.⁴³ Los términos definidos en el recuadro 15-1 se utilizan para diferenciar estas bacterias.

Los actinomicetos aerobios se distribuyen en forma amplia en la naturaleza, donde participan en la descomposición de la materia orgánica de origen vegetal.^{33,80} Las cepas aisladas de distintas especies en general provienen del suelo, de los sedimentos marinos y de las heces de diversos animales. Se los debe considerar patógenos oportunistas, que producen infección sobre todo en los individuos cuyos mecanismos de defensa están deprimidos. Sin embargo, estas bacterias han proporcionado algunos de los antibióticos más importantes: estreptomicina (especies de *Streptomyces*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*), macrólidos (especies de *Micromonospora*) y aminoglucósidos (especies de *Micromonospora*). Con mucho, los patógenos más importantes están en el género *Nocardia*, que será estudiado en detalle. Otros géneros se explicarán más brevemente.

Desde un punto de vista práctico, estos microorganismos pueden ser reconocidos en el laboratorio porque forman colonias lisas, firmes, adherentes, cerosas o calcáreas que crecen después de 3 días a 2 semanas de incubación. Pueden tener una pigmentación ocre, rosada, anaranjada o gris. El olor a sótano húmedo o a suelo recién removido es un indicio importante por el cual se los puede reconocer. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 36 °C, tanto en la incubadora de CO₂ (como para el cultivo de micobacterias) como en el aire ambiente (como en las incubadoras utilizadas para el cultivo de hongos). Crecen bien en medios con base de huevo de Lowenstein-Jensen o en agar sintético de Middlebrook y en la mayoría de los medios de aislamiento de hongos que carecen de cicloheximida. La mayoría de los cultivos bacterianos de rutina se mantienen sólo durante 48 horas, de modo que los aislamientos a menudo se hacen en el laboratorio de micobacteriología o de micología.

Todas las especies son grampositivas, aunque las especies de *Nocardia*, en particular, tienden a teñirse con un patrón arrosariado y gramvariable. Por lo tanto, el hallazgo de microorganismos ramificados grampositivos o gramvariables, arrosariados y frágiles (1 µm de diámetro) debe alertar acerca de la posibilidad de un actinomiceto aerobio; las placas de aislamiento deben mantenerse durante 2 a 4 semanas para asegurar el crecimiento. Las características prácticas por las cuales las especies de *Nocardia* son separadas más comúnmente de las especies de *Mycobacterium* en los laboratorios clínicos son la ramificación de las células bacterianas, la ácido-alcohol resistencia “parcial” (reacción ácido-alcohol resistente sólo cuando se utiliza como decolorante un ácido inorgánico en baja concentración en lugar de alcohol ácido) y la detección de un olor a humedad producido por las colonias maduras. Sin embargo, estas propiedades son variables y no siempre fiables. En los casos difíciles, se requiere el análisis de la pared celular o del genoma, pero lamentablemente estas técnicas sólo se encuentran en laborato-

Cuadro 15-1 Grupos fenotípicos de los actinomicetos aerobios

GRUPO FENOTÍPICO	GÉNEROS Y ESPECIES REPRESENTATIVOS
Maduromicetos	Grupo de <i>Actinomadura pusilla</i>
Nocardioformes ^a	Especies de <i>Nocardia</i> Especies de <i>Rhodococcus</i> Especies de <i>Gordonia</i> Especies de <i>Tsukamurella</i> Especies de <i>Dietzia</i> Especies de <i>Mycobacterium</i>
Nocardioides	Especies de <i>Nocardioides</i>
Estreptomicetos	Especies de <i>Streptomyces</i>
Micropolisporas	Especies de <i>Faenia</i> (especies de <i>Micropolispora</i>) ^b Especies de <i>Saccharomonospora</i> ^b Especies de <i>Saccharopolyspora</i> ^b
Termomonosporas	Grupo de <i>Actinomadura madurae</i> Nocardiosis
Otros actinomicetos	Especies de <i>Thermoactinomyces</i> ^b <i>Tropheryma whipplei</i> Especies de <i>Oerskovia</i> Especies de <i>Dermatophilus</i>

^a El grupo nocardioforme contiene ácidos micólicos en las paredes celulares, como las especies de *Corynebacterium*.
^b Especies termofílicas que crecen a temperaturas superiores a 50 °C.

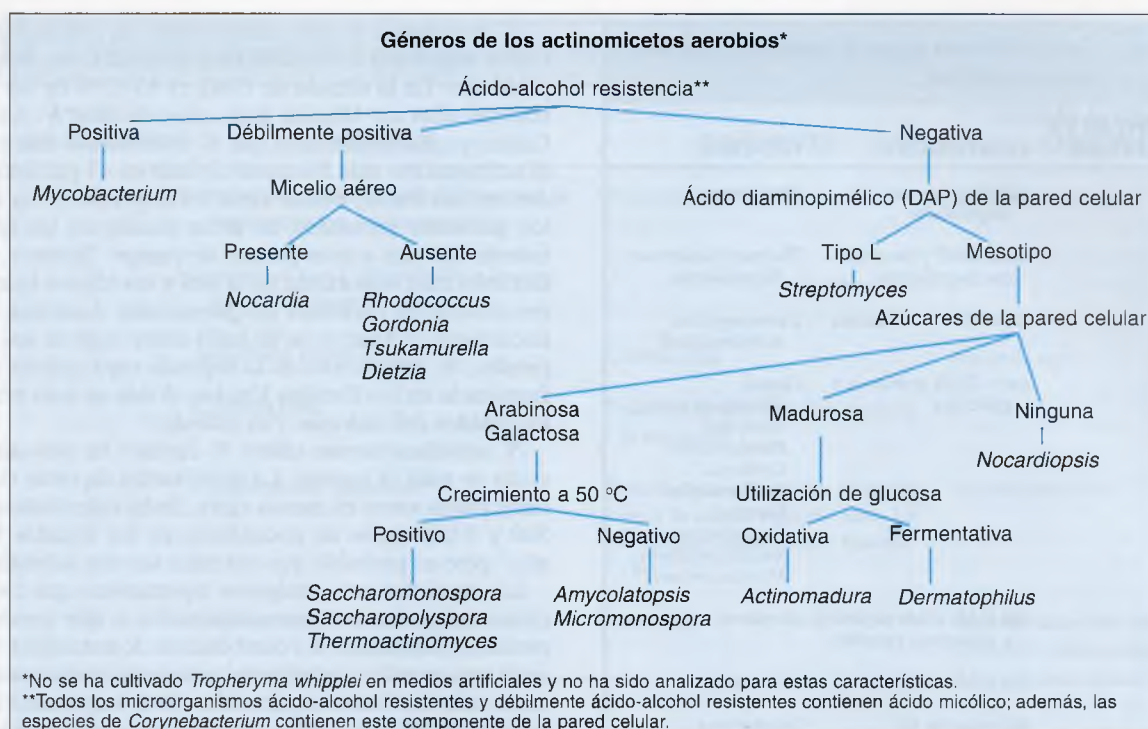


Figura 15-1 Clasificación de los actinomicetos aerobios asociados con enfermedades humanas.

rios de referencia en este punto.^{17,67,80} La composición de la pared celular de los actinomicetos aerobios, útil tanto desde el punto de vista taxonómico como diagnóstico, se detalla en el cuadro 15-2.

Grupo nocardioforme

Nocardia

La taxonomía de *Nocardia*, el género más importante entre los actinomicetos aerobios, es tan confusa (y confundidora) como la del grupo en su totalidad. El aislamiento original de animales infectados con enfermedad granulomatosa (muermo bovino o farcinosis) fue realizado por Nocard en 1888 en la isla de Guadalupe. Más tarde se lo denominó *Nocardia farcinica* y este microorganismo se convirtió en la especie tipo del género. Es instructivo señalar que el aislamiento original consistió en dos cepas que se creyó que eran idénticas. En la actualidad una de las cepas tiene ácidos micólicos característicos de las nocardias, mientras que los ácidos micólicos de los otros son más típicos de las micobacterias.⁵¹

El miembro más importante del género es *Nocardia asteroides*, que fue aislado en una infección humana poco después del aislamiento original de Nocard. *N. asteroides* es también taxonómicamente variable y se lo suele describir como el complejo de *N. asteroides*.⁷⁸ Varios miembros con nombre del complejo, *N. farcinica*, *N. nova* y *N. abscessus*, han sido separados del grupo; a veces se los describe como subgrupos de *N. asteroides*.^{58,80} La separación de *N. farcinica* y *N. nova*, originariamente controversial, fue validada por el reconocimiento de que tienen un perfil muy diferente de sensibilidad a los antibióticos del de *N. asteroides*.⁵⁸ Estas diferencias en la sensibilidad a los antibióticos tienen importancia clínica práctica, así como importancia taxonómica. Algunos especialistas sugieren que

los pacientes no deben ser tratados con cefalosporinas, a la cual *N. farcinica* es resistente, hasta que se hayan realizado las pruebas de sensibilidad.

En un principio, Steingrube y cols. definieron cuatro grupos separados sin nombre, designados tipo I, tipo II, tipo IV y tipo VI.⁸⁸ Utilizaron amplificación de DNA y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RLFP) para caracterizar los productos derivados del gen de la proteína de choque térmico de 65 kDa presente en las cepas. Los distintos grupos muestran diferencias en los perfiles de sensibilidad a los anti-

Recuadro 15-1 Términos utilizados para diferenciar los actinomicetos aerobios

Micelio sustrato: se refiere a las células que crecen sobre la superficie del medio y luego dentro de él. Estos microorganismos característicamente forman células ramificadas ("hifas") que crecen juntas para formar colonias resistentes y correas. Este crecimiento puede denominarse también micelio vegetativo.

Fragmentación: en general, los micelios sustrato de estos microorganismos están compuestos por cadenas de bacilos largos que, con el crecimiento y el envejecimiento, comienzan a "dividirse" en células con forma de bacilos (bacilares) y con forma de cocos (cocoides) individuales.

Hifas aéreas: En realidad, algunas especies producen células que crecen erectas y lejos de la superficie del agar. Se encontrarán hifas aéreas más maduras en el centro de la colonia, y las hifas aéreas más rudimentarias en la periferia. Con el envejecimiento, las hifas aéreas se fragmentan en "esporas" cocoides que dan a las colonias más viejas un aspecto aterciopelado o polvoriento. En una especie (*Dermatophilus congolensis*), las esporas que son producidas en el micelio aéreo son móviles.

Cuadro 15-2 Composición de la pared celular de los actinomicetos aerobios

QUIMIOTIPO DE LA PARED CELULAR ^a	COMPOSICIÓN	GÉNEROS
I	<i>l</i> -DAP y sin azúcares diagnósticos	<i>Streptomyces</i>
II	<i>meso</i> -DAP y sin azúcares diagnósticos	<i>Thermoactinomyces</i> , <i>Nocardiosis</i>
III	<i>meso</i> -DAP y madurosa	<i>Dermatophilus</i> , <i>Actinomadura</i>
IV	<i>meso</i> -DAP, arabinosa y galactosa	<i>Faenia</i> (<i>Micropolyspora</i>), <i>Nocardia</i> ^b , <i>Rhodococcus</i> , ^b <i>Gordonia</i> , ^b <i>Tsukamurella</i> , ^b <i>Dietzia</i> , ^b <i>Saccaromonospora</i> , <i>Saccaropolyspora</i> , <i>Mycobacterium</i>
VI	Sin DAP, ácido aspártico y galactosa (variable)	<i>Oerskovia</i>
NA	Sin DAP y madurosa	<i>Actinomadura</i>
NA	Información no disponible	<i>Tropheryma</i>

^a Las paredes celulares de todos los géneros contienen cantidades importantes de alanina, ácido glutámico, glucosalina y ácido murámico. Ningún patógeno humano importante tiene las características de las paredes celulares tipo I, V, VII u VIII. Para más detalles véanse las referencias^{10,30,50,58}.

^b Ácido nocardomicólico presente.

NA, no aplicable.

bióticos. El tipo IV y los aislamientos de *N. translensis* estudiados fueron resistentes a los aminoglucósidos. Todos, salvo los tipos II y IV, han recibido nombres. Las cepas que se ajustan a la descripción clásica pueden ser designadas *Nocardia asteroides sensu stricto* tipo VI (denominadas de ahí en adelante *N. asteroides*). Cabe señalar que el "tipo VI" en este contexto se refiere al perfil de sensibilidad a los antibióticos, no a los componentes de la pared celular. Se ha propuesto que los aislamientos con un patrón de sensibilidad de tipo VI deben ser denominados *N. cyriacigeorgica*.⁷⁸ Los perfiles de sensibilidad a los antibióticos de los miembros del complejo de *Nocardia asteroides* se detallan en el cuadro 15-3, que incluye la nomenclatura actual. Muchas de las primeras comunicaciones no distinguieron a estos patógenos.

Muchos casos de infecciones invasivas atribuidas a *N. brasiliensis* se adjudican ahora a una especie relacionada, *N. pseudobrasiliensis*.^{79,98} Otras especies que son patógenas para los seres humanos o que han sido aisladas en ellos son *N. otitidiscaviarum*,^{1,14,16,69} *N. transvalensis*,^{28,59} *N. africana*,³⁷ *N. veterana*,^{18,71} *N. paucivorans*,^{23,109} *N. brevicatena*,⁷⁸ *N. arthritidis*,⁴¹ *N. cyriacigeorgica*,¹¹² *N. abscessus*,¹¹¹ *N. punis*¹¹³ y posiblemente otras especies con nombre y sin él.⁴³

EPIDEMIOLOGÍA, ANATOMÍA PATOLÓGICA Y PATOGENIA

N. asteroides, el patógeno aislado más a menudo, está distribuido ampliamente en todos los Estados Unidos,⁸⁰ al igual que *N. farcinica*, que es menos prevalente. *N. nova* parece ser menos frecuente en los estados del sudoeste.

N. brasiliensis es una causa común de infecciones subcutáneas y micetoma en Sudamérica, gran parte de América latina y México. En la década de 1960, el 85-95% de los micetomas comunicados en México eran causados por *N. brasiliensis*.²⁹ Castro y cols. observaron que *N. brasiliensis* era, con mucho, el actinomiceto más frecuente aislado en 41 pacientes observados en San Pablo, Brasil, entre 1978 y 1989.¹³ La mayoría de los pacientes provenían de áreas rurales en las regiones del noreste del país y eran peones de campo. También se observó una infección importante de la piel y los tejidos blandos por *N. brasiliensis* en pacientes de Queensland, Australia, que tenían nocardiosis.²⁸ Aunque se lo halló sobre todo en los países tropicales, *N. brasiliensis* es la segunda cepa aislada con mayor frecuencia en los Estados Unidos, donde es más prevalente en los estados del sudoeste y el sudeste.⁸⁴

N. otitidiscaviarum (antes *N. caviae*) ha sido aislado en el suelo en todo el mundo. La distribución de otras especies aisladas pocas veces es menos clara. Se ha calculado que ocurren 500 a 1 000 casos de nocardiosis en los Estados Unidos por año,⁵ pero es probable que esa cifra sea una subestimación.⁴

Las nocardias son patógenos oportunistas que causan infecciones en pacientes inmunodeprimidos o que presentan enfermedades debilitantes. La combinación de tratamiento corticosteroide prolongado y enfermedad pulmonar crónica se ha sugerido como una combinación particularmente importante de riesgo.⁸⁰ Alrededor del 10% de los pacientes con nocardiosis no tienen ningún defecto subyacente demostrable. Significativamente, las nocardias pueden colonizar la piel y las vías respiratorias. En un estudio australiano, el 20% de las cepas no fueron asociadas con enfermedad clínica.²⁸ Aun el aislamiento de especies de *Nocardia* en los hemocultivos puede no ser importante. De ocho pacientes con bacteriemia por *Nocardia* informados por Esteban y cols., se creyó que *N. asteroides* tenía relevancia clínica sólo en dos; los aislamientos restantes se consideraron insignificantes o de importancia incierta.²⁴ Todos los pacientes se curaron. Estos autores arribaron a la conclusión de que las especies de *Nocardia* pueden constituir un contaminante y la importancia de cualquier aislamiento dado sigue siendo cuestión de juicio clínico.

La forma más grave de nocardiosis es la infección pulmonar crónica, con diseminación a otros órganos o sin ella. La patogenia de la infección con el complejo de *Nocardia asteroides* es tal vez la inhalación de bacterias de transmisión aérea, lo que quizás explique la frecuencia de infección en los estados secos del sudoeste, análogo a *Coccidioides immitis*.⁸⁰ Es probable que la enfermedad cutánea, que incluye el micetoma actinomicótico, sea el resultado de la introducción directa de bacterias después del traumatismo, como el que sucede al caminar descalzo.⁸⁰ Aunque la mayoría de las infecciones se adquieren del medioambiente, se describió la adquisición hospitalaria.¹⁰³

Las especies de *Nocardia* son patógenos intracelulares facultativos. No cabe duda de que su capacidad para crecer en los macrófagos y tal vez también en los neutrófilos polimorfonucleares es importante por su capacidad para provocar infección. Los microorganismos pueden vivir en el interior de los macrófagos al inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y por su capacidad para producir catalasa y superóxido dismutasa, que inactivan el sistema de la mieloperoxidasa de estas células fagocíticas. Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica corren el riesgo de una infección grave por nocardias, al igual que lo tienen para otras bacterias que producen catalasa.²⁰ La respuesta inmunitaria celular es fundamental para el control de la infección, como lo sugieren los estudios experimentales y la aparición de la enfermedad en pacientes con compromiso de la

Cuadro 15-3 Sensibilidad a los antibióticos de 78 aislamientos del complejo de *Nocardia asteroides*

TIPO	% DE AISLAMIENTOS	SENSIBLE	RESISTENTE	CORRELACIÓN ENTRE LAS ESPECIES
I	20	Ampicilina, carbenicilina, cefalosporinas de amplio espectro, imipenem (50%)	Imipenem (50%)	<i>Nocardia abscessus</i>
II	0	Igual que el tipo I, pero sensible a kanamicina y ciprofloxacina		
III	18	Ampicilina, eritromicina	Carbenicilina	<i>Nocardia nova</i>
IV	5	Ciprofloxacina	Todos los aminoglucósidos, incluida la amikacina	
V	17	Ciprofloxacina, imipenem	Todas las penicilinas y las cefalosporinas de amplio espectro, todos los aminoglucósidos excepto kanamicina	<i>Nocardia farcinica</i>
VI	35	Cefalosporinas de amplio espectro	Penicilinas	<i>Nocardia asteroides sensu stricto</i> , <i>Nocardia cyriacigeorgica</i>

inmunidad celular.⁴ Algunos médicos opinan que la infección por nocardias está subrepresentada en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Sin embargo, Beaman señala la cantidad acumulada de informes de casos e infecciones subcomunicadas, y que las variaciones geográficas en las nocardias ambientales, que no se ajustan a los centros de infección por HIV, pueden explicar en parte la discrepancia.⁴ Se obtiene una situación similar probablemente con *Legionella pneumophila*, otro patógeno para el cual la inmunidad celular es fundamental. En ambos casos una población predispuesta de pacientes debe estar en la proximidad de sitios ambientales que albergan las bacterias (véase cap. 10).

Las células bacterianas de las especies de *Nocardia* no suelen observarse en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, y es posible que no se observen en las tinciones del ácido periyódico de Schiff. Se observan con bastante facilidad en las tinciones de metenamina plata de Gomori, Gram-Weigert, Giemsa o tisulares de Gram (p. ej., tinciones de Brown y Brenn o Brown-Hopps). En una tinción de Gram para tejidos, los microorganismos suelen ser bacilos filamentosos ramificados, arrosariados y delgados. La tinción ácido-alcohol resistente de Kinyoun modificada (en la cual la eliminación de la tinción se realiza con H₂SO₄ acuosa al 1% en lugar del ácido-alcohol habitual que se utiliza en el método de Ziehl-Neelsen) es útil para los frotis directos y los cortes congelados, mientras que se recomienda la tinción ácido-alcohol resistente de Fite-Ferraco para los cortes con parafina.^{45,106,107} Con estas cepas, las especies de *Nocardia* son ácido-alcohol resistentes (o "parcialmente ácido-alcohol resistentes"), las especies de *Mycobacterium* son fuertemente ácido-alcohol resistentes, mientras que *Actinomyces israelii* y los otros actinomicetos anaerobios no son ácido-alcohol resistentes.

ENFERMEDAD CLÍNICA

La enfermedad clínica causada por todas las especies del género, denominada nocardiosis, es similar. La infección visceral es una enfermedad aguda, subaguda o crónica, que suele

comenzar en las vías respiratorias.⁵⁸ Las manifestaciones incluyen fiebre, tos productiva con esputo mucopurulento e infiltrados de aspecto variado en las radiografías de tórax que no se resuelven. Puede haber bronconeumonía progresiva, infiltrados localizados o difusos, consolidación extensa, abscesos únicos o múltiples, derrames pleurales, empiema y trayectos fistulosos con afectación de la pared torácica. Se describió la formación de granulomas y la presencia de células gigantes con especies de *Nocardia*, pero en nuestra experiencia los granulomas no son típicos de la afectación pulmonar por estas bacterias.

En general, la infección diseminada se origina en un foco pulmonar, pero también puede ocurrir después de una infección cutánea primaria. La propagación bacteriémica conduce a infección multiorgánica, sobre todo en el encéfalo y la piel.¹⁹ Alrededor del 45% de los pacientes con nocardiosis diseminada tienen infecciones del sistema nervioso central.⁵⁴ El pronóstico es malo, con una tasa de mortalidad del 7-44% global y de hasta un 85% en los pacientes con inmunosupresión grave.⁵⁸ Se ha documentado una infección grave por especies de *Nocardia* en pacientes que tienen enfermedad neoplásica⁹⁴ o síndrome de inmunodeficiencia adquirida⁴⁰ y en receptores de trasplantes renales,¹⁰⁴ entre otros. Los abscesos encefálicos metastásicos, que se desarrollan en alrededor de un tercio de los pacientes, producen cefaleas, alteraciones del sensorio, convulsiones, déficits neurológicos focales u otras anomalías neurológicas. Los hemocultivos (a pesar de la propagación hematogena del microorganismo) y los cultivos de LCR casi nunca pueden demostrar las bacterias.

Es probable que las infecciones cutáneas sean subdiagnosticadas porque a menudo son autolimitadas y es posible que no se hagan estudios microbiológicos adecuados sobre las infecciones superficiales.⁵⁴ Las pústulas, los abscesos, la celulitis y la paroniquia pueden ser el resultado de la introducción traumática de nocardias en la piel. La inflamación se asemeja a la observada en otras infecciones bacterianas, salvo en que tiende a ser menos manifiesta. Cuando el proceso se extiende hasta los ganglios linfáticos regionales, puede asemejarse a la esporotricosis, y se lo llama nocardiosis esporotricóide.⁸³ Si las bacterias

se introducen en el ojo debido a un traumatismo penetrante, puede ocurrir queratitis o endoftalmitis.

Una lesión cutánea clásica, el micetoma, puede ser causada por hongos verdaderos (micetoma eumicótico) o por actinomicetos aerobios (micetoma actinomicótico). (Véase la explicación en la sección sobre "*Actinomadurea*" más adelante).

Aunque la enfermedad producida por varias especies es similar, existen características que las diferencian. Los miembros del complejo de *N. asteroides* causan enfermedad pulmonar y diseminada, pero *N. farcinica* es muy probable que se disemine y *N. nova* lo hace muy pocas veces.⁵⁸ *N. brasiliensis* provoca infecciones cutáneas más a menudo, mientras que *N. pseudobrasiliensis*, más recientemente delineado, tiende a producir una enfermedad diseminada. La información clínica sobre otras especies de nocardias es menos abundante.

Rhodococcus

Rhodococcus equi es el patógeno humano más importante del género. Los otros patógenos humanos, *R. erythropolis*, *R. rhodnii* y *R. rhodochrous* pocas veces se aíslan en muestras clínicas. *R. equi* era conocido como *Corynebacterium equi*. También ha sido llamado "*Mycobacterium rhodochrous*" y ha sido denominado complejo "rhodochrous".³²

EPIDEMIOLOGÍA, ANATOMÍA PATOLÓGICA Y PATOGENIA

R. equi es causa de enfermedad pulmonar en potrillos y otros animales de granja.⁷² Entre 1967 y comienzos de la década de 1980, se informó sólo sobre unas pocas infecciones humanas. Se cree que éstas son resultado del contacto con animales portadores (p. ej., ganado bovino, cerdos, caballos o estiércol de ganado bovino), presumiblemente por la vía respiratoria.⁹⁷ Los rodococos están muy difundidos en el suelo, lo que tal vez explica la infección en personas que no recuerdan el contacto con animales. Takai y cols. señalaron la asociación de rodococos virulentos en el suelo de una estancia en la que se criaban caballos con potrillos enfermos, a diferencia de otra estancia sin casos de enfermedad equina y con menos aislamientos del suelo.⁹²

Las infecciones humanas suelen ocurrir en personas inmunodeprimidas, sobre todo en aquellas con defectos en la inmunidad celular, por ejemplo, pacientes con linfoma, enfermedad de Hodgkin, leucemia o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y luego de trasplantes.^{9,55,97} McNeil y Brown citan más de 100 casos de infecciones por *R. equi* en pacientes con SIDA.⁵⁸

La histopatología de la infección por *Rhodococcus* se asemeja a la de especies de *Nocardia*. Existe inflamación crónica (fundamentalmente de macrófagos) y fibrosis, con interposición de microabscesos.⁵⁸ No se presentan típicamente granulomas caseificados bien formados, como se observan en la tuberculosis. La malacoplauquia, una reacción histológica definida en la cual se encuentran concreciones basófilas laminadas (cuerpos de Michaelis-Gutmann) entre los macrófagos, se describió en casos de infección pulmonar por *Rhodococcus equi*.³⁵

ENFERMEDAD CLÍNICA

Las infecciones clínicas pueden imitar a la tuberculosis, se tornan lentamente progresivas y se cavitan.^{48,81,97} La neumonía invasora con formación de cavitaciones se observa sobre todo en pacientes con SIDA, en los cuales existe una alta propensión a que la infección se disemine hasta el encéfalo, el hígado, el

bazo y otros órganos.⁵⁸ Otras formas de infección son endoftalmitis, osteomielitis, pleuresía con derrame e infección de heridas.

Otras bacterias nocardioformes

Las especies de *Gordonia* (originariamente especies de *Gordona*) fueron clasificadas antes en el género *Rhodococcus*. Es difícil identificar y separar a los miembros de este género entre sí y de géneros relacionados, lo que dificulta la evaluación de la literatura clínica.¹⁰ Se ha aislado *Gordonia aurantiaca* (antes *R. aurantiacus*) en el esputo de pacientes con enfermedad pulmonar crónica,⁹⁶ en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente con leucemia de células pilosas y en una lesión grave de tenosinovitis gangrenosa con múltiples abscesos subcutáneos en una mujer con enfermedad de De Quervain.⁹⁵

Las especies de *Tsakumurella* fueron descritas inicialmente en Japón como agentes de enfermedad pulmonar crónica que se asemejaba a la tuberculosis.¹⁰ Se han informado infecciones pocas veces como enfermedad oportunista en pacientes inmunodeprimidos o que tienen cuerpos extraños.

Se definieron más a menudo las especies de *Dietzia*. La especie tipo, *D. maris* (antes *Rhodococcus maris*) ha sido aislada en el torrente circulatorio de un paciente inmunosuprimido que tenía colocado un catéter intravascular permanente.⁷

Maduromicetos y termomonosporas

Actinomadurea

El género *Actinomadurea* es genéticamente diverso y abarca dos grupos supragenéricos.^{30,58} Una vez más la terminología es confusa y está en transición. Goodfellow sugiere que las especies de *Actinomadurea* deben reservarse para *A. madureae* y especies relacionadas (que incluyen *A. pelletieri*), que desde el punto de vista genético se encuentran más estrechamente relacionadas con el grupo *Thermomonospora*.³¹ Por el contrario, "maduromicetos" se reserva para un grupo natural de bacterias que incluye *A. pusilla* y microorganismos relacionados.³¹ Desde el punto de vista práctico, los principales patógenos humanos, *A. madureae* y *A. pelletieri* forman parte del primer grupo. Los miembros del género *Actinomadurea* contienen meso-DAP en sus paredes celulares (pared celular de tipo IIIB; madurosa es un componente hidrocarbonado importante).³¹

EPIDEMIOLOGÍA

Las especies de *Actinomadurea* son microorganismos del suelo que se introducen a través de la piel por un traumatismo, que puede ser menor. Las infecciones se observan fundamentalmente en países tropicales y subtropicales, lo que puede reflejar en parte la mayor tendencia de las personas que viven en climas más cálidos a caminar descalzas.⁵⁸

ENFERMEDAD CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Los micetomas son lesiones crónicas, penetrantes y progresivamente destructivas que afectan la piel, el tejido subcutáneo y las estructuras subyacentes, como el hueso, el músculo y la fascia. No es sorprendente en las infecciones causadas por microorganismos del suelo, que tiendan a ocurrir sobre los miembros; el pie es un sitio muy frecuente. La inflamación granulomatosa crónica suele conducir a múltiples fístulas secretantes, de las cuales se eliminan gránulos (o granos). El hueso casi siempre

está afectado. Estos gránulos, que miden menos de 1 mm de diámetro, representan colonias del agente infeccioso, y varían de color según la naturaleza del agente infectante, por ejemplo, micetoma de granos blancos.⁵⁴ Microscópicamente, los gránulos consisten en masas de bacterias filamentosas o hifas introducidas en una matriz similar al cemento, que imparte el color que se observa a simple vista. Se puede presentar una reacción inmunitaria, conocida como el fenómeno de Splendore-Hoeppli. La fibrosis suele ser el resultado final del micetoma, aunque no en la medida en que se observa en la actinomicosis causada por *Actinomyces israelii* (véanse caps. 14 y 16).

Los micetomas son causados por hongos verdaderos (micetoma eumicótico) y por actinomicetos aerobios (micetoma actinomicótico). En la jerga coloquial, el micetoma actinomicótico se denomina a veces "pie de Madura". Los agentes etiológicos más frecuentes y sus gránulos asociados se resumen en el cuadro 15-4. En un estudio de 366 aislamientos de actinomicetos aerobios en micetomas remitidos a los Centers for Disease Control (ahora, Centers for Disease Control and Prevention [CDC]) a finales de la década de 1980, *A. madurae* tuvo la segunda incidencia más frecuente luego de *N. asteroides* (11.5% frente a 26%).⁶⁰ La mayoría de las infecciones ocurren en países tropicales, sobre todo en India y Túnez (*A. madurae*) o en Senegal, Chad y Somalia (*A. pelletieri*). Como señalamos, *Nocardia asteroides* causa infecciones en todo el mundo, mientras que *N. brasiliensis* se limita a Sudamérica, América Central y México. Veintitrés de 28 casos probados por cultivo de micetoma actinomicótico en los Estados Unidos ocurrieron en los estados del sur y el oeste, incluidos 11 de Texas y 3 cada uno de California y Florida.⁹³

Aunque casi todas las infecciones por *A. madurae* son superficiales, se han comunicado infecciones sistémicas en pacientes con inmunodeficiencia. Se informó de un caso de peritonitis por *A. madurae* en un paciente sometido a diálisis peritoneal continua.¹⁰⁸ La infección diseminada ocurrió en un paciente con SIDA que también era un consumidor habitual de heroína.⁶²

Nocardiosis

Nocardiosis dassonvillei, la especie más importante del género, forma cadenas en zigzag de esporas dentro de una estructura similar a una vaina y tiene una pared celular de tipo III (meso-DAP) sin azúcares diagnósticos. El género *Nocardiosis* fue separado del género *Actinomadura* para esta-

blecer una categoría para los microorganismos relacionados que carecen del hidrato de carbono maduro de la pared celular. *N. dassonvillei*, comúnmente un saprófito del suelo, ha sido aislado en animales y pocas veces en infecciones humanas, sobre todo en micetomas.¹⁰ En 1997 Yassin y cols. comunicaron el aislamiento de una especie nueva, *N. synnemataformans* en el esputo de un receptor de trasplante renal;¹¹⁰ el papel de esta especie nueva en la enfermedad humana es poco claro.

Streptomicetos

Streptomyces

Las especies de *Streptomyces* son microorganismos del suelo que tienen una importancia considerable en la industria y el campo farmacéutico. Algunas especies que causan infecciones humanas han sido aisladas en esputo y otras secreciones respiratorias, en heridas superficiales, piel y otras muestras. En un estudio de 366 aislamientos de actinomicetos aerobios en micetomas clínicos remitidos para su estudio a los CDC a finales de la década de 1980, sólo *N. asteroides* y *A. madurae* fueron aislados más a menudo que las especies de *Streptomyces*.⁶⁰ *S. somaliensis*, que causa micetoma actinomicótico, tiene una distribución casi mundial y ha sido aislado en casos de micetoma en Arabia Saudita, Nigeria, Níger, Sudán, Somalia, Sudáfrica, Venezuela, India y México.⁵⁸ En una alta proporción de estos casos se afectaron la cabeza y el cuello, produciendo lo que se conoce como "cráneo de Madura". Hasta 1981, los estreptomicetos no habían sido aislados en micetomas en los Estados Unidos.⁹³ Los granos de los micetomas por estreptomicetos son grandes (2 a 4 mm) y pardo amarillentos. *Streptomyces anulatus* (antes *S. griseus*), un microorganismo que causa micetomas subcutáneos en felinos y delfines, también ha sido aislado en micetomas humanos.

Actinomicetos termófilos

Los actinomicetos termófilos provocan enfermedad humana, pero pocas veces se encuentran en el laboratorio de microbiología clínica, porque causan reacciones alérgicas en lugar de infecciones productivas. En 1963 Pepys y cols. denominaron a la fuente antigénica del heno mohoso como *Saccharopolyspora rectivirgula*.⁶⁸ Con posterioridad, se reconoció a *Thermoac-*

Cuadro 15-4 Agentes etiológicos de los micetomas

MICETOMA DE GRANOS BLANCOS (EUMICÓTICOS)	MICETOMA DE GRANOS NEGROS (EUMICÓTICOS)	MICETOMA DE GRANOS BLANCOS/AMARILLOS (ACTINOMICÓTICOS)	MICETOMAS DE GRANOS PARDO/ROJIZOS (ACTINOMICÓTICOS)
Especies de <i>Acremonium</i>	Especies de <i>Curvularia</i>	<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Actinomadura pelletieri</i>
Especies de <i>Aspergillus</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>
<i>Corynespora cassicola</i>	Especies de <i>Leptosphaeria</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	
Especies de <i>Fusarium</i>	Especies de <i>Madurella</i>		
<i>Neotestudina rosatii</i>	<i>Phialophora cyanescens</i>		
<i>Pseudodallescheria boydii</i>	<i>Plenodomus arramii</i>		
<i>Pseudochaetophoronema larense</i>	Especies de <i>Pyrenochaeta</i>		

Adaptado de referencia¹⁵.

tinomyces vulgaris como una fuente adicional de alérgenos. La enfermedad clínica, el pulmón del granjero, es un ejemplo de neumonitis por hipersensibilidad o neumonitis alérgica extrínseca. La enfermedad puede ser crónica y discapacitante, con deterioro de la función pulmonar hasta que se evita o elimina el agente desencadenante. Otros cuadros similares se producen luego de la exposición a mohos contenidos en compost, caña de azúcar (bagasosis), acondicionadores de aire o conductos de ventilación.¹⁰ Son responsables varios miembros de los géneros *Saccharopolyspora*, *Micropolyspora* (*Faenia*) y *Thermoactinomyces*. La taxonomía de estos microorganismos ha sufrido múltiples cambios a través de los años.

Otros actinomicetos

Oerskovia

Las dos especies más importantes de *Oerskovia* son *O. turbata* y *O. xanthineolytica*. Después de cierta controversia taxonómica referente a la relación de estos microorganismos con el género *Cellulomonas*, el género *Oerskovia* ha sido reconstituido con *O. turbata* como especie tipo.⁸⁷ Estas bacterias eran clasificadas como grupos corineformes A-3 y A-4 (*O. turbata*) y A-1 y A-2 (*O. xanthineolytica*) de los CDC.⁸⁶ Son bacilos grampositivos aerobios que se encuentran en el suelo. Sottnek y cols. describieron las características de 57 aislamientos clínicos, que pertenecían al género *Oerskovia*, que habían sido derivados a los CDC desde los laboratorios del hospital y salud pública de todo el país.⁸⁶ Cinco de ellos provenían de válvulas cardíacas o de otras localizaciones cardíacas, nueve provenían de la sangre, uno era de LCR y los restantes provenían de sitios como orina, heridas traumáticas y quirúrgicas, secreción ocular, líquidos pleurales y quistes pilonidales. Las especies de *Oerskovia* han causado infección intrahospitalaria luego de la contaminación de líquidos para nutrición parenteral doméstica³⁶ y han sido responsables de endocarditis bacteriana,⁷⁶ bacteriemia asociada con catéteres,⁵³ infección de articulaciones protésicas³⁸ e infección de diálisis peritoneal.⁷⁷

Dermatophilus

Dermatophilus congolensis es un actinomiceto interesante que produce una dermatitis exudativa pustulosa conocida como dermatofilia (también denominada gomosis o putrefacción del pie, queratólisis con depresiones o estreptotricosis) en muchas especies de animales (entre ellas, ganado bovino, ovejas, caballos, cabras, ciervos, cerdos, ardillas y gatos domésticos). Pocas veces causa enfermedad en los seres humanos. Se desconoce el modo exacto de transmisión, aunque la mayoría de las infecciones ocurren luego del contacto directo con materiales infectados y posiblemente por las picaduras de ectoparásitos e insectos voladores. Las ocupaciones y las diversiones que aparecen con riesgo particular son fundamentalmente aquellas que involucran un contacto estrecho con animales, como veterinarios, trabajadores de mataderos y cazadores.¹⁰ Los patólogos pueden encontrar estos microorganismos dentro de los folículos pilosos o las capas de queratina de las plantas de los pies en formas de masas de filamentos tabicados, ramificados, no ácido-alcohol resistentes.

Tropheryma whipplei

HISTORIA Y TAXONOMÍA

Esta bacteria es el último agregado a los actinomicetos aerobios, pero la enfermedad asociada, la lipodistrofia intestinal

(enfermedad de Whipple), fue descrita por primera vez en 1907 por George Whipple. Se habían identificado bacterias en los tejidos afectados mediante microscopía óptica y electrónica, pero la naturaleza del agente etiológico siguió siendo un misterio hasta 1991, cuando Wilson y cols. utilizaron amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación de RNA 16S en una biopsia duodenal de un paciente con enfermedad de Whipple para dilucidarla.⁵⁷ El aspecto morfológico de las bacterias en el tejido no se consideró típico de los bacilos grampositivos o gramnegativos, tal vez debido a la localización intracelular de los microorganismos.⁵⁷ Sin embargo, mediante análisis molecular, el microorganismo se ajusta a la familia de los grampositivos, más estrechamente relacionado con *Rothia*,⁵⁷ *Rhodococcus*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*, menos estrechamente relacionado con las micobacterias.¹⁰⁵ Casi una década más tarde, la bacteria fue cultivada en fibroblastos humanos⁷⁴ y denominada *Tropheryma whipplei* (designación enmendada de *T. whippelii* original).⁴⁶ En la actualidad, se ha secuenciado por completo el genoma de *T. whipplei*, lo que proporciona nociones útiles sobre su naturaleza.⁸ La bacteria tiene un genoma sorprendentemente pequeño, que demuestra las características de otras bacterias intracelulares que requieren aminoácidos externos y son deficientes en metabolismo energético. No obstante, la cantidad de material genético dedicado a codificar estructuras de superficie es bastante grande, lo que sugiere que las interacciones entre el exterior de las bacterias y el huésped son fundamentales para su supervivencia. Por último, existe considerable variabilidad genética (que incluye la variación de fase), que puede ser ventajosa para la adaptación a los medioambientes intracelulares cambiantes.⁸

ECOLOGÍA

El lugar de *T. whipplei* en la naturaleza se desconoce. Se lo ha detectado en heces humanas y en aguas servidas, pero no está claro si el ácido nucleico era una fuente de infección para el hombre o si era el resultado de la excreción por los individuos infectados.⁵⁷ Se ha comunicado la detección de ácidos nucleicos mediante técnicas de amplificación en la saliva humana⁹¹ y en secreciones gástricas.²² Ha sido hallado en muestras de biopsia duodenal de pacientes que no tienen enfermedad de Whipple,²² aunque otros investigadores observaron DNA sólo rara vez en ausencia de pruebas clínicas de la enfermedad.⁵⁶ Por lo tanto, es posible que los seres humanos sean reservorios de las bacterias, pero no hay otra opinión clara sobre eso. Los problemas potenciales con la especificidad de los procedimientos de amplificación y la presencia de enfermedad de Whipple extraintestinal sin afectación manifiesta del intestino³⁴ complican el análisis.

ENFERMEDAD CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

La enfermedad de Whipple es una enfermedad multisistémica crónica rara.^{21,57} La tríada clásica de diarrea, pérdida de peso y malabsorción refleja la frecuencia con la cual se afecta el tubo digestivo. También se afectan otros sistemas orgánicos, sobre todo articulaciones y sistema nervioso (recuadro 15-2). El corazón también puede estar afectado y *T. whipplei* es una causa de endocarditis bacteriana con cultivos negativos.^{25,34}

La patogenia de la enfermedad de Whipple se conoce poco. Es probable que sean importantes los defectos en la inmunidad celular o la función de los macrófagos, pero parecen ser específicos para este agente, ya que los pacientes no suelen estar infectados por otros patógenos oportunistas.

Recuadro 15-2 Sitios extraintestinales de la enfermedad de Whipple: análisis de 52 casos^a

Sitio extraintestinal	Nº (%) de casos
Articulaciones	43 (83)
Sistema nervioso	11 (21)
Piel y mucosas	9 (17)
Corazón y vasos sanguíneos	9 (17)
Pulmón y pleura	7 (13)
Ojo	5 (10)

^a Múltiples sitios afectados en algunos pacientes.
Adaptado de la referencia²¹.

T. whipplei es un patógeno intracelular facultativo. Como es cierto para otras bacterias de esta categoría, el sello patológico de la infección es el macrófago. Los macrófagos espumosos, que contienen muchas bacterias dentro de vacuolas, eran responsables de los quilíferos amarillos que George Whipple observó en el intestino delgado. Las bacterias en estas células pueden ser teñidas por el método de ácido peryódico de Schiff, pero esta técnica no es específica. Otras bacterias, sobre todo el complejo *Mycobacterium avium* y *Rhodococcus equi*, pueden causar un cuadro similar. Las tinciones ácido-alcohol resistentes pueden ayudar con la diferenciación, ya que *T. whipplei* no es ácido-alcohol resistente. Por último, se necesita la tinción inmunológica de tejidos, cultivo o amplificación de ácidos nucleicos para los casos difíciles. En los tejidos extraintestinales pueden observarse granulomas similares al sarcoide y no caseificados.⁵⁷

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por actinomicetos aerobios

Aislamiento primario

N. asteroides y otros actinomicetos aerobios son microorganismos aerobios que crecen en distintos medios bacteriológicos, que incluyen agar sangre, agar infusión de encéfalo y corazón o agar dextrosa de Sabouraud sin antibióticos (son inhibidos por cloranfenicol, penicilina y estreptomycinina) y en medios designados para el aislamiento de micobacterias. *N. asteroides* crece bien a 25 °C, a 35 a 37 °C y a 42 a 45 °C. La incubación a una temperatura más alta permite su crecimiento, mientras que muchas otras bacterias serán inhibidas. El crecimiento puede llevar de 4 días a 6 semanas de incubación y es aumentado por la incubación en CO₂ al 10%. Los aislamientos a menudo se hacen en los laboratorios de microbiología o micobacteriología, porque los cultivos han sido incubados durante un período suficientemente prolongado.

Las especies de *Nocardia* pueden ser aisladas en muestras contaminadas utilizando el medio de Thayer-Martin (MTM) modificado.⁶⁵ Shawar y cols. aprovecharon la capacidad peculiar de crecimiento con parafina como única fuente de carbono para crear un medio selectivo y químicamente definido que contenía parafina (técnica de cebado con parafina).⁸² Mediante esta técnica, se inserta una varilla de vidrio recubierta con parafina en un caldo libre de carbono mezclado con la muestra de esputo. En los cultivos positivos, el crecimiento aparece sobre la varilla inmediatamente por encima de la superficie del caldo.

Asimismo, Ayyar y cols. observaron que el agar parafina era un medio selectivo poco costoso para las especies de *Nocardia* y era superior a MTM o a la técnica de cebado con parafina.²

El medio selectivo de agar extracto de levadura-carbón amortiguado (BCYE, utilizado comúnmente para el aislamiento de especies de *Legionella* en muestras respiratorias) también facilita el aislamiento de especies de *Nocardia* en el esputo y otras muestras que pueden estar contaminadas con bacterias mixtas.^{27,42} El uso del agar selectivo BYCE, al cual se ha agregado polimixina B, anisomicina y vancomicina, y el pretratamiento de la muestra con un lavado ácido mejoró el aislamiento de las especies de *Nocardia* desde el 8% al 33% para el primero y al 67% para el último.⁴²

N. asteroides sobrevive al procedimiento de digestión habitual con *N*-acetil-L-cisteína (sin NaOH) que se utiliza para aislar micobacterias en el esputo o los lavados bronquiales.⁶⁴ Se ha recomendado realizar los cultivos de estas muestras para el aislamiento de especies de *Nocardia* tanto antes como después del procedimiento de digestión, aunque este enfoque duplica el trabajo. Las colonias en los medios de Löwenstein-Jensen (LJ) a menudo se desarrollan en 1 a 2 semanas. Pueden tener un aspecto similar a las micobacterias atípicas (véase cap. 19). Sin embargo, las especies de *Mycobacterium* no producen hifas aéreas y difieren bioquímicamente de las nocardias. Las hifas ramificadas de *Nocardia*, las cuales no siempre pueden verse en los extendidos preparados a partir del crecimiento en medios sólidos, a veces se demuestran por el crecimiento en cultivos en caldo, mientras que las micobacterias no suelen ramificarse (aun cuando los bacilos pueden ser alargados). Una excepción que vale la pena mencionar es *Mycobacterium fortuitum*, del cual se ha observado que produce filamentos ramificados en frotis de pus y puede producir colonias filamentosas.

Diferenciación de *Nocardia* de otros géneros de actinomicetos aerobios

Las infecciones de los seres humanos por los géneros *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Rhodococcus*, *Actinomadura*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Oerskovia* y *Dermatophilus* parecen ser raras en los Estados Unidos, aunque faltan buenos datos sobre su incidencia. En los cuadros 15-5 y 15-6 se presentan algunas características que pueden ayudar a diferenciar entre los géneros de los actinomicetos aerobios y otras bacterias relacionadas y dentro de ellos. En el recuadro 15-1 se proporciona un breve glosario de los términos utilizados en la diferenciación de los actinomicetos.

Se puede sospechar la presencia de especies de *Nocardia* y *Streptomyces* sobre la base de algunas características simples. Las colonias típicas de ambas especies son de consistencia seca a cretácea, habitualmente apiladas o plegadas y su color varía de amarillo a blanco grisáceo (véase lámina en color 15-1A). Las especies de *Nocardia* suelen tener cierto sombreado amarillo, mientras que las de *Streptomyces* son más a menudo blanco grisáceas. Ambos grupos producen colonias con un olor intenso a sótano húmedo (probablemente porque los sótanos son "fábricas" de *Streptomyces*). Las colonias de *Rhodococcus equi* carecen del olor húmedo y a menudo tienen un color rosado o salmón en medios de agar (lámina en color 15-1B).

En condiciones típicas, la tinción de Gram del material de una colonia muestra filamentos ramificados y delicados de no más de 1 µm de diámetro (véase lámina en color 15-1C). Las especies de *Nocardia* son parcialmente ácido-alcohol resistentes (no pierden el color cuando son tratadas con H₂SO₄ al 1% o HCl al 3%, pero sí cuando se aplica el decolorante de alcohol ácido más activo en las tinciones de Ziehl-Neelsen o de

Cuadro 15-5 Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación de actinomicetos aerobios seleccionados de importancia clínica										
MICROORGANISMO	ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE MODIFICADO	CRECI- MIENTO EN LISOZIMA	OPACIFI- CACIÓN DE MIDDLEBROOK	CRECIMIENTO A 45 °C EN 3 DÍAS	DESCOMPOSICIÓN DE				HIDRÓLISIS DE	
					Caseína	Tirosina	Xantina	Hipoxantina	UREASA	GELATINA
<i>Nocardia asteroides</i>	+	+	—	V	—	—	—	—	+	—
<i>Nocardia brasiliensis</i>	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (<i>N. caviae</i>)	+	+	—	V	—	—	+	+	+	—
<i>Nocardia transvalensis</i>	+	+	—	—	—	—	—	+	+	—
<i>Nocardia farcinica</i>	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—
<i>Nocardia nova</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	V	—
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	+	+	—	—	+	+	—	+		+
<i>Rhodococcus equi</i>	+	—	ND	ND	ND	—	—	—	ND	ND
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	+	ND	ND	ND	—	—	—	ND	ND
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	+	+	ND	ND	ND	+	—	—	ND	ND
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	+	—	ND	ND	ND	—	—	—	ND	ND
<i>Gordonia bronchialis</i>	+	—	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND
<i>Gordonia rubropertincta</i>	+	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Gordonia sputi</i>	+	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Gordonia terrae</i>	+	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tsukamurella inchoensis</i>	+	+	ND	ND	+	—	—	+	ND	ND
<i>Tsukamurella paurometabola</i> (<i>Rhodococcus aurantiacus</i>)	+	+	ND	ND	—	—	—	—	+	ND
<i>Tsukamurella pulmonis</i>	+	+	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND
<i>Tsukamurella strandjordae</i>	+	+	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND
<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	+	+	ND	ND	—	+	+	+	ND	ND
<i>Tsukamurella wratislaviensis</i>	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND
<i>Dietzia (Rhodococcus) maris</i>	—	—	ND	ND	—	—	—	—	+	ND
<i>Dermatophilus</i> , especies	—	ND	ND	ND	+	—	—	ND	+	+
<i>Oerskovia turbata</i>	—	—	ND	—	+	—	—	—		+
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	—	—	ND	V	+	—	+	+	ND	ND
<i>Actinomadura madurae</i>	—	—	ND	ND	+	+	—	+	—	+
<i>Actinomadura pelletieri</i>	—	—	ND	ND	+	+	—	+	—	+
<i>Streptomyces somaliensis</i>	—	—	ND	ND	+	+	—	—	—	+
<i>Streptomyces griseus</i>	—	—	ND	ND	+	+	+	+	V	+
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	—	—	ND	ND	+	+	+	+	+	+

Cuadro 15-5 Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación de actinomicetos aerobios seleccionados de importancia clínica (cont.)

MICROORGANISMO	UTILIZACIÓN COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO DE										
	Adonitol (Ribitol)	L-arabinosa	Citrato	L-eritritol	D-galactosa	D-glucosa	L-mioinositol	D-manitol	L-ramnosa	D-sorbitol	D-trehalosa
<i>Nocardia asteroides</i>	–	–	V	–	V	+	–	–	V	–	V
<i>Nocardia brasiliensis</i>	–	–	+	–	+	+	+	+	–	–	+
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (<i>N. caviae</i>)	–	V	–	–	–	+	+	V	–	–	V
<i>Nocardia transvalensis</i>	V	–	+	V	V	V	V	V	–	V	+
<i>Nocardia farcinica</i>	–	–	–	+	–	+	–	–	+	–	–
<i>Nocardia nova</i>	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	V
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	–	–	+	–	+	+	+	+	–	–	+
<i>Rhodococcus equi</i>	ND	ND	–	ND	+	ND	–	–	V	–	ND
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ND	ND	+	ND	V	ND	+	+	–	+	ND
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	ND	ND	V	ND	+	ND	–	+	–	–	ND
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ND	ND	V	ND	V	ND	–	+	–	+	ND
<i>Gordonia bronchialis</i>	ND	ND	–	ND	–	ND	+	–	–	–	ND
<i>Gordonia rubropertincta</i>	ND	ND	+	ND	+	ND	–	+	–	+	ND
<i>Gordonia sputi</i>	ND	ND	–	ND	+	ND	–	+	–	+	ND
<i>Gordonia terrae</i>	ND	ND	+	ND	+	ND	–	+	+	+	ND
<i>Tsukamurella incheonensis</i>	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	ND	+	ND
<i>Tsukamurella paurometabola</i> (<i>Rhodococcus aurantiacus</i>)	ND	ND	+	ND	ND	ND	–	–	ND	–	ND
<i>Tsukamurella pulmonis</i>	ND	ND	–	ND	ND	ND	–	+	ND	+	ND
<i>Tsukamurella strandjordae</i>	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	ND	+	ND
<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	ND	ND	V	ND	ND	ND	+	+	ND	+	ND
<i>Tsukamurella wratislaviensis</i>	ND	ND	–	ND	ND	ND	+	+	ND	+	ND
<i>Dietzia (Rhodococcus) maris</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Dermatophilus</i> , especies	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Oerskovia turbata</i>	ND	ND	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Actinomadura madurae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
<i>Actinomadura pelletieri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	–	–	–	+
<i>Streptomyces somaliensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	–	–	–	–
<i>Streptomyces griseus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	–	–	–	–
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	–	+	+	+

+, positiva; –, negativa; V, variable; ND, no disponible.

Cuadro 15-6 Características diferenciales adicionales: *Nocardia*, otros actinomicetos y géneros relacionados que pueden encontrarse en el laboratorio clínico

GÉNERO	RELACIÓN CON EL OXÍGENO ^a	MICELIO AÉREO ^b	CONIDIAS	FILAMENTOS RAMIFICADOS (MICROSCÓPICOS)	FRAGMENTACIÓN DE LOS MICELIOS EN LOS CULTIVOS MÁS ANTIGUOS ^d	CATALASA	FUERTEMENTE ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE ^e	PARCIALMENTE ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE/ Y ARILSULFATASA ^f POSITIVO	MOTI- LIDAD ^g
<i>Actinomadura</i>	A	+	+	+	—	+	—	—	—
<i>Actinomyces</i>	AE, F, M	—	—	+	—	D ^h	—	—	—
<i>Arcanobacterium</i>	A, F	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bacterionema</i>	A, F	—	—	+	—	+	—	—	—
<i>Bifidobacterium</i>	AE	—	—	+ ^c	—	—	—	—	—
<i>Corynebacterium</i>	A, F	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>Dermatophilus</i>	A, M	—	—	+	—	+	—	—	+
<i>Mycobacterium</i>	A	—	—	+ ^c	—	+	+	+	—
<i>Nocardia</i>	A	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>Nocardiosis</i>	A	+	+	+	D	+	—	—	—
<i>Oerskovia</i>	A, F	—	—	+	+	D	—	—	+
<i>Propionibacterium</i>	AE, F, M	—	—	+ ^c	—	D	—	—	—
<i>Rhodococcus</i>	A	—	—	+	+	+	—	+	—
<i>Rothia</i>	A, M	—	—	+	+	+	—	—	—
<i>Streptomyces</i>	A	+	+	+	—	+	—	—	—

^aRelación con oxígeno: A, aerobio; F, anaerobio facultativo; M, microaerófilo; AE, aerobio estricto.^bMicelio aéreo: +, producido de forma persistente o transitoria; —, no producido.^cFilamentos ramificados (microscópicos): las células bifurcadas que comúnmente producen *Bifidobacterium* no se consideran verdaderas ramas. La mayoría de las cepas de *Propionibacterium* aisladas clínicamente no se ramifican; las cepas ocasionales que se ramifican podrían ser confundidas con *Actinomyces* o *Arachnia*. La mayoría de las cepas de *Mycobacterium* halladas clínicamente no se ramifican. Sin embargo, *M. fortuitum*, un microorganismo de rápido crecimiento, puede formar hifas ramificadas y asemejarse a *Nocardia*.^dFragmentación del micelio en cultivos más antiguos; los filamentos tienden a dividirse en elementos bacilares o cocoides cortos. *Dermatophilus congolensis*, parásito de la piel y agente de la dermatitis exudativa en los animales (pocas veces en los seres humanos), forma filamentos miceliales que se dividen tanto transversal como longitudinalmente para formar grupos de hasta ocho células cocoides móviles.^eLas especies de *Mycobacterium* son fuertemente ácido-alcohol resistentes cuando son teñidas con Ziehl-Neelsen, auramina-rodamina o tinciones de Kinyoun modificadas. Por el contrario, las especies de *Nocardia* y las especies de *Rhodococcus* son sólo débil o parcialmente ácido-alcohol resistentes y sólo se tiñen con una tinción ácido-alcohol resistente modificada (véase el texto).^fParcialmente ácido-alcohol resistente: positiva sólo cuando se utiliza una baja concentración de ácido inorgánico (p. ej., ácido sulfúrico al 1%) en lugar de alcohol ácido; la tinción de las bacterias a menudo es irregular con segmentos no teñidos.^gPrueba de la arilsulfatasa (3 días). Véase capítulo 19.^hD, *Actinomyces viscosus* y dos especies de importancia no médica, *A. howellii* y *A. hordeovulneris*, constituyen las únicas especies de *Actinomyces* que son catalasa positivas.

—, 90% o más de cepas negativas; +, 90% o más de cepas positivas; D, 11-89% de cepas positivas.

Datos tomados de Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Williams, 1986; Buchanan RE, Gibbons NE: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. 8. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974 y Rippon JW. *Medical Mycology*. Ed. 2. Filadelfia: Saunders, 1982.

Recuadro 15-3 Tinción ácido-alcohol resistente modificada para especies de *Nocardia*

1. Realizar un frotis del microorganismo de los medios de crecimiento y fijar con calor.
2. Irrigar el portaobjetos con carbolfucsina de Kinyoun durante 5 minutos.
3. Verter el exceso de tinción.
4. Realizar la decoloración con una solución acuosa al 1% de ácido sulfúrico.
5. Lavar con agua corriente.
6. Realizar la contratinción con azul de metileno durante un minuto.
7. Enjuagar con agua y secar. Examinar con microscopio de inmersión en aceite.

Kinyoun) (recuadro 15-3). Por el contrario, las especies de *Streptomyces* no son parcialmente ácido-alcohol resistentes. Se puede aumentar la tinción ácido-alcohol resistente haciendo crecer el microorganismo en ciertos medios, como agar de Middlebrook 7H11 o agar caseína (véase luego la explicación de las técnicas de identificación). Si el microorganismo desconocido no es ácido-alcohol resistente, se puede hacer un informe de "actinomiceto aerobio no ácido-alcohol resistente", pero ese informe debe ser diferido hasta que se realicen intentos adecuados para reforzar la ácido-alcohol resistencia.

Las especies de *Rhodococcus* no forman los filamentos largos observados en los aislamientos de *Nocardia* y *Streptomyces*. Son bacilos grampositivos que pueden agruparse como caracteres chinos, lo que refleja su hogar taxonómico anterior en el género *Corynebacterium* (lámina en color 15-1D). Los aislamientos a menudo son parcialmente ácido-alcohol resistentes (lámina en color 1-E).

El crecimiento en presencia de lisozima es útil para identificar las especies de *Nocardia* (véase cuadro 15-5), sobre todo las cepas que no son ácido-alcohol resistentes. Todas las especies de *Nocardia* son resistentes a lisozima y crecen en su presencia en 5 a 20 días. Se debe realizar un tubo de control de caldo de glicerol sin lisozima y tanto controles positivos como negativos con cada prueba. La prueba se efectúa como se explica en el recuadro 15-4.

La capacidad diferencial de las distintas nocardias y los actinomicetos aerobios relacionados para hidrolizar caseína, tirosina, xantina e hipoxantina es uno de los puntos fundamentales

Recuadro 15-4 Prueba de la lisozima para la identificación de las especies de *Nocardia*

1. Preparar caldo de glicerol agregando 5 g de peptona y 70 mL de glicerol a 1 000 mL de agua destilada (reducir proporcionalmente las cantidades si se desean cantidades más pequeñas). Esterilizar con autoclave a 15 psi durante 15 minutos.
2. Preparar una solución de lisozima disolviendo 100 mg de polvo de lisozima en 100 mL de HCl 0,01 N.
3. Combinar 95 mL de caldo de glicerol con 5 mL de solución de lisozima y dividir en alícuotas de 5 mL en tubos con tapa a rosca. Utilizar alícuotas de 5 mL de caldo de glicerol sin lisozima para el control del crecimiento.
4. Preparar una suspensión diluida del microorganismo desconocido en solución salina estéril. Utilizando una pipeta Pasteur, inocular 1 o 2 gotas en el tubo con lisozima y el tubo de control (mantener el inóculo diluido).
5. Incubar a 25 °C. Examinar cada tubo para detectar crecimiento en 7 a 14 días. El crecimiento aparece como una película sobre la superficie, como un sedimento o como ambos. Los tubos pueden ser sacudidos suavemente para observar partículas similares a migas de pan en los tubos que muestran un crecimiento positivo.
6. Un microorganismo resistente a la lisozima crece tanto en el tubo con lisozima como en el tubo control; un microorganismo que es sensible crece sólo en el tubo control.

de los protocolos de identificación en la mayoría de los laboratorios clínicos. El procedimiento se describe en el protocolo 15-1 y los patrones de reacción se muestran en el cuadro 15-5. Las placas diferenciales se inocularon con el microorganismo desconocido hasta durante 3 semanas a 30 °C y se observó la presencia de hidrólisis (aclaración del medio que rodeaba a las colonias). En la figura 15-2 se muestra un ejemplo de la hidrólisis de caseína por una colonia de especies de *Streptomyces*. La diferenciación de ciertas especies no se puede lograr sólo con el análisis de la hidrólisis. Puede ser necesaria la caracterización de la capacidad para descomponer hidratos de carbono o utilizarlos como única fuente de carbono.^{10,63} La diferenciación entre *Nocardia farcinica* y *N. asteroides* se ve facilitada por el análisis de la temperatura del crecimiento,¹² por la capacidad para opacificar los medios de Middlebrook 7H10 o 7H11 (cuadro 15-5)^{12,26,43} y por el perfil de sensibilidad a los antibióticos (véase cuadro 15-10).⁸⁵ Se describió una reacción en cadena de la polimerasa, en la cual se amplifica una secuencia de DNA específica de especie para *N. farcinica*.¹¹

Cuadro 15-7 Pruebas claves para la diferenciación entre las especies de *Nocardia*

MICROORGANISMO	PRUEBA O CARACTERÍSTICA
<i>Nocardia nova</i>	Positiva para arilsulfatasa
<i>Nocardia farcinica</i>	Opacificación de agar de Middlebrook
<i>Nocardia brasiliensis</i> y <i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	Licuefacción de gelatina
<i>Nocardia transvalensis</i> , <i>Nocardia asteroides</i> tipo IV, <i>Nocardia brevicatena</i>	Patrón de asimilación de azúcar de levadura en API 20C
<i>Nocardia nova</i> , <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Nocardia brevicatena</i>	Patrón de sensibilidad a gentamicina, tobramicina, amikacina y eritromicina

Tomado de la referencia⁴³.



Figura 15-2 Placa de agar caseína que muestra la acción hidrolítica de dos especies de *Streptomyces*.

Mishra y cols. han diseñado un esquema para la diferenciación más detallada de las nocardias y los estreptomicetos que se presenta en el cuadro 15-5.⁶³ Su cuadro diferencial es particularmente útil, ya que enumera los porcentajes de cepas positivas para una gran serie de pruebas bioquímicas, las características morfológicas y las características fisiológicas. Más recientemente, Kiska y cols. han sugerido pruebas que tienen un uso particular para la diferenciación de las especies de *Nocardia* (cuadro 15-7).⁴³ Estos autores idearon un algoritmo eficaz que utiliza patrones de sensibilidad a los antibióticos, utilización de citrato, utilización de acetamida y asimilación de dos azúcares (inositol y adonitol).

Para muchos laboratorios las tiras API 20C AUX (BioMérieux, Hazelwood, MO) proporcionarán una herramienta expeditiva para la identificación de especies de *Nocardia* (cuadro 15-8).⁴³ En algunos casos pueden ser necesarias pruebas complementarias para resolver los patrones duplicados de asimilación de hidratos de carbono (cuadro 15-9).

Si los resultados de estas pruebas son ambiguos, puede ser útil la cromatografía en capa fina. En algunos laboratorios de investigación o laboratorios de referencia se utilizan las diferencias en la composición de la pared celular con fines taxonómicos. En el cuadro 15-2 (véase también fig. 15-1) se resumen los componentes primarios de las paredes celulares. La mayoría de los microorganismos nocardioformes, que incluyen *Nocardia* y *Rhodococcus*, tienen una composición de la pared celular tipo IV (los componentes importantes son ácido meso-diaminopimélico [DAP], arabinosa y galactosa, con ácidos micólicos presentes). Las especies de *Streptomyces* tienen paredes celulares tipo I (sin L-DAP y sin hidratos de carbono diagnósticos). Las especies de *Oerskovia* tienen paredes celulares de tipo VI (sin DAP ni hidratos de carbono de utilidad diagnóstica). Otras pruebas quimiotaxonómicas, además de determinar el tipo de pared celular, incluyen análisis de menaquinonas, ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos y ácidos micólicos. Estos estudios no son prácticos ni necesarios para la diferenciación de la mayoría de las cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* en el laboratorio de microbiología clínica. Si es necesaria una diferenciación definitiva, los microbiólogos pueden desear enviar los microorganismos aislados a un laboratorio de referencia.

Cada vez más los procedimientos de amplificación y secuenciación moleculares son útiles tanto para la detección directa de los actinomicetos aerobios en muestras clínicas como para la identificación de las bacterias aisladas.^{6,47,49,67,70,90} Cloud y cols. han sugerido que la secuenciación del RNA ribosómico 16S es más precisa que una combinación de pruebas bioquímicas convencionales y perfiles de sensibilidad a los antibióticos para la identificación de las especies de *Nocardia*.¹⁷ En el caso de *Tropheryma whipplei*, los enfoques moleculares constituyen el método diagnóstico primario. En la actualidad, estas técnicas se utilizan sobre todo en laboratorios de investigación o grandes laboratorios de referencia; los microbiólogos deben mantenerse alerta acerca de la disponibilidad futura de los productos comerciales. Las cuestiones son suficientemente complejas como para que incluso algunos análisis moleculares no puedan diferenciar entre ciertas especies.¹⁸

Cuadro 15-8 Uso de bandas de API 20C AUX para la identificación de especies de *Nocardia*^a

ESPECIE (Nº DE CEPAS)	GLUCOSA	GLICINA	GALACTOSA	N-ACETIL GLUCOSAMINA	INOSITOL	ADONITOL	TREHALOSA
<i>N. asteroides</i> tipo I (8)	+	+	—	+ (63)	—	—	—
<i>N. asteroides</i> tipo IV (1)	+	+	+	—	—	—	+
<i>N. asteroides</i> tipo VI (10)	+	+(90)	—	— (90)	—	—	— (80)
<i>N. farcinica</i> (16)	+	+ ^d	+ ^d (63)	—	—	—	— (94)
<i>N. nova</i> (19)	+	—	—	—	—	—	—
<i>N. brasiliensis</i> (6)	+	+	+	+	+	—	+
<i>N. pseudobrasiliensis</i> (5)	+	+	+	+	+	—	+
<i>N. otitidiscaviarum</i> (8)	+	+	— (75)	+	+	—	+ (50)
<i>N. transvalensis</i>	+	+	+	+	—	+	+ (90) ^c

^a Pruebas de asimilación incubadas durante 4 a 7 días a 35 °C. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de cepas con la reacción indicada.

^d, pueden observarse reacciones débiles; ^c, resultado basado sobre las cepas clínicas comunicadas.

Adaptado de la referencia⁴³.

Cuadro 15-9 Pruebas complementarias necesarias para resolver los patrones de utilización de hidratos de carbono por las especies de *Nocardia* utilizando API 20C AUX^a

ESPECIE 1	ESPECIE 2	PATRÓN DE SENSIBILIDAD ^b	ARILSULFATASA (7 DÍAS)	GELATINA (7 DÍAS)	ACETAMIDA (3 DÍAS)	OPACIFICACIÓN DE 7H11	COLONIAS AMARILLAS EN AGAR DE MUELLER-HINTON
<i>N. nova</i>		SSSS, SRSS o RRSS	+ (89)		–	–	
	<i>N. asteroides</i> tipo VI	SSSR	–				
	<i>N. farcinica</i>	RRSS o RRSR	–		+	+	
<i>N. farcinica</i>		RRSS o RRSR	–		+	+	
	<i>N. asteroides</i> tipo IV	RRSR, SRSR, RRRR o SRRR			–	–	
	<i>N. asteroides</i> tipo I	SSSR o SRSR				–	
	<i>N. asteroides</i> tipo VI	SSSR				–	
<i>N. otitidiscaviarum</i>				–			–
	<i>N. brasiliensis</i>			+ (83)			+
	<i>N. pseudobrasiliensis</i>			+			+

^a Se puede utilizar una o más de las características diferenciadoras. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de cepas con la reacción indicada.

^b Pruebas de difusión en disco (Kirby-Bauer) realizadas a 35 °C; los antibióticos en orden son gentamicina, tobramicina, amikacina y eritromicina.

Adaptado de la referencia⁴¹.

Cuadro 15-10 Sensibilidad a los antibióticos in vitro de los actinomicetos aerobios (% de sensibles)

MICROORGANISMO	SULFAME- TOXAZOL	ERITRO- MICINA	MINOCI- CLINA	DOXICI- CLINA	CIPROFLO- XACINA	GENTA- MICINA	KANA- MICINA	AMIKA- CINA	AMPICI- LINA	AMOXICI- LINA-CLA- VULANATO	CEFOTA- XIMA	CEFTRIA- XONA	IMPE- NEM
Complejo <i>Nocardia asteroides</i> (todos los tipos)	91-100 ^a	22-35 ^a	94-100 ^a	ND	29-50 ^a	67 ^b	55 ^b	95 ^b	18-40 ^a	41-58 ^a	79-82 ^a	79-82 ^a	71-100 ^a
<i>Nocardia asteroides sensu stricto</i> tipo VI	96-99 ^a	23-93 ^a	78-94 ^a	48-88 ^a	38-98 ^a	ND	ND	100 ^a	40-93 ^a	53-67 ^a	94-100 ^a	94-100 ^a	77-98 ^a
<i>Nocardia farcinica</i>	89-100 ^a	0-3 ^a	20-96 ^a	0-14 ^a	68-88 ^a	0 ^d	0 ^d	100 ^{a,d}	0-5 ^a	47-71 ^a	0-7 ^a	0-73 ^a	64-87 ^a
<i>Nocardia nova</i>	89-97 ^a	100 ^a	89-100 ^a	19-94 ^a	0 ^a	ND	ND	100 ^a	100 ^a	3-6 ^a	87-100 ^a	100 ^a	100 ^a
<i>N. transvalensis</i>	90 ^a	50 ^a	54 ^a	36 ^c	60 ^a	ND	ND	28 ^a	10 ^a	30 ^a	50 ^a	50 ^a	90 ^a
<i>N. otitidiscaviarum</i>	V ^a	ND	S ^a	ND	R ^a	ND	ND	5 ^a	ND	R ^a	R ^a	ND	R ^a
<i>Rhodococcus equi</i>	ND	97 ^c	ND	ND	82 ^b	100 ^c	ND	ND	32 ^c	100 ^c	ND	ND	100 ^c
<i>Actinomadura madurae</i>	84 ^d	93 ^d	90 ^d	93 ^d	97 ^d	ND	ND	ND	37 ^d	81 ^d	90 ^d	100 ^d	100 ^d
<i>Streptomyces anulatus</i> (griseus)	57 ^d	86 ^d	90 ^d	81 ^d	43 ^d	ND	ND	ND	20 ^d	57 ^d	48 ^d	80 ^d	81 ^d

^a Tomado de la referencia⁸⁵.^b Tomado de la referencia¹⁰¹.^c Tomado de la referencia⁵⁸.^d Tomado de la referencia⁶¹.^e Tomado de la referencia⁵⁹.

V, variable; S, sensible; R, resistente.

Identificación de los actinomicetos termófilos

Los actinomicetos termófilos pocas veces se encuentran en el laboratorio clínico porque son microorganismos ambientales que causan enfermedad en los seres humanos por una reacción alérgica, más que una infección productiva.⁶⁸ Su capacidad para crecer a temperaturas elevadas proporciona un medio útil por el cual se evalúa su presencia en las muestras ambientales, si se desea. Se han sugerido protocolos para la identificación de estas bacterias.^{39,44}

Identificación de *Tropheryma whipplei*

Este actinomiceto puede ser cultivado, pero sólo con dificultad.⁷⁵ En la mayoría de los casos el diagnóstico se hará con criterios clínicos e histológicos. Se ha registrado la identificación inmunohistoquímica del microorganismo en el tejido seccionado.^{4,52,75} Como alternativa, se lo puede reconocer por las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.⁷³ Aunque la experiencia es limitada, se ha sugerido que la amplificación molecular puede ser más útil que la histología para el control de la evolución de los pacientes con enfermedad de Whipple.⁷³ Es importante reconocer que el DNA de *T. whipplei* puede ser detectado en ausencia de enfermedad clínica manifiesta.^{22,91} La importancia de estos resultados es poco clara, pero el diagnóstico de la enfermedad de Whipple no debe basarse sólo en la detección molecular del DNA bacteriano.

Sensibilidad in vitro de *Nocardia* y bacterias relacionadas a los antibióticos y tratamiento de las infecciones

Los patrones de sensibilidad a los antibióticos de los actinomicetos aerobios son útiles para los taxonomistas, los microbiólogos clínicos (como indicio de la identificación de un aislamiento) y los médicos, para el tratamiento de los pacientes infectados. En el cuadro 15-10 se resume el patrón de sensibilidad. La estandarización de las pruebas de sensibilidad para uso clínico es un fenómeno reciente.⁶⁶ Es prudente que los laboratorios que realizan estas pruebas con poca frecuencia envíen los aislamientos a un laboratorio de referencia con experiencia suficiente en actinomicetos aerobios.

Parte de la resistencia de las especies de *Nocardia* puede estar mediada por β -lactamasas. Las que han sido caracterizadas son principalmente penicilinasas con mucha menos actividad contra las cefalosporinas. Las enzimas halladas en *N. farcinica* son bastante homogéneas y distintas de las encontradas en otras especies.⁸⁹ Por el contrario, existe una diversidad considerable en las enzimas de *N. brasiliensis*, aunque el perfil de sustratos es uniforme.⁹⁹ Las β -lactamasas son inhibidas por ácido clavulánico, lo que sugiere que podrían ser útiles las combinaciones de penicilinas e inhibidores de las β -lactamasas (algunos de los cuales pueden ser administrados por vía oral).⁹⁹ En un estudio (realizado antes de la delineación de los componentes del grupo de *N. asteroides*) casi todas las cepas contienen β -lactamasas.¹⁰² La mejor correlación entre la presencia de una β -lactamasa y la resistencia a las penicilinasas in vitro fue la presencia de enzima extracelular además de la β -lactamasa asociada con la célula o críptica. No está clara la inactivación enzimática de las penicilinas.

Los fármacos de elección para el tratamiento de la nocardiosis, aun en los pacientes inmunosuprimidos, siguen siendo las sulfamidas (p. ej., sulfadiazina, sulfisoxazol y combinaciones de tres sulfamidas). La mayoría de los médicos prefieren la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol,⁸⁵ pero sigue

abierta la cuestión de si la combinación es más eficaz que una sulfamida sola.^{85,100} Pueden ser necesarios algunos estudios in vitro para ayudar en la selección de los antibióticos para los pacientes que son hipersensibles a las sulfamidas o que están infectados por *N. otitidiscaviarum*, lo que demuestra una sensibilidad inconstante a las sulfamidas. El imipenem, la minociclina y la amikacina son posibles elecciones, sobre la base de algunos estudios in vitro y ensayos clínicos limitados. Como alternativa, puede considerarse la desensibilización a las sulfamidas.⁸⁵ Para los micetomas, está indicada una combinación de los enfoques quirúrgico y farmacológico.

El tiempo de tratamiento recomendado para la enfermedad de Whipple es prolongado (por lo menos un año) con trimetoprim-sulfametoxazol.⁵⁷ El tratamiento con tetraciclina, antes de uso frecuente, se asocia con una frecuencia muy alta de recaídas. En especial en los pacientes con enfermedad grave, se administra una serie inicial de tratamiento parenteral con ceftriaxona o una combinación de penicilina y estreptomina antes de iniciar el tratamiento oral prolongado con trimetoprim-sulfametoxazol.⁵⁷

Rhodococcus equi es sensible a la vancomicina, la cual se considera el tratamiento de elección, y la mayoría de las cepas son sensibles a eritromicina, aminoglucósidos, rifampicina y cloranfenicol.⁸⁵ Sin embargo, la experiencia con el tratamiento es muy limitada. Aun existe menos información para otros actinomicetos aerobios.

REFERENCIAS

- Arroyo JC, et al. Disseminated *Nocardia caviae* infection. *Am J Med* 1977;62:409-412.
- Ayyar S, et al. A comparison of three media for isolation of *Nocardia* species from clinical specimens. *J Postgrad Med* 1992;38:70-72.
- Baisden BL, et al. Diagnosis of Whipple disease by immunohistochemical analysis: a sensitive and specific method for the detection of *Tropheryma whipplei* (the Whipple bacillus) in paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 2002;118:742-748.
- Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:213-264.
- Beaman BL, et al. *Nocardia* infections in the United States, 1972-1974. *J Infect Dis* 1976;134:286-289.
- Beau F, et al. Molecular identification of a *Nocardiosis dasonvillei* blood isolate. *J Clin Microbiol* 1999;37:3366-3368.
- Bemer-Melchior P, et al. Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* 1999;29:1338-1340.
- Bentley SD, et al. Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*. *Lancet* 2003;361:637-644.
- Berg R, et al. *Corynebacterium equi* infection complicating neoplastic disease. *Am J Clin Pathol* 1977;68:73-77.
- Brown JM, McNeil MM. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 8. Washington, DC: ASM Press, 2004:502-531.
- Browns JM, et al. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol* 2004;42:3655-3660.
- Carson M, Hellyar A. Opacification of Middlebrook agar as an aid in distinguishing *Nocardia farcinica* within the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol* 1994;32:2270-2271.
- Castro LG, et al. Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in Sao Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. *Mycoses* 1993;36:89-95.
- Causey WA. *Nocardia caviae*: a report of 13 new isolations with clinical correlation. *Appl Microbiol* 1974;28:193-198.
- Chandler FW, Watts JC. *Pathologic Diagnosis of Fungal Infections*. Chicago, ASCP Press, 1987.
- Clark NM, et al. Primary cutaneous *Nocardia otitidiscaviarum* infection: case report and review. *Clin Infect Dis* 1995;20:1266-1270.
- Cloud JL, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004;42:578-584.
- Conville PS, et al. *Nocardia veterana* as a pathogen in North American patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:2560-2568.

19. Curry WA. Human nocardiosis: a clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med* 1980;140:818-826.
20. Dorman SE, et al. *Nocardia* infection in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2002;35:390-394.
21. Durand DV, et al. Whipple disease: clinical review of 52 cases: the SNFMI Research Group on Whipple Disease. *Societe Nationale Francaise de Medecine Interne. Medicine (Baltimore)* 1997;76:170-184.
22. Ehrbar HU, et al. PCR-positive tests for *Tropheryma whippelii* in patients without Whipple's disease. *Lancet* 1999;353:2214.
23. Eisenblatter M, et al. Isolation of *Nocardia paucivorans* from the cerebrospinal fluid of a patient with relapse of cerebral nocardiosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:3532-3534.
24. Esteban J, et al. Isolation of *Nocardia* sp. from blood cultures in a teaching hospital. *Scand J Infect Dis* 1994;26:693-696.
25. Fenollar F, et al. Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q fever, *Bartonella* infection, and blood culture-positive endocarditis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1309-1316.
26. Flores M, Desmond E. Opacification of Middlebrook agar as an aid in identification of *Nocardia farcinica*. *J Clin Microbiol* 1993;31:3040-3041.
27. Garrett MA, et al. Selective buffered charcoal-yeast extract medium for isolation of nocardiae from mixed cultures. *J Clin Microbiol* 1992;30:1891-1892.
28. Georgiadi PR, Blacklock M. Infection with *Nocardia* species in Queensland: a review of 102 clinical isolates. *Med J Aust* 1992;156:692-697.
29. Gonzalez Ochoa A. Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* with a note on the isolation of the causative organism from soil. *Lab Invest* 1962;11:1123.
30. Goodfellow M. Suprageneric classification of actinomycetes. In: Holt JG, Williams ST, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989:2333-2339.
31. Goodfellow M. Maduromycetes. In: Holt JG, Williams ST, Sharpe ME eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989:2509-2551.
32. Goodfellow M, Alderson G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous" complex. *J Gen Microbiol* 1977;100:99-122.
33. Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:189-216.
34. Gubler JG, et al. Whipple endocarditis without overt gastrointestinal disease: report of four cases. *Ann Intern Med* 1999;131:112-116.
35. Guerrero MF, et al. Pulmonary malacoplakia associated with *Rhodococcus equi* infection in patients with AIDS: case report and review. *Clin Infect Dis* 1999;28:1334-1336.
36. Guss WJ, Ament ME. *Oerskovia* infection caused by contaminated home parenteral nutrition solution. *Arch Intern Med* 1989;149:1457-1458.
37. Hamid ME, et al. *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:625-630.
38. Harrington RD, et al. *Oerskovia xanthineolytica* infection of a prosthetic joint: case report and review. *J Clin Microbiol* 1996;34:1821-1824.
39. Hollick GE, Kurups VP. Isolation and identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *Lab Med* 1983;14:39-44.
40. Javalay K, et al. Nocardiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:128-138.
41. Kageyama A, et al. *Nocardia arthritis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J Clin Microbiol* 2004;42:2366-2371.
42. Kerr E, et al. Isolation of *Nocardia asteroides* from respiratory specimens by using selective buffered charcoal-yeast extract agar. *J Clin Microbiol* 1992;30:1320-1322.
43. Kiska DL, et al. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J Clin Microbiol* 2002;40:1346-1351.
44. Kurup VP, Fink JN. A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Microbiol* 1975;2:55-61.
45. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
46. La Scola B, et al. Description of *Tropheryma whippelii* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1471-1479.
47. Ladrón N, et al. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the choE gene. *J Clin Microbiol* 2003;41:3241-3245.
48. Lasky JA, et al. *Rhodococcus equi* causing human pulmonary infection: review of 29 cases. *South Med J* 1991;84:1217-1220.
49. Laurent FJ, et al. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:99-102.
50. Lechevalier HA. A practical guide to genetic identification of actinomycetes. In: Holt JG, Williams ST, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989:2344-2347.
51. Lechevalier HA. Nocardiform actinomycetes. In: Holt JG, Williams ST, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989:2348-2404.
52. Lepidi H, et al. Immunohistological detection of *Tropheryma whippelii* (Whipple bacillus) in lymph nodes. *Am J Med* 2002;113:334-336.
53. LeProwse CR, et al. Catheter-related bacteremia caused by *Oerskovia turbata*. *J Clin Microbiol* 1989;27:571-572.
54. Lerner PI. Nocardiosis. *Clin Infect Dis* 1996;22:891-903.
55. MacGregor JH, et al. Opportunistic lung infection caused by *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. *Radiology* 1986;160:83-84.
56. Maiwald M, et al. *Tropheryma whippelii* DNA is rare in the intestinal mucosa of patients without other evidence of Whipple disease. *Ann Intern Med* 2001;134:115-119.
57. Marth T, Raoult D. Whipple's disease. *Lancet* 2003;361:239-246.
58. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:357-417.
59. McNeil MM, et al. Infections due to *Nocardia transvalensis*: clinical spectrum and antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 1992;15:453-463.
60. McNeil MM, et al. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev Infect Dis* 1990;12:778-783.
61. McNeil MM, et al. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev Infect Dis* 1990;12:778-783.
62. McNeil MM, et al. Nonmycetoma *Actinomyces madurae* infection in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 1992;30:1008-1010.
63. Mishra SK, et al. Identification of nocardiae and streptomycetes of medical importance. *J Clin Microbiol* 1980;11:728-736.
64. Murray PR, et al. Effect of decontamination procedures on recovery of *Nocardia* spp. *J Clin Microbiol* 1987;25:2010-2011.
65. Murray PR, et al. Modified Thayer-Martin medium for recovery of *Nocardia* species from contaminated specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1219-1220.
66. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard M24-A). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
67. Patel JB, et al. Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 2004;42:2530-2540.
68. Pepys J, et al. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 1963;41:607-611.
69. Petersen DL, et al. Disseminated *Nocardia caviae* with positive blood cultures. *Arch Intern Med* 1978;138:1164-1165.
70. Pidoux O, et al. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. *J Clin Microbiol* 2001;39:2634-2636.
71. Potumtharthy S, et al. *Nocardia veterana*, a new emerging pathogen. *J Clin Microbiol* 2003;41:1705-1709.
72. Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:20-34.
73. Ramzan NN, et al. Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1997;126:520-527.
74. Raoult D, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 2000;342:620-625.
75. Raoult D, et al. Culture and immunological detection of *Tropheryma whippelii* from the duodenum of a patient with Whipple disease. *JAMA* 2001;285:1039-1043.
76. Reller LB, et al. Bacterial endocarditis caused by *Oerskovia turbata*. *Ann Intern Med* 1975;83:664-666.
77. Rihs JD, et al. *Oerskovia xanthineolytica* implicated in peritonitis associated with peritoneal dialysis: case report and review of Oerskovia infections in humans. *J Clin Microbiol* 1990;28:1934-1937.
78. Roth A, et al. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxa. *J Clin Microbiol* 2003;41:851-856.
79. Ruimy R, et al. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:259-264.
80. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* 2003;41:4497-4501.
81. Scott MA, et al. *Rhodococcus equi*: an increasingly recognized opportunistic pathogen: report of 12 cases and review of 65 cases in the literature. *Am J Clin Pathol* 1995;103:649-655.
82. Shawar RM, et al. Cultivation of *Nocardia* spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:508-512.
83. Smego RA Jr, et al. Lymphocutaneous syndrome: a review of non-sporothrix causes. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:38-63.
84. Smego RA Jr, Gallis HA. The clinical spectrum of *Nocardia brasiliensis* infection in the United States. *Rev Infect Dis* 1984;6:164-180.
85. Sorrell TC, Iredell JR, Mitchell DH. *Nocardia* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennen's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Ed. 5. New York: Churchill Livingstone, 2000:2637-2645.
86. Sottnek FO, et al. Recognition of *Orskovia* species in the clinical laboratory: characterization of 35 isolates. *Int J Syst Bacteriol* 1977;27:263-270.
87. Stackebrandt E, et al. Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jager et al., 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia pauromeraboa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1105-1111.
88. Steingrube VA, et al. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol* 1995;33:3096-3101.
89. Steingrube VA, et al. Partial characterization of *Nocardia farcinica* beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1850-1855.
90. Steingrube VA, et al. Rapid identification of clinically significant species and 5 taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomyces madurae*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:817-822.
91. Street S, et al. *Tropheryma whippelii* DNA in saliva of healthy people. *Lancet* 1999;354:1178-1179.

92. Takeda S, et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:2887-2889.
93. TIGHT RR, Bartlett MS. Actinomycetoma in the United States. *Rev Infect Dis* 1983;3:1139-1150.
94. Torres HA, et al. Nocardiosis in cancer patients. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:388-397.
95. Tsukamura M, et al. Severe progressive subcutaneous abscesses and necrotizing tenosynovitis caused by *Rhodococcus aurantiacus*. *J Clin Microbiol* 1988;26:201-205.
96. Tsukamura M, Kawakami K. Lung infection caused by *Gordona aurantiaca* (*Rhodococcus aurantiacus*). *J Clin Microbiol* 1982;16:604-607.
97. Van Etta LL, et al. *Corynebacterium equi*: a review of 12 cases of human infection. *Rev Infect Dis* 1983;5:1012-1018.
98. Wallace RJ Jr, et al. New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:1528-1533.
99. Wallace RJ Jr, et al. Beta-lactam resistance in *Nocardia brasiliensis* is mediated by beta-lactamase and reversed in the presence of clavulanic acid. *J Infect Dis* 1987;156:959-966.
100. Wallace RJ Jr, et al. Use of trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of infections due to *Nocardia*. *Rev Infect Dis* 1982;4:315-325.
101. Wallace RJ Jr, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1776-1779.
102. Wallace RJ Jr, et al. Beta-lactamase production and resistance to beta-lactam antibiotics in *Nocardia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:704-709.
103. Wenger PN, et al. *Nocardia farcinica* sternotomy site infections in patients following open heart surgery. *J Infect Dis* 1998;178:1539-1543.
104. Wilson JP, et al. Nocardial infections in renal transplant recipients. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:38-57.
105. Wilson KH. Detection of culture-resistant bacterial pathogens by amplification and sequencing of ribosomal DNA. *Clin Infect Dis* 1994;18:958-962.
106. Winn WC Jr, Frable WJ. Infectious Diseases. In: Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, eds. *Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*. Ed. 3. New York: Churchill Livingstone, 1997:155-226.
107. Winn WC Jr, Kissane JM. Bacterial infections. In: Damjanov I, Linder J, ed. *Anderson's Textbook of Pathology*. Ed. 10. St. Louis: Mosby, 1995:747-865.
108. Wust J, et al. Peritonitis caused by *Actinomadura madurae* in a patient: on CAPD. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:700-701.
109. Yassin AF, et al. *Nocardia paucivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50(Pt 2):803-809.
110. Yassin AF, et al. Description of *Nocardiopsis synnemataformans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:983-988.
111. Yassin AF, et al. *Nocardia abscessus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50(Pt 4):1487-1493.
112. Yassin AF, et al. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1419-1423.
113. Yassin AF, et al. *Nocardia puris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1595-1599.

Bacterias anaerobias

Formas de interacción de las bacterias y el oxígeno

- Tolerancia al oxígeno
- Potencial de oxidorreducción

Hábitats

Clasificación taxonómica y nomenclatura

Infecciones humanas

Aislamiento de bacterias anaerobias

- Selección de las muestras para cultivo
- Recolección y transporte de las muestras
- Hemocultivos anaerobios (resumen de las pautas para el caldo tradicional y los sistemas instrumentados)
- Examen directo de los materiales clínicos
- Selección y uso de los medios

Sistemas anaerobios para el cultivo de bacterias anaerobias

- Técnicas de jarras anaerobias
- Uso de la cámara de anaerobiosis
- Sistema de capa extendida por rodamiento (*roll-streak*)
- Bolsas plásticas anaerobias
- Uso de la jarra contenedora anaerobia

Incubación de los cultivos

Inspección de los subcultivos de colonias

Pruebas de aerotolerancia

Informes preliminares de los resultados

Determinación de las características bioquímicas y de cultivo para la diferenciación de aislamientos anaerobios

- Identificación presuntiva
- Usos de medios de agar diferenciales
- Placas Presumpto
- Placas de sensibilidad a los antibióticos
- Caracterización de anaerobios usando pruebas bioquímicas convencionales en tubos grandes
- Procedimientos alternativos
 - La prueba de Nagler y la prueba de CAMP para *C. perfringens*
- Microsistemas comerciales
- Equipos comerciales para la identificación de anaerobios después de 4 horas de incubación aerobia

Determinación de productos metabólicos por cromatografía de gas-líquido

- Identificación de ácidos grasos volátiles
- Análisis de ácidos no volátiles

Controles de la cromatografía
de gas-líquido

Identificación de bacterias anaerobias

Bacilos gramnegativos anaerobios no formadores
de esporas

Clasificación y nomenclatura

Identificación preliminar o presuntiva del Grupo de *Bacteroides*,
Prevotella, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*

Identificación de cocos anaerobios

Identificación de bacilos grampositivos anaerobios
no formadores de esporas

Especies de *Propionibacterium*

Especies de *Bifidobacterium*

Especies de *Lactobacillus*

Especies de *Actinomyces*

Especies de *Eubacterium*

Mobiluncus y vaginosis bacteriana

Otros géneros y especies de bacilos grampositivos anaerobios
no formadores de esporas

Identificación de especies de *Clostridium*

Clostridios histotóxicos implicados en mionecrosis clostridiana
o gangrena gaseosa

Otros clostridios en diversos cuadros clínicos

Clostridium difficile asociado con enfermedad intestinal

Botulismo

Tétanos

Pruebas de sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antibióticos

Métodos de evaluación de la sensibilidad de los anaerobios
a los antibióticos

Formas de interacción de las bacterias y el oxígeno

Aunque definidas de varias formas por distintos autores, una definición práctica de trabajo es que las bacterias anaerobias obligadas son aquellas que crecen en ausencia de oxígeno libre pero que no se multiplican en presencia de oxígeno en la superficie de los medios sólidos nutricionalmente adecuados incubados en la atmósfera ambiente o en una estufa de incubación con CO₂ (que contiene 5-10% de CO₂ en aire). La cantidad de O₂ en una estufa con CO₂ o en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela, es considerable (alrededor del 18-19%). En la práctica, las bacterias anaerobias se reconocen en los laboratorios clínicos siguiendo las pruebas de aerotolerancia de las colonias que se desarrollan en las placas de aislamiento primario incubadas en anaerobiosis (véase más adelante). Así, la mayoría de los anaerobios identificados en el laboratorio clínico crecen en principio en agar sangre en anaerobiosis en alguno de los medios selectivos anaerobios o en un caldo enriquecido incubado en anaerobiosis, pero no en placas de agar sangre o agar chocolate incubadas en aerobiosis o en una estufa de CO₂.

Referirse a los anaerobios como si correspondieran de manera uniforme a un gran grupo es una simplificación excesiva. También lo es (y no es correcto) referirse a todas las bacterias que se desarrollan en el ambiente como aerobias. Así, se han usado varios términos, como aerobios obligados, anaerobios facultativos, microaerófilos, anaerobios aerotolerantes y anaerobios obligados (estrictos y moderados) para subdividir las bacterias sobre la base de su vinculación con el oxígeno. Estos términos reflejan un espectro continuo de bacterias que se extiende desde las que no pueden tolerar el oxígeno hasta aquellas que lo necesitan para crecer.

Los microorganismos aerobios obligados, incluidas las especies de *Micrococcus* y *Pseudomonas*, requieren oxígeno molecular como un aceptor final de electrones, que derivan en la

formación de agua y no obtienen energía por vías fermentativas. Sin embargo, no es infrecuente encontrar *P. aeruginosa* con desarrollo escaso en medios incubados en anaerobiosis en el laboratorio clínico, porque estas bacterias pueden usar nitrato del medio como aceptor final de electrones (mediante la respiración anaerobia) en lugar del O₂. Por el contrario, el oxígeno molecular tiene un efecto tóxico variable en diferentes especies de bacterias anaerobias y no es un aceptor final de electrones en las bacterias anaerobias. En general, los microorganismos anaerobios clínicamente importantes obtienen su energía mediante vías fermentativas, en las cuales los compuestos orgánicos, como los ácidos orgánicos, los alcoholes y otros productos sirven como aceptores finales de electrones.

Por otro lado, los anaerobios se dividen en dos grupos principales: los anaerobios obligados (definidos con anterioridad) y los anaerobios aerotolerantes. Los anaerobios obligados además han sido subdivididos en dos grupos sobre la base de su capacidad para desarrollarse en presencia de oxígeno o de tolerarlo. Los anaerobios obligados estrictos no crecen en la superficie del agar ante niveles de O₂ que exceden el 0,5%. El oxígeno atmosférico es altamente tóxico para estos microorganismos por razones que no se conocen por completo. Ejemplos de estas bacterias son *Clostridium haemolyticum*, *C. novyi* tipo B, *Selenomonas ruminantium* y *Treponema denticola*. El segundo grupo de anaerobios obligados, los anaerobios obligados moderados, son bacterias que pueden desarrollarse cuando se exponen a niveles de oxígeno que oscilan desde casi 2% hasta 8% (promedio, 3%). Ejemplos de estas bacterias son los miembros de *Bacteroides fragilis* y de los grupos *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentados (antes llamados grupo *Bacteroides* pigmentados), *Fusobacterium nucleatum* y *C. perfringens*.¹⁵¹

El término anaerobio aerotolerante es usado por varios microbiólogos para describir las bacterias anaerobias que muestran limitado o escaso desarrollo en agar en aire ambiente o en una estufa con 5-10% de CO₂, pero que tienen buen desarrollo en condiciones anaerobias. Ejemplos de estas bacte-

rias son *Clostridium carnis*, *C. histolyticum* y *C. tertium*. La mayoría de los aislamientos anaerobios de muestras seleccionadas y recolectadas en forma adecuada en el laboratorio clínico corresponden a la categoría de anaerobios obligados moderados. Estos microorganismos son más tolerantes a los efectos tóxicos del oxígeno que los anaerobios obligados estrictos; sin embargo, el oxígeno los mata a pesar de que las condiciones anaerobias se mantengan de modo apropiado durante la recolección y el transporte de la muestra hacia el laboratorio y durante los pasos requeridos para el procesamiento de muestras y el aislamiento e identificación, como se verá en las secciones posteriores del capítulo. Si bien los anaerobios obligados estrictos son raros en las infecciones humanas, tanto los anaerobios obligados moderados como los anaerobios estrictos se encuentran en diversos hábitats no patógenos (p. ej., heces y orofaringe), como parte de la flora normal.

Los anaerobios facultativos (p. ej., *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) se desarrollan en condiciones aerobias o anaerobias. Usan oxígeno como aceptor final de electrones o, con menos eficacia, pueden obtener su energía a través de reacciones de fermentación en condiciones anaerobias. Desarrollados en aerobiosis, los anaerobios facultativos obtienen mucha más energía (38 ATP) cuando catabolizan por completo una molécula de glucosa a CO_2 y H_2O , que cuando se desarrollan en anaerobiosis. En condiciones anaerobias, el metabolismo fermentativo de la molécula de glucosa produce sólo 2-3 ATP.¹⁶³

Los microorganismos microaerófilos requieren oxígeno como aceptor final de electrones, pero estas bacterias no crecen en la superficie de los medios sólidos en una estufa de incubación aerobia (21% de O_2) y casi nada en condiciones anaerobias. Un ejemplo de un microaerófilo es *Campylobacter jejuni*, que se desarrolla en forma óptima en 5% de O_2 (la mezcla gaseosa del medioambiente de incubación más usada para aislar este microorganismo en el laboratorio clínico es 5% de O_2 , 10% de CO_2 y 85% de N_2).

A través de los años, los bacteriólogos que trabajan en la creación de medios mejorados y sistemas de cultivo de anaerobios se han centrado en dos factores limitantes fundamentales que pueden afectar el crecimiento de los anaerobios. El primero y más importante es el efecto inhibitorio del oxígeno atmosférico y de sus derivados tóxicos. El segundo es el potencial de oxidorreducción (Eh) del medio de cultivo.

Tolerancia al oxígeno

Algunos de los anaerobios obligados más estrictos (p. ej., *Clostridium haemolyticum* y *C. novyi* tipo B) se mueren cuando se exponen al oxígeno atmosférico en la mesada de laboratorio durante 10 minutos o más. Por otro lado, la mayoría de los anaerobios obligados moderados encontrados en infecciones humanas toleran la exposición al oxígeno por períodos más prolongados. Las razones por las que los anaerobios varían en su tolerancia al oxígeno son múltiples, pero una idea es que la tolerancia al oxígeno de muchos anaerobios obligados moderados depende de su producción de superóxido dismutasa, catalasas y, posiblemente, enzimas peroxidasas, que son protectoras contra los productos tóxicos de la reducción del oxígeno.^{23,87,101,163,235}

Una opinión popular es que la exposición al O_2 atmosférico provoca diversas reacciones dentro de las células bacterianas, posibles reacciones mediadas por flavoproteínas, que derivan en la producción del radical superóxido (O_2^-) con carga negativa, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros productos tóxicos

de la reducción del oxígeno.^{23,172} El anión superóxido y el H_2O_2 pueden reaccionar juntos para producir radicales hidroxilo libres (OH $\cdot$), los oxidantes biológicos más poderosos conocidos, y también puede ser la producción de oxígeno singulete tóxico ($^1\text{O}_2$) mediante la reacción de los aniones superóxido con los radicales hidroxilo libres. La superóxido dismutasa cataliza la conversión de los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular menos tóxicos. La catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno. Se demostró que varias especies de anaerobios obligados moderados tolerantes al oxígeno producen superóxido dismutasa (SOD) y el nivel de SOD producido se relaciona con el nivel de tolerancia al oxígeno y la virulencia del microorganismo.²³⁵ En otro estudio, varias cepas del género *Bacteroides*, varios cocos anaerobios, bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas y clostridios producían SOD, pero no se encontró relación con el origen del microorganismo, el presunto nivel de patogenicidad y el nivel de SOD producido.⁸⁷ Varias especies de anaerobios producen catalasa (p. ej., miembros del grupo *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes* y otros), así como SOD, pero algunos anaerobios que son relativamente tolerantes al oxígeno o aerotolerantes (p. ej., *Clostridium tertium*) no producen SOD ni catalasa. Rolfe y cols. observaron que el grado de tolerancia al oxígeno en las bacterias anaerobias se relaciona con la proporción de células bacterianas en la población que sobrevive después de la exposición al oxígeno.²⁰⁰ En la práctica, a menudo es esencial usar grandes inóculos cuando se inoculan o subcultivan medios de cultivo anaerobios, lo que probablemente sirva para reducir los efectos dañinos de los múltiples factores tóxicos del oxígeno limitantes del desarrollo. Queda claro que se necesita trabajar mucho más sobre los mecanismos de tolerancia e intolerancia al oxígeno de las bacterias anaerobias.

Potencial de oxidorreducción

El potencial de oxidorreducción (abreviado potencial "redox" o Eh) de un medio de cultivo, expresado en voltios o milivoltios, puede ser medido mediante un electrodo de platino, junto con un electrodo de referencia conectado a un pHímetro. El Eh está afectado por el pH (o concentración de iones hidrógeno); así, el potencial redox se expresa comúnmente a pH neutro (pH 7) como Eh. Los agentes reductores, como tioglicolato y L-cisteína se pueden agregar al medio de transporte anaerobio y a ciertos medios de cultivo para ayudar a mantener condiciones reductoras (o de bajo Eh) en el medio. Un potencial de oxidorreducción positivo (p. ej., como el que se reconoce en algunos medios por el color rosado del indicador resazurina o en otros medios por el color azul del indicador azul de metileno) significa que el medio está oxidado. En la naturaleza, el límite superior de Eh es +820 mV, que puede encontrarse en algunos ambientes que tienen una oxigenación considerable. Las condiciones oxidantes prevalecen en el tejido humano sano que está bien oxigenado y tiene un suministro de sangre continuo (p. ej., el Eh es casi +150 mV). Por el contrario, el límite inferior de Eh en la naturaleza es cerca de -420 mV. Un medioambiente anaerobio (p. ej., un absceso, un tejido necrótico) o un medio de cultivo rico en hidrógeno puede tener un Eh bajo. El intestino grueso humano, que contiene gran número de anaerobios obligados estrictos, tiene un Eh de alrededor de -250 mV.¹⁶³ ¿Cuál es la importancia relativa del potencial de oxidorreducción frente al oxígeno atmosférico en relación con la supervivencia y el desarrollo de las bacterias anaerobias? Como lo advirtieron hace varios años Hentges y

Maier.¹⁰¹ existen antiguos informes que indican que ciertos anaerobios no podrían proliferar por encima de un cierto nivel de Eh bajo y que algunos anaerobios obligados podían desarrollarse en el aire ambiente si el Eh del medio se mantenía suficientemente bajo. En un estudio excelente realizado por Walden y Hentges,²⁴⁸ fueron disipados algunos conceptos erróneos acerca de los efectos del Eh en las bacterias anaerobias. Estos investigadores estudiaron los efectos diferenciales del O₂ y el potencial de oxidorreducción en el desarrollo de *C. perfringens*, *B. fragilis* y *P. magnus*. El oxígeno inhibía la multiplicación de estos tres anaerobios si el medio estaba en un potencial de oxidorreducción negativo (Eh = -50 mV), equilibrado por el agregado de ditiotreitól ([DTT] un agente reductor), o en un potencial de oxidorreducción positivo (Eh cercano a +500 mV) en un medio aireado sin DTT. En ausencia de oxígeno, estos microorganismos eran capaces de multiplicarse incluso cuando el Eh se mantenía a +325 mV, por el agregado de ferricianuro de potasio (un agente oxidante). De su trabajo se extrajo una conclusión práctica: que la eliminación total del oxígeno en el ambiente en el que se halla el cultivo, para evitar la toxicidad del oxígeno, es más importante que el establecimiento de un Eh bajo.²⁴⁸ Así, la obtención rápida y el mantenimiento de una tensión de oxígeno baja, o la ausencia de oxígeno, son requisitos esenciales para el cultivo exitoso de anaerobios en los sistemas modernos para anaerobios (p. ej., jarras y cámaras de anaerobiosis usadas para la incubación de anaerobios en el laboratorio clínico).

Hábitats

Las bacterias anaerobias están diseminadas en el suelo, los pantanos, los sedimentos de lagos y ríos, los océanos, las aguas cloacales, los alimentos y los animales. En los seres humanos, son prevalentes en la cavidad bucal alrededor de los dientes, en el aparato digestivo, en especial en el colon, donde exceden en número a los coliformes por al menos 1 000:1; en los orificios del aparato genitourinario y en la piel.^{69 100} La mayoría de estos hábitats anaerobios tienen baja tensión de oxígeno y reducido potencial de oxidorreducción resultantes de la actividad metabólica de los microorganismos que consumen oxígeno a través de la respiración.¹⁶³ Si el oxígeno no es reemplazado, las condiciones anaerobias se mantienen en el ambiente.

En el recuadro 16-1 se ofrece un resumen de los microorganismos anaerobios encontrados en la flora normal del cuerpo humano.

Clasificación taxonómica y nomenclatura

Entre los microorganismos anaerobios se incluyen todas las variedades morfológicas de bacterias; bacilos gramnegativos, curvados, en forma de espiral, y formas espiroquetas, cocos grampositivos y gramnegativos, bacilos grampositivos no formadores de esporas y formadores de esporas.⁸ Sobre la base de sus características morfológicas observadas en las preparaciones teñidas con Gram y la presencia o ausencia de esporas, las bacterias anaerobias se clasifican de manera general como se muestra en el cuadro 16-1. Varios de los géneros en esta lista se han encontrado sólo en hábitats no patógenos (p. ej., sitios en los que reside la flora normal humana o de muchos animales, como la cavidad bucal, el intestino grueso, el aparato geni-

Recuadro 16-1 Anaerobios encontrados en la flora humana normal

Cavidad bucal y vías respiratorias altas

Especies de *Prevotella* pigmentadas; especies de *Porphyromonas*
Especies de *Prevotella* no pigmentadas (p. ej., *P. oralis*)
Especies de *Bacteroides* (p. ej., *B. ureolyticus*)
Especies de *Fusobacterium* (p. ej., *F. nucleatum*)
Cocos anaerobios
Especies de *Veillonella*
Especies de *Actinomyces* y especies de *Propionibacterium*

Estómago (durante el ayuno)

Lactobacilos

Intestino delgado (porción proximal)

Streptococos
Lactobacilos

Intestino grueso (e íleon terminal)

Grupo *Bacteroides fragilis*
Especies de *Porphyromonas*
Especies de *Fusobacterium*
Muchas especies de cocos anaerobios
Especies de *Clostridium*
Especies de *Eubacterium*
Especies de *Bifidobacterium*
Especies de *Propionibacterium*

Aparato genitourinario; vagina y cuello uterino

Especies de *Prevotella* pigmentadas; especies de *Porphyromonas*
Prevotella no pigmentada
Especies de *Bacteroides*
Cocos anaerobios
Especies de *Clostridium*
Especies de *Veillonella*
Especies de *Lactobacillus*
Especies de *Eubacterium*
Especies de *Propionibacterium*

Uretra (masculina y femenina)

Especies de *Propionibacterium*
Cocos anaerobios
Especies de *Bacteroides* (*Prevotella*)
Especies de *Fusobacterium*

Piel

Especies de *Propionibacterium*
Cocos anaerobios

tourinario y la piel) y no se ha informado que produzcan enfermedades en los seres humanos. La mayoría de estos géneros no se tratarán más adelante.

Han ocurrido muchos cambios recientes en la clasificación taxonómica y la nomenclatura de anaerobios desde que se publicó la quinta edición de este libro. Estudios genéticos que

Cuadro 16-1 Clasificación de los géneros de las bacterias anaerobias

Bacilos gramnegativos (se incluyen las formas curvas, espiraladas y espiroquetas)	<i>Megamonas</i>	<i>Gemmiger</i>	<i>Cryptobacterium</i>
<i>Alistipes</i>	<i>Mitsuokella</i>	<i>Micromonas</i> ^a	<i>Collinsella</i>
<i>Anaerobacter</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Eggerthella</i> ^a
<i>Anaerobiospirillum</i>	<i>Porphyromonas</i> ^a	<i>Peptostreptococcus</i> ^a	<i>Eubacterium</i> ^a
<i>Anaerorhabdus</i>	<i>Prevotella</i> ^a	<i>Ruminococcus</i>	<i>Holdemania</i>
<i>Bacteroides</i> ^a	<i>Propionigenium</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Lachnospira</i>
<i>Bilophila</i> ^a	<i>Propionispira</i>	<i>Peptoniphilus</i> ^a	<i>Lactobacillus</i> ^a
<i>Borrelia</i>	<i>Rikenella</i>	<i>Staphylococcus</i> ^a	<i>Methanobacterium</i>
<i>Butyrivibrio</i> ^c	<i>Ruminobacter</i>	<i>Streptococcus</i> ^a	<i>Mobiluncus</i> ^a
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Sealdella</i>	<i>Gemella</i> ^a	<i>Mogibacterium</i>
<i>Capsularis</i>	<i>Selenomonas</i>		<i>Propionibacterium</i> ^a
<i>Campylobacter</i> ^a	<i>Serpula</i>	Cocos gramnegativos	<i>Roseburia</i>
<i>Catonella</i> ^a	<i>Spirochaeta</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>Shuttleworthia</i>
<i>Centipeda</i>	<i>Succinimonas</i>	<i>Anaeroglobus</i>	<i>Slackia</i> ^a
<i>Cetobacterium</i>	<i>Succinivibrio</i>	<i>Anaerosphaera</i>	<i>Varibaculum</i>
<i>Desulfuromonas</i>	<i>Sutterella</i> ^a	<i>Megasphaera</i>	
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Tannerella</i> ^a	<i>Veillonella</i> ^a	Bacilos grampositivos
<i>Dialister</i> ^a	<i>Tissierella</i>		formadores de esporas
<i>Dichelobacter</i>	<i>Treponema</i>	Bacilos grampositivos	<i>Clostridium</i> ^{a,b}
<i>Faecalibacterium</i>	<i>Wolinella</i>	no formadores de esporas	<i>Desulfotomaculum</i>
<i>Fibrobacter</i>	Cocos grampositivos	<i>Actinobaculum</i>	<i>Desulfosporosinus</i>
<i>Fusobacterium</i> ^a	<i>Anaerococcus</i> ^a	<i>Actinomyces</i> ^a	<i>Caloramator</i> ^b
<i>Johnsonella</i> ^a	<i>Atopobium</i> ^a	<i>Aracnobacterium</i> ^a	<i>Filifactor</i> ^b
<i>Leptotrichia</i>	<i>Coprococcus</i>	<i>Atopobium</i> ^a	<i>Moorella</i> ^b
	<i>Finegoldia</i> ^a	<i>Bifidobacterium</i> ^a	<i>Oxobacter</i> ^b
	<i>Gallicola</i>	<i>Bulleidia</i>	<i>Oxolophagus</i> ^b
		<i>Catenibacterium</i>	

^a En la mayoría de las muestras clínicas, sólo esos géneros necesitarán ser considerados por el microbiólogo clínico. Sin embargo, en raras ocasiones enfermedades graves pueden involucrar a *Anaerobiospirillum*,¹⁹¹ *Leptotrichia*,¹⁴⁴ *Selenomonas*,²⁵⁶ *Desulfovibrio*⁸⁵ y algún otro género que no está listado arriba.

^b El género *Clostridium* está bajo revisión taxonómica. Así, en 1994 fueron propuestos por Collins y cols. cinco nuevos géneros de anaerobios formadores de esporas.⁴⁴ Con una sola excepción, ninguno de ellos se conoce que sea patógeno para los seres humanos. *Filifactor alocis* ha sido aislado en pacientes con infecciones endodónticas.²¹⁸

^c *Butyrivibrio* se trata con los bacilos gramnegativos en el Vol. 1 y con los bacilos anaerobios grampositivos no formadores de esporas irregulares en el Vol. 2 del Manual de Bergey.^{141,223} Aunque son gramnegativos con la tinción de Gram, algunas cepas tienen rasgos de la pared celular grampositiva atípicos mediante microscopía electrónica.

Adaptado y modificado del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey^{141,223} y de varios volúmenes recientes del Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology que contiene numerosas publicaciones relacionadas con cambios recientes en la taxonomía anaerobia.

utilizan PCR y secuenciación de RNA 16S ribosómico. 16S rDNA, PCR de región espaciadora de 16S-23S rRNA y otros métodos moleculares han colocado la clasificación de anaerobios en un terreno mucho más sólido científicamente que el que fue posible usando la caracterización fenotípica y los métodos genéticos más antiguos y menos sofisticados disponibles en el pasado.^{226,227} Estos estudios han brindado descripciones de muchas especies nuevas y otras taxas. Por fortuna, algunas actualizaciones taxonómicas excelentes han simplificado la tarea de mantener los cambios constantes de la nomenclatura.^{67,71,121-123} En el cuadro 16-2 se provee un compendio de cambios, compilados en las dos décadas pasadas, en las designaciones taxonómicas de las bacterias anaerobias clínicamente significativas. En el cuadro 16-3 se enumeran los anaerobios más importantes clínicamente y/o los anaerobios encontrados más a menudo en muestras humanas seleccionadas y recolectadas en forma apropiada. Hasta ahora, las identificaciones de especie correctas pueden tener importantes implicancias respecto del pronóstico, el tratamiento y los resultados clínicos

de los pacientes con enfermedades infecciosas causadas por anaerobios.^{15,69}

Infecciones humanas

Las bacterias anaerobias han sido encontradas en infecciones que comprometen todos los órganos y regiones anatómicas del cuerpo.^{19,69} Algunos de los sitios afectados más a menudo se ilustran en la figura 16-1.

Sobre la base de otros informes de la literatura, la incidencia relativa de anaerobios en infecciones se resume en el cuadro 16-4.^{19,69,70}

Los abscesos asentados más profundos y las lesiones necrosantes que involucran anaerobios son polimicrobianos y pueden incluir aerobios obligados, anaerobios facultativos o microaerófilos como microorganismos acompañantes.^{69,70} Estos microorganismos, actuando en forma conjunta con el trauma, la estasis vascular o la necrosis tisular, reducen la tensión

Cuadro 16-2 Nombres actuales y antiguos de las bacterias anaerobias

NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIOS	NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIO
Bacilos gramnegativos anaerobios		<i>P. disiens</i>	<i>Bacteroides disiens</i> , infecciones genitourinarias
Género <i>Bacteroides</i>	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>P. enoea</i>	Cavidad bucal humana; no pigmentada
<i>Bacteroides caccae</i>	"3452 A", flora fecal humana	<i>P. heparinolytica</i>	<i>Bacteroides heparinolyticus</i>
<i>B. distasonis</i>	Infecciones humanas infrecuentes relacionadas con <i>Tannerella forsythensis</i> (antes <i>B. forsythus</i>)	<i>P. intermedia</i>	<i>Bacteroides intermedius</i> , común en seres humanos; cabeza y cuello, sitios pelvianos, abdominales; pigmentado
<i>B. eggerthii</i>	Flora fecal, no común en infecciones	<i>P. loescheii</i>	<i>Bacteroides loescheii</i> , seres humanos; pigmentado
<i>B. fragilis</i>	El anaerobio más común en infecciones humanas	<i>P. melaninogenica</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i> , infecciones humanas en varios sitios; pigmentado
<i>B. merdae</i>	"T4-1", flora fecal humana, relacionado con <i>T. forsythensis</i> (antes <i>B. forsythus</i>)	<i>P. nigrescens</i>	Antes genotipo II de <i>P. intermedia</i> , seres humanos; pigmentado
<i>B. ovatus</i>	Flora fecal humana, en ocasiones produce infecciones	<i>P. oralis</i>	<i>Bacteroides oralis</i>
<i>B. stercoris</i>	"Subespecie A", flora fecal humana	<i>P. oris</i>	<i>Bacteroides oris</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	La segunda especie de <i>Bacteroides</i> más común en infecciones humanas	<i>P. oulorum</i>	<i>B. oulorum</i> ; <i>Prevotella oulora</i>
<i>B. uniformis</i>	Aislamiento ocasional en infecciones humanas	<i>P. pallens</i>	Especie nueva
<i>B. vulgatus</i>	Común en flora fecal humana, aislamiento ocasional en infecciones	<i>P. salivae</i>	Especie nueva, saliva humana
Otras especies que faltan en el género <i>Bacteroides</i>, pero no del Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>		<i>P. shahii</i>	Especie nueva, saliva humana
<i>B. capillosus</i>	Raro en muestras clínicas	<i>P. tanneriae</i>	Especie nueva, seres humanos; ~40% de cepas pigmentadas
<i>B. coagulans</i>	Raro en muestras clínicas	<i>P. uenoni</i>	<i>Fusobacterium uenonae</i> (especie nueva; Finegold SM: comunicación personal)
<i>B. forsythus</i>	Género nuevo, <i>Tannerella forsythensis</i> , cavidad bucal humana	<i>P. veroralis</i>	<i>Bacteroides veroralis</i>
<i>B. galacturonicus</i>	Flora fecal humana	<i>P. zoogloeiformans</i>	<i>Bacteroides zoogloeiformis</i>
<i>B. heparinolyticus</i>	<i>P. heparinolytica</i> , pero se inhibe por bilis, flora fecal humana	Género <i>Porphyromonas</i>	
<i>B. pectinophilus</i>	Flora fecal humana	<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Bacteroides asaccharolyticus</i> , varias infecciones clínicas humanas; pigmentado
<i>B. splanchnicus</i>	Se asemeja al grupo <i>B. fragilis</i> pero probablemente representa un género nuevo	<i>P. cangingivalis</i>	Perros
<i>B. tectus</i>	<i>B. tectum</i> , gatos y perros	<i>P. canoris</i>	Perros
<i>B. ureolyticus</i>	<i>Bacteroides corrodens</i> , relacionado con el género <i>Campylobacter</i>	<i>P. cansulci</i>	Perros
<i>B. zoogloeiformans</i>	<i>P. zoogloeiformans</i> , relacionado con el grupo <i>B. fragilis</i> , se inhibe por bilis	<i>P. catoniae</i>	<i>Oribaculum catoniae</i> , cavidad bucal humana; la única no pigmentada <i>Porphyromonas</i>
Género <i>Prevotella</i>		<i>P. circumdentaria</i>	Gatos
<i>P. bivia</i>	<i>Bacteroides bivius</i> , infecciones genitourinarias	<i>P. crevioricanis</i>	Perros
<i>P. buccae</i>	<i>Bacteroides buccae</i> , infecciones de cabeza, cuello, tórax	<i>P. endodontalis</i>	<i>Bacteroides endodontalis</i> , seres humanos; pigmentado
<i>P. buccalis</i>	<i>Bacteroides buccalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>Bacteroides gingivalis</i> , infecciones del conducto radicular humano y otras infecciones bucales dentales; pigmentado
<i>P. corporis</i>	<i>Bacteroides corporis</i> , seres humanos; pigmentado	<i>P. gingivicanis</i>	Perros
<i>P. dentalis</i>	<i>Mitsuokella dentalis</i> y <i>Hallela seregens</i>	<i>P. gulae</i>	Surcos gingivales, varios animales
<i>P. denticola</i>	<i>Bacteroides denticola</i> , seres humanos; pigmentado	<i>P. levii</i>	<i>Bacteroides levii</i> , ganado
		<i>P. macacae</i>	<i>Bacteroides macacae</i> , monos; <i>Porphyromonas salivosa</i> , gatos; <i>Bacteroides salivus</i> , gatos

(Continúa)

Cuadro 16-2 Nombres actuales y antiguos de las bacterias anaerobias (cont.)

NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIOS	NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIO
Género <i>Fusobacterium</i>		<i>C. rectus</i>	<i>Wolinella recta</i>
<i>F. gonidiaformans</i>	Infecciones humanas	<i>C. showae</i>	Cavidad bucal humana
<i>F. mortiferum</i>	Infecciones humanas; se asemeja a <i>F. varium</i> y <i>F. ulcerans</i>	<i>C. sputorum</i>	
<i>F. naviforme</i>	Infecciones humanas	Género <i>Capnocytophaga</i>	
<i>F. necrogenes</i>	Heces humanas, animales	<i>C. canimorsus</i>	Grupo DF-2 de los CDC; infecciones humanas después de mordedura de perro
<i>F. necrophorum</i> subesp. <i>funduliforme</i>	<i>F. necrophorum</i> biovariedad B. lipasa negativa; menos virulento que la subespecie <i>necrophorum</i>	<i>C. cynodegmi</i>	Infecciones humanas después de mordedura de perro
<i>F. necrophorum</i> subesp. <i>necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i> biovariedad A-Lipasa positiva; la subespecie más virulenta	<i>C. gingivalis</i>	
<i>F. nucleatum</i> , actualmente con las siguientes cinco subespecies:	<i>animalis</i> <i>fusiforme</i> <i>nucleatum</i> <i>polymorphum</i> <i>vincentii</i>	<i>C. granulosa</i>	Placa dental
<i>F. periodonticum</i>	Relacionado con <i>F. nucleatum</i>	<i>C. haemolytica</i>	Placa dental
<i>F. rusii</i>	Heces humanas	<i>C. ochracea</i>	<i>Bacteroides ochraceus</i>
<i>F. ulcerans</i>	Especie nueva, úlceras cutáneas	<i>C. sputigena</i>	
<i>F. varium</i>	Varias infecciones humanas	Más géneros de bacilos gramnegativos	
Otras especies de <i>Fusobacterium</i> encontradas en animales		<i>Catonella morbi</i>	Relacionado con el subfilo <i>Clostridium</i> de bacterias grampositivas, grupo XIVa
<i>F. equinum</i>	Cavidad bucal de caballos	<i>Centipeda periodontii</i>	Relacionado con el subfilo <i>Clostridium</i> de bacterias grampositivas, grupo XIVa.
<i>F. perfoetans</i>	Heces de cerdos	<i>Cetobacterium somerae</i>	Especies nuevas, heces humanas
<i>F. russii</i>	Flora bucal de caninos y felinos	<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Desulfomonas pigra</i>
<i>F. simiae</i>	Boca de macacos	<i>Dialister pneumosintes</i>	<i>Bacteroides pneumosintes</i> ; relacionado con la rama <i>Sporomusa</i> del subfilo <i>Clostridium</i> , grupo IX
Otros géneros de bacilo(s) gramnegativos anaerobios		<i>Dichelobacter nodosus</i>	<i>Bacteroides nodosus</i> , necrosis de patas de oveja y ganado vacuno
<i>Alistipes finegoldii</i>	Especie nueva, apendicitis humana	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Fusobacterium prausnitzii</i> , heces humanas; relacionado con el subfilo <i>Clostridium</i> , grupo IV
<i>A. putredinis</i>	<i>Bacteroides putredinis</i> , género nuevo; raro, infecciones intraabdominales humanas	<i>Fibrobacter intestinalis</i>	Especies nuevas
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Bacteriemia en seres humanos; heces humanas, de gatos y de perros	<i>F. succinogenes</i>	<i>Bacteroides succinogenes</i>
<i>Anerobiospirillum thomasi</i>	Especie nueva; heces humanas, de gatos y de perros	<i>Filifactor alocis</i>	<i>Fusobacterium alocis</i> , gingivitis humana
<i>Anaerostipes caccae</i>	Especie nueva; heces humanas	<i>Johnsonella ignava</i>	Relacionado con el subfilo <i>Clostridium</i> de bacterias grampositivas, grupo XIVa
<i>Anaerorhabdus furcosa</i>	<i>Bacteroides furcosus</i> ; <i>Anaerorhabdus furcosus</i>	Género <i>Leptotrichia</i>	
<i>Bilophila wadsworthia</i>	Infecciones humanas	<i>L. amnionii</i>	En el filo <i>Fusobacterium</i> Especies nuevas, líquido amniótico; relacionado con especies de <i>Sneathia</i>
Género <i>Campylobacter</i>		<i>L. buccalis</i>	" <i>Leptothrix buccalis</i> "
<i>C. concisus</i>		<i>L. goodfellowii</i>	Especie nueva, sangre
<i>C. curvus</i>	<i>Wolinella curva</i>	<i>L. hofstadii</i>	Especie nueva, saliva
<i>C. gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i>	<i>L. shahii</i>	Especie nueva, gingivitis
<i>C. hominis</i>	Especie nueva, tubo digestivo humano	<i>L. trevisanii</i>	Especie nueva, bacteriemia
		<i>L. wadei</i>	Especie nueva, saliva

Cuadro 16-2 Nombres actuales y antiguos de las bacterias anaerobias (cont.)

NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIOS	NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIO
<i>Mitsuokella multiacida</i>	<i>Bacteroides multiacidus</i> ; relacionado con la rama <i>Sporomusa</i> del subfilo <i>Clostridium</i> grupo IX	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> , secreciones vaginales, abscesos ováricos, peritoneales y otros; no produce ácido de hidratos de carbono
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Colon humano, degrada oxalato de calcio	<i>P. harei</i>	<i>Peptostreptococcus harei</i> , pus de úlcera sacra humana
<i>Rikenella microfus</i>	<i>Bacteroides microfus</i>	<i>P. indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i> , ganado (mastitis); indol positivo, coagulasa positiva
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>P. ivorii</i>	<i>Peptostreptococcus ivorii</i> , úlceras en piernas humanas
<i>Sebaldella termitidis</i>	<i>Bacteroides termitidis</i>	<i>P. lacrimalis</i>	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i> , abscesos de glándulas lagrimales humanas
Género <i>Selenomonas</i>		Otros cocos grampositivos anaerobios	
<i>S. artemidis</i>		<i>Atopobium minutum</i>	<i>Lactobacillus minutus</i> , heridas abdominales humanas, abscesos pelvianos
<i>S. diana</i>	Surco gingival humano	<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Streptococcus parvulus</i> , abscesos dentales; flora del surco gingival
<i>S. flueggei</i>	Flora bucal humana	<i>Atopobium rimae</i>	<i>Lactobacillus rimae</i> , abscesos dentales; flora del surco gingival
<i>S. infelix</i>	Surco gingival humano	<i>Atopobium vaginae</i>	Especie nueva, flora vaginal humana
<i>S. noxia</i>	Surco gingival humano	<i>Coprococcus catus</i>	Heces humanas
<i>Sneathia sanguinegens</i>	<i>Leptotrichia sanguinegens</i> , bacteriemia en seres humanos	<i>Coprococcus comes</i>	Heces humanas
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	<i>Campylobacter (Bacteroides) gracilis</i> , en parte	<i>Coprococcus eutactus</i>	Heces humanas
<i>Tannerella forsythensis</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Streptococcus morbillorum</i>
<i>Tissierella praeacuta</i>	<i>Bacteroides praeacutus</i> , relacionado con el subfilo <i>Clostridium</i> de bacterias grampositivas, grupo XII	<i>Ruminococcus hansenii</i>	<i>Streptococcus hansenii</i>
Cocos anaerobios		<i>Ruminococcus productus</i>	<i>Streptococcus productus</i>
Cocos grampositivos		<i>Sarcina ventriculi</i>	Enfermedad estomacal y de colon en seres humanos
<i>Peptococcus niger</i>	Sólo especie faltante en este género	Los cocos grampositivos no considerados anaerobios verdaderos pueden aparecer al principio como anaerobios en aislamientos primarios, pero en subcultivos crecen en atmósfera con 10% de CO₂	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Sólo especie faltante en este género	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	<i>Peptococcus saccharolyticus</i>
Cocos anaerobios reclasificados		<i>Streptococcus anginosus</i>	Grupo "S. milleri"
<i>Anaerococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , secreciones vaginales, abscesos peritoneales y ováricos	<i>S. constellatus</i>	Grupo "S. milleri"
<i>A. tetradius</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i> , secreciones vaginales, abscesos ováricos	<i>S. intermedius</i>	"S. MG-intermedius", "S. MG"
<i>A. hydrogenalis</i>	<i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i> , secreciones vaginales, abscesos ováricos	Cocos gramnegativos	
<i>A. vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus vaginalis</i> , secreciones vaginales, abscesos ováricos	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Muestras clínicas humanas; también heces humanas y de perros
<i>A. lactolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus lactolyticus</i> , secreciones vaginales, abscesos ováricos	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	Especie nueva, boca humana, tubo digestivo; materiales clínicos
<i>A. octavius</i>	<i>Peptostreptococcus octavius</i> , cavidad nasal humana, piel, vagina	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Heces humanas y muestras clínicas; rumen de ganado vacuno y ovino, intestino de cerdos
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i> , infecciones articulares y óseas, de tejidos blandos humanos; flora vaginal y fecal		
<i>Gallicola barnesae</i>	<i>Peptostreptococcus barnesae</i> , aislado en heces de pollos		
<i>Micromonas micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i> , muestras humanas que incluyen boca; flora de la boca, heces y vagina		

(Continúa)

Cuadro 16-2 Nombres actuales y antiguos de las bacterias anaerobias (cont.)

NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIOS	NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIO
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	<i>Actinomyces</i> (grupo 2 corineforme de los CDC) <i>bernardiae</i> , orígenes humanos
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	Especie nueva, deteriora la cerveza	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Actinomyces</i> (<i>Corynebacterium</i>) <i>pyogenes</i> , orígenes humanos
<i>Veillonella atypica</i>	Flora humana o de muestras clínicas durante procesos infecciosos	Género Bifidobacterium	
<i>V. dispar</i>	Flora humana o de muestras clínicas durante procesos infecciosos	<i>B. breve</i>	
<i>V. parvula</i>	Flora humana o de muestras clínicas durante procesos infecciosos	<i>B. denticolens</i>	No más <i>Bifidobacterium</i> , ahora <i>Parascardovia denticolens</i>
<i>V. ratti</i>	Semen humano	<i>B. dentium</i>	<i>Bifidobacterium ericksonii</i>
<i>V. montpellierensis</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>B. gallicum</i>	Heces humanas
Bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas		<i>B. inopinatum</i>	No más <i>Bifidobacterium</i> , ahora <i>Scardovia inopinata</i> , heces humanas
Género Actinomyces		<i>B. longum</i>	Caries dentales humanas; ahora con tres biotipos: <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> y <i>B. suis</i>
<i>A. cardiffensis</i>	Especie nueva, fuentes clínicas humanas que incluyen abscesos de varios sitios	Género Eubacterium	
<i>A. europaeus</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>E. bifforme</i>	Flora fecal humana
<i>A. funkei</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>E. brachy</i>	Periodontitis humana
<i>A. georgiae</i>	Surco gingival humano	<i>E. infirmum</i>	Especie nueva bucal, asacarolítica
<i>A. gerencseriae</i>	Flora periodontal humana	<i>E. minutum</i>	<i>Eubacterium tardum</i> , un sinónimo (no tiene prioridad)
<i>A. graevenitzii</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>E. saphenum</i>	Dentadura humana
<i>A. hongkongensis</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>E. sulci</i>	<i>Fusobacterium sulci</i>
<i>A. israelii</i>	Principal causa de actinomycosis humana	<i>E. yurii</i> subesp. <i>margaretiae</i>	Placa dental humana
<i>A. meyeri</i>	Surcos periodontales humanos, absceso de cerebro; infecciones de cabeza y cuello	<i>E. yurii</i> subesp. <i>schtika</i>	Placa dental humana
<i>A. naeslundii</i>	Causa de actinomycosis	<i>E. yurii</i> subesp. <i>yurii</i>	Placa dental humana
<i>A. nasicola</i>	Especie nueva, nariz humana	Género Lactobacillus	
<i>A. neuii</i> subesp. <i>neuii</i>	Grupo 1 corineforme de los CDC; de fuentes humanas	<i>L. coleohominis</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas
<i>A. neuii</i> subesp. <i>anitratus</i>	"Similar" al grupo 1 corineforme de los CDC; de fuentes humanas	<i>L. oris</i>	Saliva humana
<i>A. odontolyticus</i>	Cavidad bucal humana, causa rara de actinomycosis	<i>L. paraplantarum</i>	Especie nueva, heces humanas
<i>A. oricola</i>	Especie nueva, abscesos dentales humanos	<i>L. rimae</i>	Surcos gingivales humanos
<i>A. radidentis</i>	Especie nueva, conductos radiculares de dientes infectados	<i>L. uli</i>	Surcos gingivales humanos
<i>A. radingae</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	Otros recientes cambios en los bacilos grampositivos no formadores de esporas	
<i>A. turicensis</i>	Especie nueva, muestras clínicas humanas	<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	Género y especie nuevos, heces humanas: relacionada con el rRNA del grupo XV del subfilo <i>Clostridium</i> de bacterias grampositivas
<i>A. urogenitalis</i>	Especie nueva, aparato urogenital humano	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	Género y especie nuevos, heces humanas: relacionada con el grupo <i>leptum</i> rRNA <i>Clostridium</i> de bacterias
<i>A. viscosus</i>	Cavidad bucal humana y origen cervicovaginal; en ocasiones actinomycosis	Especies de <i>Atopobium</i>	Género nuevo; bacterias cocoides; listadas en otro sitio con los cocos grampositivos anaerobios
Otros géneros muy relacionados con Actinomyces			
<i>Actinobaculum schaalii</i>	Especie nueva, sangre humana; hábitat desconocido		
<i>Actinobaculum urinale</i>	Especie nueva, orina humana		

Cuadro 16-2 Nombres actuales y antiguos de las bacterias anaerobias (cont.)

NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIOS	NOMBRE ACTUAL	NOMBRE ANTIGUO/COMENTARIO
<i>Bulleidia extructa</i>	Género y especie nuevos, cavidad bucal humana	Bacilos grampositivos formadores de esporas	
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	Género y especie nuevos, heces humanas	<i>Clostridium</i>: ser humano	
<i>Collinsella aerofaciens</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium aerofaciens</i> , flora fecal humana	<i>C. argentinense</i>	<i>C. botulinum</i> tipo G y algunos <i>C. hastiforme</i> y <i>C. subterminale</i> no toxigénicos
<i>Collinsella stercolis</i>	Especie nueva, flora fecal humana	<i>C. baratii</i>	<i>C. baratii</i> , <i>C. paraperfringens</i> , <i>C. perenne</i>
<i>Collinsella intestinalis</i>	Especie nueva, flora fecal humana	<i>Clostridium bartlettii</i>	Especie nueva, aislada en heces humanas
<i>Cryptobacterium curtum</i>	Género y especie nuevos, cavidad bucal humana	<i>Clostridium bolteae</i>	Especie nueva, aislada en heces humanas, en especial de niños con autismo
<i>Dorea formicigenerans</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium formicigenerans</i> , heces humanas	<i>Clostridium botulinum</i>	Conservación de <i>Clostridium botulinum</i> (toxigénico) y <i>C. sporogenes</i> (no toxigénico) que están genéticamente relacionados con el nivel de especie; exclusión de <i>C. putrificum</i> (un sinónimo anterior)
<i>Dorea longicatena</i>	Especie nueva, heces humanas	<i>C. butyricum</i>	<i>C. pseudotetanicum</i>
<i>Eggerthella lenta</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium lentum</i> , heces humanas	<i>Clostridium clostridioforme</i>	Cepas humanas identificadas fenotípicamente como <i>C. clostridioforme</i> se encontró que eran <i>C. bolteae</i> , <i>C. clostridioforme</i> o <i>Clostridium hathewayi</i>
<i>Holdemania filiformis</i>	Género y especie nuevos, heces humanas	<i>Clostridium hathewayi</i>	Especie nueva, aislada en heces humanas
<i>Mobiluncus curtisii</i>	Propuesto para enmendar <i>M. curtisii</i> (para incluir aquellos antes llamados <i>Falcivibrio vaginalis</i> ; también se incluyen las subespecies de <i>Mobiluncus curtisii</i>)	<i>Clostridium hiranonis</i>	Especie nueva, aislada en heces humanas
<i>Mogibacterium pumilum</i>	Género y especie nuevos, cavidad bucal humana	<i>Clostridium hylemonae</i>	Especie nueva, aislada en heces humanas
<i>Mogibacterium vescum</i>	Género y especie nuevos, cavidad bucal humana	<i>C. methylpentosum</i>	Flora fecal humana
<i>Mogibacterium timidum</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium timidum</i>	<i>C. orbiscindens</i>	Flora fecal humana
<i>Mogibacterium diversum</i>	Especie nueva, cavidad bucal humana	<i>Clostridium neonatale</i>	Especie nueva, aislada en heces y sangre de lactantes con enterocolitis necrosante neonatal
<i>Mogibacterium neglectum</i>	Especie nueva, cavidad bucal humana	<i>C. orbiscindens</i>	Flora fecal humana
<i>Olsenella profusa</i>	Especie nueva, cavidad bucal humana	<i>C. perfringens</i>	<i>C. welchii</i>
<i>Propionibacterium propionicum</i>	<i>Arachnia propionica</i>	<i>C. ramosum</i>	<i>Eubacterium filamentosum</i> , <i>Ramibacterium ramosum</i> , <i>Actinomyces ramosus</i> , <i>Eubacterium ramosus</i>
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium alactolyticum</i>	<i>C. scindens</i>	Especie nueva, flora fecal humana
<i>Roseburia intestinalis</i>	Especie nueva, heces humanas	<i>C. symbiosum</i>	<i>Fusobacterium symbiosum</i>
<i>Shuttleworthia satelles</i>	Género y especie nuevos, cavidad bucal humana	<i>C. tetanomorphum</i>	Nombre en revisión, infecciones humanas
<i>Slackia exigua</i>	Género nuevo, <i>Eubacterium exiguum</i>		
<i>Slackia heliontrireducens</i>	<i>Peptostreptococcus heliontrireducens</i>		
<i>Varibaculum cambriensis</i>	Género y especie nuevos, bacterias similares a <i>Actinomyces</i> de muestras clínicas humanas		

Ésta no intenta ser una lista completa. No se han incluido numerosas especies sin relevancia clínica o en duda de tenerla, en especial de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Basado en la información compilada de 1) referencias^{71,122,125,177} y 2) numerosas publicaciones en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volúmenes 47-54; 1997-2004.

de oxígeno y el potencial de oxidorreducción en los tejidos y proveen las condiciones favorables para la multiplicación de los anaerobios obligados. Las infecciones y enfermedades en las que intervienen anaerobios de fuentes exógenas son las mejor conocidas (recuadro 16-2).

Sin embargo, en las últimas décadas, las infecciones anaerobias endógenas se han vuelto mucho más comunes. Existen dos probables explicaciones. Una es que el aislamiento por parte del laboratorio de las bacterias anaerobias ha mejorado de modo que las infecciones endógenas no son más mal diagnos-

Cuadro 16-3 Anaerobios clínicamente más importantes o encontrados con más frecuencia en muestras clínicas**Bacilos gramnegativos**

Grupo *Bacteroides fragilis* (en especial *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis* y *B. ovatus*)

Otros *Bacteroides* (*B. ureolyticus*)

Porphyromonas (en especial *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis* y *P. endodontalis*)

Prevotella pigmentada (*P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. denticola*, *P. tannerae*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. corporis*)

Prevotella no pigmentada (grupo *P. oralis*, *P. oris/buccae*, *P. bivia*, *P. disiens*)

Fusobacterium (en especial *F. nucleatum*, *F. necrophorum*, *F. mortiferum* y *F. varium*)

Bilophila wadsworthia

Cocos anaerobios

Cocos grampositivos (en especial *Peptostreptococcus anaerobius*, *Finegoldia magna*, *Micromonas micros*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Anaerococcus prevotii* y los estreptococos microaerófilos, incluido *Streptococcus intermedius*)

Cocos gramnegativos (especies de *Veillonella*)

Bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas

Actinomyces (en especial *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* y *A. viscosus*)

Propionibacterium (*P. acnes* y *P. propionicum*)

Bifidobacterium dentium

Eubacterium (*E. limosum* y *Eggerhella lenta* [*Eubacterium lentum*])

Bacilos grampositivos formadores de esporas

Clostridium

C. perfringens

Grupo *C. clostridioforme* (en especial *C. clostridioforme*, *C. hathewayi* y *C. boltea*)

C. innocuum

C. ramosum

C. difficile

C. bifermentans

C. sporogenes

C. septicum

C. sordellii

C. novyi

C. histolyticum

C. botulinum

C. tetani

ticadas o pasan inadvertidas como antes. La otra es que una proporción mucho mayor de pacientes están recibiendo fármacos inmunosupresores por neoplasias u otras afecciones, lo que deriva en la resistencia del huésped inmunodeprimido.^{9,69,70} Las infecciones anaerobias primarias se establecen fácilmente en áreas de tejido dañado y la bacteriemia, diseminación metastásica de las bacterias con formación de abscesos distantes y una cadena progresiva de eventos, puede suceder algunas veces con un desenlace mortal. Las infecciones anaerobias endógenas más comunes se enumeran en el recuadro 16-3.

Es esencial aislar e identificar las bacterias anaerobias porque 1) estas infecciones están asociadas con elevada morbimortalidad y 2) el tratamiento de la infección varía con la especie bacteriana implicada. La terapia con antibióticos para ciertas infecciones con anaerobios es diferente de la usada para muchas infecciones causadas por bacterias aerobias o anaerobias facultativas.^{19,69} La indicación de intervención quirúrgica, que incluye el desbridamiento de tejido necrótico o la amputa-

ción de un miembro, puede ser de importancia extrema, en particular en los casos de gangrena gaseosa por clostridios o en abscesos localizados en los cuales los antibióticos pueden ser ineficaces hasta que se drene el exudado.

Antes de mediados de la década de 1960, predominaban las infecciones clostridianas. Sin embargo, en los últimos años, 15% de todos los aislamientos anaerobios en tales muestras fueron especies de *Clostridium*.¹³⁵ En la actualidad, más de tres cuartas partes de los anaerobios aislados en muestras clínicas seleccionadas en forma adecuada pertenecen al grupo de *Bacteroides fragilis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, cocos anaerobios y bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas (véase cuadro 16-3).

Los bacilos gramnegativos anaerobios no formadores de esporas aislados en muestras clínicas que causan enfermedad con mayor frecuencia son *Bacteroides fragilis* y los grupos *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentados (antes *Bacteroides* pigmentados) y *Fusobacterium nucleatum*. *B. fragilis*, *B. the-*

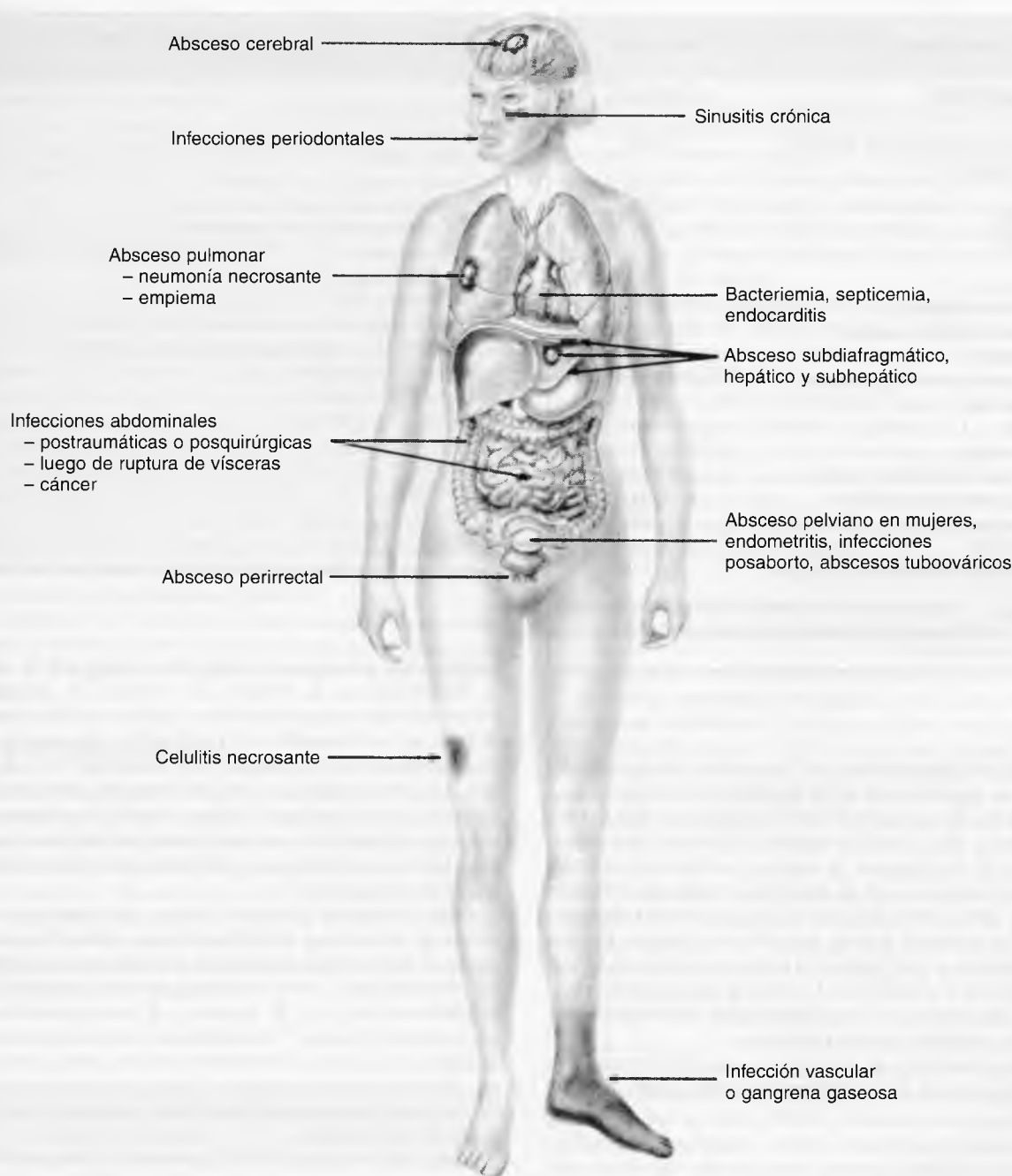


Figura 16-1 Localizaciones comunes de infecciones que involucran bacterias anaerobias.

taiotaomicron y otras especies del grupo *B. fragilis* son bastante comunes. Son importantes no sólo porque pueden aislarse en diversas infecciones potencialmente mortales, sino también debido a su resistencia a la acción de la penicilina y sus análogos; su resistencia a muchas cefalosporinas, incluidas las cefalosporinas de tercera generación; las tetraciclinas; los aminoglucósidos; el surgimiento de resistencia a varias de las quinolonas más nuevas, y el incremento de la resistencia a la clindamicina.^{48,58,64,84,186,188,224}

La penicilina G fue históricamente el antibiótico de elección para las infecciones clínicas causadas por la mayoría de las bacterias anaerobias. Ahora, además del grupo *B. fragilis*,

Fusobacterium mortiferum, *F. varium*, miembros del grupo *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentado, *Prevotella bivia*, *P. disiens* y algunas especies de *Clostridium* son resistentes a la penicilina G, a algunos de sus análogos y a algunas de las cefalosporinas. Aunque los clostridios se aíslan en infecciones anaerobias con menos frecuencia que las especies de *Bacteroides*, las especies de *Fusobacterium* y los cocos anaerobios pueden ser responsables de enfermedades potencialmente mortales.

Las especies de *Clostridium* más comunes aisladas de origen clínico son *C. perfringens*, el grupo *C. clostridioforme*, *C. ramosum*, *C. difficile*, *C. innocuum*, *C. septicum*, *C. sordellii* y *C. bifermentans* (véase cuadro 16-3).⁷ Se desconoce la relevan-

Cuadro 16-4 Incidencia de anaerobios en las infecciones

TIPO DE INFECCIÓN	INCIDENCIA (%)
Neumonía por aspiración, absceso pulmonar, neumonía necrosante	62-93
Bacteriemia	6-10
Absceso cerebral	60-89
Sinusitis crónica	52
Dental/bucal	90-100
Empiema (torácico)	76
Sepsis intraabdominal/pelviana	60-100
Otras infecciones de tejidos blandos:	
Absceso mamario	53-83
Heridas posapendicectomía y poscirugía electiva de colon	79-95
Osteomielitis	40
Absceso perirrectal	77
Abscesos cutáneos y de tejidos blandos	60-62
Celulitis crepitantes no clostridianas	75
Gangrena gaseosa (mionecrosis clostridiana)	100
Absceso pilonidal	88
Gangrena diabética infectada, úlceras de pie diabético	85-95
Infección urinaria	≤ 1

Modificado de las referencias^{19,69,70}.

cia clínica de muchas especies de *Clostridium*: en la mayoría de los casos, su significación varía según el contexto clínico.

El aislamiento de una especie de *Clostridium* en una herida, un hemocultivo u otro líquido corporal no siempre tiene significado clínico. *C. perfringens*, la especie de *Clostridium* aislada con mayor frecuencia, es un residente común del intestino grueso; éste y otros clostridios contaminan en forma transitoria la piel del área perianal y otras superficies cutáneas. *C. perfringens* no siempre es patógena. Sin embargo, junto con *C. difficile*, *C. septicum*, *C. botulinum*, *C. tetani* y algunos otros clostridios están asociados con las enfermedades más importantes y se tratan más adelante en este capítulo.

Actinomyces israelii es la principal causa de actinomicosis. Otras especies que se han establecido como causa de esta

Recuadro 16-3 Infecciones anaerobias de origen endógeno

Absceso de algún órgano
Actinomicosis
Artritis séptica
Celulitis crepitante o no crepitante
Complicaciones de apendicitis o colecistitis
Diarrea y colitis asociadas con antibióticos
Empiema subdural
Empiema torácico
Endocarditis
Infecciones dentales o peridontales
Meningitis, por lo general posterior a absceso cerebral
Mionecrosis clostridiana
Neumonía necrosante
Neumonía por aspiración
Osteomielitis
Otitis media
Peritonitis
Sinusitis
Tétanos

enfermedad, aunque con menos frecuencia, son *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. viscosus*, *A. gerencseriae* y *Propionibacterium propionicum* (antes *Arachnia propionica*). Si bien se las encuentra con relativa baja frecuencia en muestras habituales, estas especies son patógenos bien documentados. La actinomicosis es una enfermedad infecciosa aguda y crónica caracterizada por lesiones supuradas, abscesos y fístulas. La enfermedad se presenta como actinomicosis cervicofacial, torácica, abdominal o pelviana, pero puede afectar otras regiones del cuerpo.^{6,202}

Bifidobacterium eriksonii (antes *Actinomyces eriksonii*, ahora se denomina *Bifidobacterium dentium*), una posible causa de infecciones genitales y pulmonares, es la única especie documentada como patógena de este género.^{34,70,72} Otras bifidobacterias (p. ej., *B. longum* y *B. breve*) se aíslan rara vez en muestras clínicas;¹⁷⁷ sin embargo, no se conoce que tengan significación clínica. *Propionibacterium acnes*, por lo general un contaminante en muestras clínicas, ha sido aislado en casos de endocarditis y otras enfermedades, a menudo asociadas con prótesis implantadas.

Entre los cocos anaerobios encontrados con mayor frecuencia en muestras clínicas se incluyen *Fingoldia magna* (antes *Peptostreptococcus magnus*), *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* (antes *Peptostreptococcus asaccharolyticus*), *Anaerococcus prevotii* (antes *Peptostreptococcus prevotii*), *Micromonas micros* (antes *Peptostreptococcus micros*) y *Streptococcus intermedius*.¹³⁵ Los cambios de la nomenclatura actual para los cocos anaerobios se presentan en el cuadro 16-2. Existe una pequeña duda de que algunos cocos anaerobios son patógenos para los seres humanos en ciertos cuadros clínicos. En la Mayo Clinic se aisló *F. magna* en el 10% de los cultivos anaerobios recogidos de pacientes con infecciones sospechosas y fue el coco grampositivo aislado con mayor frecuencia.³¹ Estuvo involucrado en infecciones óseas, articulares, de tejidos blandos, úlceras de pie e infecciones abdominales.

Los cocos anaerobios y microaerófilos también son importantes en abscesos cerebrales, sinusitis maxilar crónica e infec-

Recuadro 16-2 Infecciones anaerobias de origen exógeno

Diarrea hospitalaria por *Clostridium difficile*
Botulismo de origen alimentario
Botulismo infantil
Botulismo por heridas
Gastroenteritis por *Clostridium perfringens*
Mionecrosis (gangrena gaseosa)
Tétanos
Celulitis crepitante
Infecciones superficiales benignas
Infecciones posteriores a mordedura de animales o humanas
Infecciones por abuso de drogas intravenosas
Aborto séptico

ciones pelvianas y pleuropulmonares. Mientras que la mayoría de los antibióticos de primera línea usados en tratamientos empíricos de infecciones anaerobias (en general) son activos contra la mayoría de esas bacterias, se ha informado resistencia a clindamicina, metronidazol, ciprofloxacina, penicilina G, otras penicilinas y ciertas cefalosporinas entre cepas ocasionales de cocos anaerobios.^{2,181}

Aislamiento de bacterias anaerobias

Los pasos por seguir para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones bacterianas por anaerobios son similares a los de las infecciones bacterianas no producidas por anaerobios que se describen en los capítulos 1 y 2 de este libro. En particular, es importante que se ponga atención en la selección, recolección y transporte adecuados de las muestras clínicas para el aislamiento de bacterias anaerobias. El procesamiento de las muestras, la elección de los medios de cultivo, los métodos de inoculación e incubación, y la inspección de los cultivos positivos son procedimientos de laboratorio que requieren controles de calidad. La realización de algunos de los pasos en forma incorrecta puede conducir a resultados erróneos y proporcionar así una información equivocada al médico.

En los capítulos 1 y 2 se explica cada uno de estos pasos en detalle, con la excepción de los hemocultivos anaerobios; aquí se ofrecen sólo algunos comentarios atinentes a las bacterias anaerobias.

Selección de las muestras para cultivo

Con escasas excepciones, todos los materiales recogidos de lugares que carecen de flora natural, como líquidos corporales que no sea orina, exudados de abscesos profundos, aspirados con aguja fina y biopsias de tejidos, pueden ser cultivados para bacterias anaerobias. Sin embargo, como los anaerobios suelen habitar la piel y las mucosas como parte de la flora normal, las muestras mencionadas en la lista del cuadro 12-5 son casi siempre inaceptables para el cultivo anaerobio porque es imposible interpretar los resultados.

Cuadro 16-5 Muestras que no deben cultivarse en medios para anaerobios

HISOPADOS FARÍNGEOS O NASOFARÍNGEOS

- Hisopados gingivales
- Muestras broncoscópicas o esputo
- Contenido gástrico, contenido de intestino delgado, heces, hisopados rectales, fístulas colonocutáneas, estomas de colostomía^a
- Superficies de úlceras por decúbito, hisopados de muestras de costras de abscesos, revestimientos mucosos y escaras
- Materiales adyacentes a la piel o las mucosas además de los no han sido descontaminados en forma adecuada
- Orina de micción espontánea
- Hisopados cervicales o vaginales

^a Cuando se indican clínicamente, las muestras de estos orígenes pueden ayudar al diagnóstico de botulismo y para enfermedades intestinales causadas por *Clostridium difficile* o *C. perfringens*.

Recolección y transporte de las muestras

Cuando se recolectan las muestras a través de la piel o mucosas, se deben tomar estrictas precauciones para descontaminar en forma adecuada la superficie. Se debe usar un jabón quirúrgico para la limpieza, seguido de la aplicación de alcohol etílico o isopropílico al 70%, luego tintura de yodo durante 1 minuto (en círculos concéntricos comenzando desde el centro). Dado que algunos pacientes son sensibles o alérgicos a la tintura de yodo, es importante sacar el yodo con alcohol después de recolectar la muestra.

Otra alternativa satisfactoria es la limpieza de la piel con alcohol seguida de la aplicación de yodopovidona al 10% (Betadine®), luego de lo cual se espera al menos 2 minutos antes de la extracción de la muestra.

Cuando sea posible se debe usar aguja y jeringa para recolectar muestras para cultivos anaerobios. La recolección de muestras con hisopos debe rechazarse porque expone a los anaerobios, si están presentes, a ambientes oxigenados. Una vez recogidas las muestras, se deben tomar precauciones particulares para protegerlas de la exposición al oxígeno y remitirlas al laboratorio lo antes posible.

Hemocultivos anaerobios (resumen de las pautas para el caldo tradicional y los sistemas instrumentados)

Las técnicas de hemocultivo deberían permitir el aislamiento óptimo de anaerobios obligados tanto como de aerobios y anaerobios facultativos. Durante muchos años, los anaerobios se encontraron en casi 9-20% de todos los grupos de hemocultivos positivos en un gran número de centros médicos.⁶⁸ En el período que se extiende desde los últimos años de la década de 1980 hasta principios de 1990, el porcentaje de cocos grampositivos (p. ej., estafilococos, enterococos, estreptococos) y *Enterobacteriaceae* aumentó en el Indiana University Medical Center y en todos lados, probablemente como resultado de los cambios en el tratamiento antibiótico y en las proporciones mayores de pacientes inmunodeprimidos en cuidados terciarios. Durante las dos décadas pasadas, se informó que los anaerobios representaban sólo el 2-5% de las bacteriemias.^{47,51,140,153,184} Recientemente se ha documentado en el Indiana University Medical Center un incremento relativo del número de pacientes con bacteriemia que comprende especies del grupo *Bacteroides fragilis* que eran menos comunes durante las décadas de 1970 y 1980, y ahora son más resistentes a los antibióticos.⁵ Además, se está encontrando mayor número de *Fusobacterium mortiferum*, especies de *Clostridium*, *Leptotrichia buccalis*, especies de *Lactobacillus* y especies de *Actinomyces*, que reflejan el surgimiento de anaerobios ahora resistentes a una amplia variedad de antibióticos. Un informe reciente comunicó que las infecciones de pacientes con bacteriemia por *Bacteroides* resistentes a los antibióticos tienen mal pronóstico,¹⁸⁶ lo que renueva el interés en el diagnóstico de laboratorio de bacteriemia anaerobia y en la necesidad de pruebas de sensibilidad a los antibióticos para estas bacterias.⁹⁸

De modo similar a la recolección de otras muestras, es muy importante la descontaminación de la piel en el sitio de la venopunción. Durante mucho tiempo se recomendó preparar la piel antes de la venopunción, con alcohol y yodopovidona.¹⁹⁷ Como alternativa, la clorhexidina parece ser comparable con el alcohol y la yodopovidona o con el alcohol y la tintura de yodo^{14,175} y se la utiliza para la antisepsia de la piel en algunos centros médicos. Se ha recomendado que la contaminación de los hemocultivos con flora cutánea (en especial por *Propionibacte-*

rium acnes y estafilococos coagulasa negativos) sea menor del 3% de todas las muestras de hemocultivos, aunque existe una amplia variabilidad entre las instituciones.²⁰⁷ Además, la sangre para cultivo no debe ser extraída a través de catéteres venosos arteriales permanentes, a menos que no pueda obtenerse por venopunción.¹⁹⁷ Para optimizar el aislamiento de microorganismos en pacientes con infecciones en el torrente circulatorio, el volumen de la muestra de sangre extraída por venopunción en pacientes adultos debe ser de 20 a 30 mL.²⁵² Si se usa el sistema Bactec® (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), una muestra de 20 mL de sangre puede ser fraccionada en tres frascos estándares para anaerobios y aerobios (~7 mL/frasco). Uno o dos de esos frascos pueden ser para cultivos anaerobios y el restante para incubación aerobia. De modo alternativo, 8-10 mL de sangre se pueden inocular en cada Bactec Plus® (Anaerobic/F y Aerobic/F) u 8-10 mL de sangre en un frasco Bactec Lytic/10 Anaerobic/F®. Para recién nacidos y niños mayores, se pueden extraer volúmenes más pequeños (p. ej., ≤ 0,5 mL para un lactante; 2-5 mL para un niño mayor). La recolección de más de dos a tres muestras de sangre por un período de 24 horas para diagnosticar un episodio sospechoso de bacteriemia no es necesaria y no se recomienda.^{197,255}

Varias formulaciones de medios de caldo tradicional, disponibles en frascos bajo vacío con CO₂, parecen satisfactorias para el aislamiento de anaerobios (p. ej., medio de tioglicolato enriquecido, caldo tripticosa soja, caldo suplementado con peptona, caldo con infusión de cerebro y corazón, caldo *Brucella*, caldo Columbia y otros).^{197,250,251} Estos medios a menudo se expenden en volúmenes de 40-100 mL por frasco.

Entre los sistemas de hemocultivo más perfeccionados, los frascos disponibles en la actualidad que se utilizan en forma indistinta para el desarrollo de bacterias anaerobias obligadas y para el de bacterias anaerobias facultativas se enumeran más adelante.

- Bactec Plus Anaerobic/F® (resina, anaerobia; 3-10 mL de sangre)
- Bactec Lytic/10 Anaerobic F® (agente lítico; 3-10 mL de sangre)
- Bactec Anaerobic F® (anaerobio estándar; 3-7 mL de sangre)
- BacT/Alert FN® (FAN, anaerobio con carbón activado; más de 10 mL de sangre)
- BacT/Alert® (anaerobio estándar; más de 10 mL)
- ESP 80N® Caldo anaerobio (anaerobio estándar; más de 10 mL de sangre)
- ESP 40N® Caldo anaerobio (caldo anaerobio inoculado con sólo 5 mL de sangre)

La relación recomendada entre el volumen de caldo y de sangre para los frascos de hemocultivos tradicionales es 1:5 a 1:10.¹⁹⁷ Sin embargo, el volumen del medio fue disminuido en los frascos que contienen resina Bactec® para incluir un volumen mayor de sangre. Así, la inoculación de 10 mL en un frasco de Bactec Plus Anaerobic/F® genera un factor de dilución de sólo 1:3,5; las resinas en el medio neutralizan el problema de la actividad microbiana residual que puede estar presente en la sangre de los pacientes.¹³⁷

Aunque el agregado de polianetolsulfonato de sodio (SPS) al medio del hemocultivo mejora el aislamiento de la mayoría de las bacterias, incluidas las anaerobias, puede ser inhibitorio para otras, como las especies patógenas de *Neisseria*. *Peptostreptococcus anaerobius* es el único anaerobio conocido que se inhibe por SPS en el medio del hemocultivo. Es poco común en hemocultivos, así que los intentos especiales para

aislarlo usando medios especiales suplementados (p. ej., por agregado de gelatina al 1,2% para superar el efecto de SPS) pueden no ser muy eficaces. La incubación de hemocultivos en caldo debe incluir al menos un frasco para anaerobios incubado sin introducción de aire y un frasco para aerobios aireado transitoriamente (si se usa un sistema de caldo tradicional) por serie de hemocultivos. Los sistemas de hemocultivo más perfeccionados tienen lugares especiales de atmósferas anaerobias que contienen nitrógeno y dióxido de carbono sin oxígeno. Los frascos para aerobios y anaerobios deben ser agitados durante la incubación e incubados a 35 °C durante 5 a 7 días. Los frascos de caldo tradicional deben inspeccionarse en forma visual para detectar el desarrollo de microorganismos (p. ej., observar turbidez, producción de gas, hemólisis o colonias en el sedimento) dos veces por día durante las primeras 72 horas y luego una vez por día. Se deben realizar tinciones de Gram y subcultivos ciegos de los hemocultivos tradicionales en aerobiosis durante las primeras 6-12 horas de incubación, sin importar si se observa evidencia macroscópica de crecimiento.¹⁹⁷ Los subcultivos ciegos aerobios no se recomiendan en la actualidad para los hemocultivos tradicionales macroscópicamente negativos. Los cultivos negativos deben ser mantenidos por 5 a 7 días antes de ser informados como negativos.

Los frascos de hemocultivos para aerobios y anaerobios de los sistemas perfeccionados Bactec®, BacT/Alert® o ESP no requieren subcultivos a ciegas. Cuando los frascos de aerobios o anaerobios muestran evidencia macroscópica de desarrollo, deben ser subcultivados en agar chocolate (incubados en una estufa con CO₂ al 5-10%) y en agar sangre para anaerobios (incubado en anaerobiosis). También se recomienda el uso de medios selectivos en placa para subcultivo de anaerobios (como agar sangre para anaerobios con feniletanol o agar sangre kanamicina-vancomicina), junto con agar sangre no selectivo para anaerobios para ayudar al aislamiento de anaerobios en el cuadro de bacteriemia polimicrobiana. Los anaerobios se aíslan a veces en frascos para aerobios (tanto como en frascos para anaerobios). La falta de subcultivos para anaerobios a partir de frascos para aerobios macroscópicamente positivos es una práctica inaceptable. Con respecto al aislamiento de bacterias anaerobias, hasta ahora, el sistema de lisis/centrifugación (Isolator®; Wampole, Cranbury, NJ)²⁵⁰ y el sistema de hemocultivo Septichek® (Roche, Indianápolis, IN)²⁶⁴ (tratados en los caps. 1 y 2) se han desempeñado sólo en forma subóptima en comparación con los sistemas tradicionales de caldo Bactec® para hemocultivos anaerobios. Se recomienda que los laboratorios que usan cualquiera de estos sistemas también utilicen un sistema de cultivo en caldo tradicional o instrumentado para hemocultivos anaerobios.^{129,254}

Examen directo de los materiales clínicos

El análisis macroscópico de las muestras es valioso para establecer la presencia de anaerobios. Un olor fétido, el aspecto purulento de las muestras líquidas y el hallazgo de tejido necrótico y gas o gránulos de azufre son datos orientadores claves.

Varios autores han enfatizado la importancia del examen microscópico de las muestras clínicas y la información derivada que puede dar datos presuntivos inmediatos de la presencia de anaerobios.^{125,166} En los portaobjetos preparados para la tinción de Gram, la fijación con metanol es mucho mejor que la fijación por calor tradicional. Deben observarse las características celulares y el fondo del frotis, y en la reacción de Gram, la forma, el tamaño y la disposición de las bacterias, y debe

registrarse el número relativo de microorganismos presentes. Se debe reparar en la presencia de esporas, su forma y posición en la célula bacteriana, y otras características morfológicas distintivas, como ramificaciones, filamentos con corpúsculos esféricos, extremos aguzados y formas granulares. Aunque la tinción de Gram es satisfactoria para determinar las características celulares, las tinciones de Wright y de Giemsa a veces pueden revelar información valiosa adicional. Las tinciones de naranja de acridina son las más útiles para detectar bacterias en hemocultivos, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, líquido articular y exudados.¹⁴² La morfología de varios anaerobios en frotis examinados con el microscopio se ilustran en las microfotografías incluidas en las láminas en color 16-1, 16-2 y 16-3 y en las láminas en color del capítulo 1.

La presencia de numerosas células epiteliales pavimentosas sin células inflamatorias en heridas de la piel y en muestras respiratorias y urogenitales a menudo indica que el material se ha recolectado de modo superficial, es de mala calidad y que probablemente producirá mezclas de microorganismos insignificantes de la flora normal o bien microorganismos contaminantes. Vale la pena limitar la extensión de las identificaciones cuando los exámenes directos con el microscopio revelan muestras de baja calidad. Por supuesto que los médicos deben ser notificados de manera oportuna sobre los resultados de los exámenes directos y el problema de la calidad de la muestra antes de descartar las placas del cultivo primario. Los microbiólogos deben trabajar estrechamente con los médicos para tratar de mejorar la calidad y la importancia clínica de las muestras procesadas y de los resultados informados.

Las pruebas inmunológicas para la detección directa de antígenos anaerobios han tenido aplicaciones muy limitadas. Los productos de anticuerpos fluorescentes para detectar *Clostridium chauvoei*, *C. novyi*, *C. septicum* y *C. sordellii* están disponibles para uso en medicina veterinaria (VMRD®, Pullman, WA; www.vmr.com). Los anticuerpos fluorescentes en equipos comerciales creados hace algunos años para especies de *Bacteroides* en general no fueron útiles por la no especificidad y las reacciones cruzadas, con una sensibilidad insuficiente para ayudar a la identificación directa de microorganismos en muestras frescas.

Además de los cultivos (tratados más adelante en este capítulo), ciertos procedimientos pueden ayudar al diagnóstico de la enfermedad asociada con *Clostridium difficile* (EACD).^{7,8} Entre ellos se incluyen una prueba de aglutinación del látex, un inmunoanálisis para el antígeno común glutamato deshidrogenasa²³² y la cromatografía de gas-líquido para detectar ácido isocaproico.¹¹⁹ La especificidad ha sido un logro para estos métodos. Los procedimientos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) parecen promisorios,^{24,88,148} pero no están disponibles en el mercado. La prueba de neutralización de la citotoxina B de *Clostridium difficile*, basada en el uso de antiseros específicos para toxina B, acoplada con hallazgos clínicos se considera el procedimiento de referencia con el que se deben comparar otras pruebas diagnósticas para *C. difficile*. Sin embargo, existen problemas con el ensayo de citotoxina B, entre ellos su escasa sensibilidad, un tiempo de recambio de 1 a 4 días, los requerimientos para los medios de cultivos tisulares y la falta de estandarización entre los laboratorios.^{8,239}

Los procedimientos inmunológicos alternativos para la detección directa de toxina(s) de *C. difficile* en muestras fecales incluyen varios enzimo-inmunoanálisis (EIA) disponibles en el mercado, que han sido revisados en detalle en otra parte.⁸ Los productos comerciales recién evaluados en un estudio

importante realizado por Turgeon y cols.²³⁹ incluyen el Sistema Prima Tox A de *Clostridium difficile* (Trinity Biotech®, Bray, Irlanda) y Tox A II de *Clostridium difficile* VIDAS® (BioMérieux-Vitek, Hazelwood, MO), ambos detectan toxina A de *C. difficile*. El Premier Cytoclone A/B (Meridian Diagnostics®, Cincinnati, OH) y el *Clostridium difficile* Tox A/B (Techlab®, Blacksburg, VA) detectan ambas toxinas, A y B. Los paneles de ImmunoCard® *Clostridium difficile* (ICard; Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH) y Triage Micro® *C. difficile* (Triage; Biosite Diagnostics, San Diego, CA) detectan el antígeno común glutamato deshidrogenasa y la toxina A. Todos estos EIA y otros revisados por Allen y cols.⁸ son rápidos (p. ej., 1 a 3 horas de tiempo de recambio), fáciles de usar y se presentan como alternativas promisorias a los ensayos de neutralización de citotoxinas tradicionales. En teoría, la sensibilidad y la especificidad de las pruebas directas de toxina de *C. difficile* en heces se deben mejorar en gran medida usando EIA para detectar la enterotoxina (toxina A) o la citotoxina (toxina B), o ambas, producidas por el microorganismo en las heces. Aunque algunos de estos EIA parecen ser muy específicos (p. ej., 98% a > 99% de especificidad), la mayoría son menos sensibles que los ensayos de citotoxina B con los cuales han sido comparados (p. ej., 56-82% de sensibilidad).^{8,239}

En otro tiempo se creyó que se necesitaban ambas toxinas, A y B, para que se produzca EACD. Ahora es claro que la enfermedad grave puede ser causada por cepas de *C. difficile* toxina A-negativas/toxina B-positivas, que pueden perderse si el EIA se diseña para detectar sólo toxina A.^{1,120,149,260} Se están informando nuevos casos y brotes de EACD con toxina A-negativa/toxina B-positiva con una frecuencia creciente en todo el mundo. Así, además de, o en vez de un EIA para toxina A, se puede recomendar un ensayo de citotoxina para toxina B y/o cultivos para *C. difficile* toxigénico.⁷

Si bien se describió el uso de la cromatografía de gas-líquido para detectar anaerobios en exudados y líquidos corporales no ha sido muy popular.⁸⁶ El valor de este procedimiento está creciendo mediante el examen microscópico cuidadoso del material de la misma muestra. Una gran cantidad de ácido butírico en una muestra que contenga sólo bacilos gramnegativos delgados aguzados podría sugerir especies de *Fusobacterium*. Un pico principal de succinato y la presencia de sólo bacilos gramnegativos podrían indicar especies de *Bacteroides*, especies de *Prevotella* o especies de *Porphyromonas*. Un pico principal de propionato en un hemocultivo positivo que contiene bacilos grampositivos, no formadores de esporas, pleomorfos (llamados difteroides) podría ser muy compatible con especies de *Propionibacterium*. Sin embargo, la cromatografía de gas-líquido directa provee sólo claves presuntivas y debe interpretarse con cautela en infecciones polimicrobianas.

Selección y uso de los medios

Los medios usados para aislar anaerobios a partir de muestras deben incluir tipos no selectivos, selectivos y enriquecidos, como se ilustra en el cuadro 16-6. Otros medios también pueden ser incluidos o sustituidos por los listados en el cuadro 16-6. Por ejemplo, el medio de carne picada y glucosa se usa a menudo en vez del medio de tioglicolato enriquecido; el agar ácido nalidíxico colistín (CNA) puede usarse en lugar del agar feniletíl alcohol (PEA).

Tanto el agar sangre vancomicina-paromomicina como el agar sangre vancomicina-kanamicina pueden usarse para el aislamiento selectivo de anaerobios gramnegativos no formadores de esporas. El agar bilis esculina para *Bacteroides* se reco-

Cuadro 16-6 Medios representativos para el aislamiento primario de anaerobios en muestras clínicas^a

MEDIO	PRINCIPALES COMPONENTES Y COMENTARIOS	OBJETIVO
Agar sangre para anaerobios de los CDC (AnBAP)	Agar base tripticasa soja con 5% de sangre de carnero; suplementado con extracto de levadura, hemina, vitamina K ₁ y L-cistina para los anaerobios que requieren factores de crecimiento adicionales (p. ej., <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> y otros). Otros medios base, incluidos Brucella, infusión de cerebro y corazón, Schaedler y agar sangre Columbia son excelentes para el desarrollo de muchos anaerobios, pero la morfología y otras características tienden a diferir en esos medios	Medio en placa de agar sangre no selectivo para el aislamiento primario de todos los tipos de anaerobios encontrados en materiales clínicos (véanse texto y láminas en color de 16-1 a 16-4)
Agar sangre feniletialcohol para anaerobios (PEA)	Además de contener los mismos componentes que la formulación anterior de agar sangre para anaerobios de los CDC, este medio tiene feniletialcohol (2,5 g/L). PEA inhibe el desarrollo de especies de <i>Proteus</i> y el de muchas otras bacterias anaerobias facultativas gramnegativas, incluidas la mayoría de las <i>Enterobacteriaceae</i> . PEA es volátil. Las placas deben ser selladas en bolsas plásticas o de celofán y almacenadas a 4 °C. La tanda de placas que no inhiben el desarrollo de <i>Proteus</i> deben descartarse, sin importar la fecha de vencimiento	El medio PEA ayuda al aislamiento selectivo de anaerobios a partir de materiales infectados que contengan una mezcla de bacterias. Debe proveer un buen desarrollo para la mayoría de bacterias anaerobias obligadas gramnegativas y grampositivas. Las bacterias grampositivas anaerobias facultativas, como estafilococos, estreptococos, especies de <i>Bacillus</i> y las bacterias corineformes también crecen bien en este medio
Agar sangre kanamicina-vancomicina para anaerobio (KV)	Contiene la misma formulación que el agar sangre para anaerobios de los CDC como el antedicho AnBAP, pero además, contiene 100 mg/L de kanamicina y 7,5 mg/L de vancomicina. La kanamicina inhibe el desarrollo de muchos (pero no todos) bacilos gramnegativos anaerobios facultativos y la vancomicina inhibe el de las bacterias grampositivas en general (incluidas la mayoría de anaerobios y no anaerobios grampositivos). La vancomicina en esta concentración también puede inhibir el desarrollo de especies de <i>Porphyromonas</i> .	El medio KV es útil para el aislamiento selectivo de la mayoría de las especies de <i>Bacteroides</i> , de <i>Prevotella</i> , de <i>Fusobacterium</i> y de <i>Veillonella</i> de muestras clínicas que contienen bacterias aerobias y anaerobias mezcladas
Agar sangre lacada paromomicina-vancomicina para anaerobios (PV)	El medio PV lacado es similar a la formulación antes citada, excepto en que los 100 mg/L de paromomicina son sustituidos por kanamicina. También en PV, la sangre es lacada antes de agregarla (por congelación y descongelación de la sangre). El desempeño es similar a KV, excepto que la paromomicina puede inhibir algunos otros anaerobios facultativos resistentes a la kanamicina, como algunas cepas de <i>Klebsiella</i> . De modo similar al agar KV, el PV lacado puede inhibir el desarrollo de los microorganismos grampositivos en general. La sangre lacada puede ayudar al reconocimiento temprano de <i>Prevotella</i> pigmentada	PV lacado es un medio excelente para el aislamiento primario de microorganismos pertenecientes al grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , especies de <i>Prevotella</i> pigmentada y no pigmentada, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>F. mortiferum</i> , <i>Veillonella</i> y otros anaerobios obligados no formadores de esporas gramnegativos. No es necesario el uso de KV y PV; es razonable seleccionar uno de ellos, según las preferencias del microbiólogo
Agar fructosa cicloserina-cefoxitina (CCFA)	Base peptona proteosa o tripticasa soja que contiene fructosa e indicador rojo neutro. Además, se agregan cicloserina (500 mg/L) y cefoxitina (16 mg/L) para inhibir la flora intestinal. <i>C. difficile</i> , a 48 horas de incubación, forma colonias rizoides amarillentas de 4 mm o más grandes que tienen estructuras internas cristalinas birrefringentes ("opalescencia jaspeada"). Las colonias de <i>C. difficile</i> muestran una fluorescencia verde amarillenta bajo luz de longitud de onda UV (su olor recuerda al estiércol de caballo). <i>C. difficile</i> es negativo para las actividades de lipasa y lecitinas	CCFA se utiliza para el aislamiento selectivo de <i>C. difficile</i> en muestras de heces u otros materiales intestinales. Sin embargo, el desarrollo en CCFA no es específico sólo para <i>C. difficile</i> ; por lo tanto, se requiere la identificación de un cultivo puro (es común encontrar colonias que se desarrollan en medios para <i>Enterobacteriaceae</i> no deseados, especies de <i>Bacillus</i> , estafilococos y otros clostridios)
Medio de tioglicolato enriquecido (THIO)	THIO es un medio líquido enriquecido preparado por suplementación del medio de tioglicolato fórmula BBL-0135C (sin indicador) con hemina y vitamina K ₁	Éste es un caldo no inhibitorio que es útil en especial para el aislamiento primario de actinomicetos. THIO también es un excelente suplemento para medios sólidos en placa para el aislamiento de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Debe proveer un buen desarrollo para todos los anaerobios encontrados en materiales clínicos.

^a Todos los medios en este cuadro están disponibles preparados por varios fabricantes (véase el texto). Todos excepto CCFA fueron descritos originalmente por Dowell, Lombard y cols. en un manual de los CDC.⁵⁶ Para más información acerca de CCFA, se recomiendan las publicaciones de George et al.,⁷⁷ Bartley y Dowell²² y Marler et al.¹⁶⁷

mienda en el manual *Wadsworth Anaerobic Bacteriology* para la selección e identificación presuntiva del grupo *Bacteroides fragilis*¹²⁵ y también se ha encontrado útil como un medio selectivo para *Bilophila wadsworthia*.¹⁶ Los resultados obtenidos con formulaciones de medios en placa, como Schaedler, Columbia, Brucella u otros pueden no ser enteramente comparables con las características de desarrollo y morfología de anaerobios observadas en las formulaciones de medios en base a agar sangre de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (véanse láminas en color 16-1 a 16-4).

El agar sangre anaerobio usado en los CDC y en la Indiana University se recomienda como un medio no selectivo. Contiene 5% de sangre de carnero o conejo desfibrinada agregada al agar tripticasa soja (Becton Dickinson Microbiology Systems®; BDMS, Cockeysville, MD), adicionado con L-cistina, extracto de levadura (Difco, Detroit, MI), vitamina K₂ y hemina.⁵⁶ La fórmula se encuentra en el recuadro 16-4.

Se dispone de placas con este medio fabricadas por Becton Dickinson Microbiology Systems y Remel (Lenexa, KS). Las placas comerciales de agar sangre para anaerobios pueden ser almacenadas en el refrigerador en bolsas de celofán por al menos 6 semanas.

Antes de usarlos, las placas se mantienen 4 a 6 horas en una jarra anaerobia o en una cámara de anaerobiosis (*glove-box*) en una atmósfera de 85% de N₂, 10% de H₂ y 5% de CO₂. Un beneficio adicional del agar sangre para anaerobios de los CDC descrito con anterioridad es que la adición de L-cistina en el medio permite el desarrollo de ciertas bacterias que requieren aminoácidos que contienen azufre, como *Fusobacterium necrophorum* y estreptococos con requerimientos nutricionales especiales dependientes del azufre que han sido aislados en pacientes con endocarditis.⁹ En este medio también crecen muy bien los anaerobios estrictos *Clostridium novyi* tipo B y *Clostridium haemolyticum*.

El agar sangre con feniletanol se prepara mediante la suplementación del agar sangre para anaerobios descrito antes con 0,25% de feniletanol. De modo similar, el agar sangre vancomicina-kanamicina o el agar sangre vancomicina-paromomicina se preparan por el agregado de 100 µg de kanamicina o paromomicina y 7,5 µg de vancomicina por mililitro de medio de agar sangre.

El medio de tioglicolato enriquecido (BBL-135C con suplemento de hemina y vitamina K₁) se recomienda como reemplazo del medio en placa.⁵⁶ Este medio es útil en particular para cultivar especies de *Actinomyces* de crecimiento lento. El caldo con glucosa y carne picada, una buena alternativa para enri-

quecer el medio de tioglicolato, es útil para el aislamiento de especies de *Clostridium* por la técnica de selección de esporas y para cultivos anaerobios en general.

Otros medios selectivos con fines especiales para el aislamiento primario de anaerobios en la flora normal se describen en detalle en el *Manual Wadsworth*.¹²⁵ Además, Smith y Moore describieron los medios selectivos y una técnica de enriquecimiento en frío para ayudar al aislamiento de especies de *Mobiluncus* en muestras vaginales.²²⁰ Eley y cols. informaron un medio diferencial y selectivo para el aislamiento de *Bacteroides ureolyticus*.⁵⁹ Lee y cols. desarrollaron un nuevo medio selectivo para *Bacteroides gracilis*.¹⁴⁷ Malnick y cols. formularon un nuevo medio selectivo para el aislamiento de especies de *Anaerobiospirillum* de heces.¹⁶⁴ Se han desarrollado medios selectivos adicionales con fines especiales y procedimientos para el aislamiento y la cuantificación de *Clostridium difficile*, *C. perfringens* y *C. botulinum* de heces (y/o de muestras de alimentos).^{7,22,125}

Sistemas anaerobios para el cultivo de bacterias anaerobias

Según se determinó por estudios comparativos, el uso apropiado de los siguientes sistemas es satisfactorio para el cultivo de bacterias anaerobias asociadas con enfermedades humanas:^{130,201} jarras de evacuación-reemplazo; jarras anaerobias con generadores de gas desechables; técnicas para cámaras anaerobias; medios esterilizados en forma aerobia prerreducidos (PRAS) para la siembra en un tubo con capa extendida por rodamiento (*roll-streak*). Deben seguirse los principios generales enumerados en el recuadro 16-5 para asegurar resultados óptimos.

Técnicas de jarras anaerobias

Las jarras suelen usarse para el cultivo anaerobio de bacterias en medios en placa primarios o en placas de subcultivos. La jarra GasPak® (Becton Dickinson), ilustrada en la figura 16-2, se ha usado durante mucho tiempo en laboratorios clínicos de los Estados Unidos.

La jarra anaerobia Oxoid® (fig. 16-3) consta de una tapa de metal, válvulas Schrader y un manómetro. Al igual que la jarra GasPak, la jarra Oxoid puede usarse como jarra de evacuación-reemplazo o con un generador de gas. Otras fuentes comerciales de jarras anaerobias son Almoore® (Ardy Diagnostics, Santa María, CA), Key® (Scientific Products, Rockville, MD), Mitsubishi Gas Chemical America® (Nueva York, NY) y EM Science® (Darmstadt, Alemania).

Recuadro 16-4 Agar sangre para anaerobios de los CDC

INGREDIENTES	CANTIDADES
Agar tripticasa soja (BDMS)	15 g
Fitona (BDMS)	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	20 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
Hemina	5 mg
Vitamina K ₁ (3-fitilmenadiona)	10 mg
L-cistina	400 mg
Agua desmineralizada	1 L
Sangre (de carnero o conejo) desfibrinada	50 mL

Recuadro 16-5 Principios para el aislamiento óptimo de anaerobios

1. Recolección y transporte adecuados de las muestras clínicas.
2. Procesamiento de las muestras con la mínima exposición al oxígeno atmosférico.
3. Uso de medios frescos o prerreducidos.
4. Uso apropiado de un sistema anaerobio, con la inclusión de un catalizador activo que permita la eliminación del oxígeno (de sistema jarra o cámara de anaerobiosis).



Figura 16-2 Sistema anaerobio GasPak® (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD): la jarra contiene placas inoculadas, tubos de caldo, un envase generador de dióxido de carbono e hidrógeno, una tira con indicador azul de metileno y un catalizador en la tapa.

El principio básico de las jarras que requieren catalizador (p. ej., GasPak) es la eliminación del oxígeno de la cámara mediante la reacción con el hidrógeno agregado al sistema en presencia del catalizador. El oxígeno se reduce a agua como sigue:



La técnica más antigua de la jarra Brewer usaba un catalizador de paladio en la tapa de la jarra (una jarra McIntosh-Fildes modificada), que requería ser calentado con una corriente eléctrica para estar activo por completo. La jarra GasPak usa un catalizador "frío", compuesto por partículas de aluminio recubiertas de paladio, que no necesitan calentamiento. El catalizador frío es más conveniente y no tiene peligro de explosión. El catalizador de paladio frío puede inactivarse en la jarra por la producción de sulfuro de hidrógeno u otros productos metabólicos volátiles de las bacterias. Se recomienda reemplazar las partículas de catalizador con partículas nuevas o reacondicionadas cada vez que se use la jarra. Las partículas pueden ser reacondicionadas o restituidas a su actividad completa calentándolas en un horno de calor seco de 160 °C a 170 °C durante 2 horas. Después del calentamiento, las partículas se almacenan a temperatura ambiente en un contenedor seco y limpio o en un desecador hasta el momento de su uso.

Las condiciones anaerobias pueden ser producidas en sistemas de jarras con un generador de dióxido de carbono-hidrógeno (GasPak, Oxoid) o por el procedimiento de evacuación y reemplazo. En este procedimiento el aire en la jarra es eliminado y reemplazado con una mezcla de 85% de N₂, 10% de H₂ y 5% de CO₂; es más económico que los generadores de gas y permite que las condiciones anaerobias se establezcan más

rápidamente. Se puede usar algún contenedor hermético, incluida una jarra GasPak con una tapa de ventilación, una jarra Brewer, una jarra Oxoid o incluso una olla de presión modificada.

Whaley y Gorman describieron un dispositivo económico para vaciar y llenar de gas las jarras y otros sistemas.²⁵⁸ Estos dispositivos pueden usarse con un aspirador casero, con lo que se elimina la necesidad de una bomba de aspiración cuando se utiliza el procedimiento de evacuación/reemplazo. Se evacua el aire de la jarra por extracción mediante una presión negativa de -50 a -60 cm de mercurio. El procedimiento se repite tres veces. Luego la jarra se llena con N₂ después de las dos primeras evacuaciones y el reemplazo final se hace con la mezcla gaseosa compuesta por 85% de N₂, 10% de H₂ y 5% de CO₂.

El Anoxomat® (Mart Microbiology, Lichtenvoorde, Países Bajos) es un sistema de evacuación/reemplazo automatizado. Aunque es similar en principio al procedimiento descrito antes, los estudios han mostrado un desarrollo un poco mayor usando Axonomat® en lugar de otros sistemas anaerobios con los que se comparó.^{32,215}

Los generadores de CO₂ e H₂ del GasPak se usan abriendo el sobre con generador y colocándolo en la jarra. Se agregan cerca de 10 mL de agua para permitir la generación de hidrógeno y dióxido de carbono y la tapa se sella de manera apretada. Si la



Figura 16-3 La jarra anaerobia Oxoid® (Oxoid USA, Columbia, MD) contiene una jarra de policarbonato de 3,5 L cerrada por una tapa metálica pesada y una abrazadera de metal. El centro de la tapa tiene dos válvulas de Schrader y un manómetro de presión máxima o mínima, con dos válvulas para facilitar la técnica de evacuación/reemplazo (E/R). En la tapa también hay una válvula de seguridad para impedir la presión gaseosa extra causada por el uso incorrecto de la técnica de E/R. Un saché con un catalizador que actúa a baja temperatura se abre hacia la superficie interior de la tapa. En lugar de la técnica E/R, la jarra se puede usar con el equipo comercial generador Oxoid® del fabricante.

tapa no está caliente al tacto dentro de los 40 minutos después de sellada o si la condensación no aparece en la superficie interna del vidrio dentro de los 25 minutos, se debe abrir la jarra, descartar el sobre con generador y reemplazarlo por un generador nuevo. Las dos causas más comunes de fracaso del sistema son un cierre defectuoso de la tapa que permita el escape de gas o que se inactiven las partículas de catalizador.

Las condiciones anaerobias siempre deben controlarse cuando se usa cualquiera de las dos técnicas de jarra mediante la inclusión de un indicador de oxidorreducción. Para este objetivo se venden tiras de azul de metileno (BD Microbiology Systems). De otra forma se puede colocar en la jarra un tubo de ensayo de 13 mm × 100 mm que contenga unos pocos mililitros de una mezcla de glucosa- NaCHO_3 -azul de metileno.⁴³ El azul de metileno es azul cuando está oxidado y se decolora cuando está reducido. El color cambia a casi +11,0 mV. Así, si se alcanzan las condiciones anaerobias, la solución del indicador azul de metileno se tornará incolora y permanecerá de esa forma si no existen escapes que permitan el ingreso de oxígeno adicional en el sistema. Si la solución se vuelve azul después de haber sido incolora, indica que no se han mantenido las condiciones y que los resultados del cultivo pueden no ser válidos.

El sistema GasPak 100 Anaerobic® ha sido analizado con respecto a las concentraciones de O_2 y CO_2 , tiempo de aparición de agua condensada, temperatura del catalizador y Eh de los medios en placas preparados en el comercio a distintos intervalos a 20 hasta 25 °C.²⁰⁸ La concentración de O_2 fue 0,2-0,6% dentro de los 60 minutos después de la activación del generador y menor de 0,2% a los 100 minutos. La concentración de CO_2 fue 4,6-6,2% a los 60 minutos después de la activación. El Eh de los tres medios probados varió de +60 mV (agar Columbia con 5% de sangre de carnero) hasta +500 mV (agar Schaedler con 5% de sangre de carnero) a tiempo cero. El Eh se extendió desde -30 mV hasta -229 mV después de 60 minutos y osciló de -115 mV hasta -300 mV después de 100 minutos. Esto indica la reducción rápida del medio; aun así el indicador azul de metileno no se decolora en menos de 6 horas a 25 °C. A 35 °C, el azul de metileno por lo general se reduce en casi 5 horas, y es probable que el medio se reduzca más rápidamente

a 35 °C que a 25 °C. Sin embargo, si el aire ambiente entra en el sistema, el indicador cambia hacia el azul en pocos minutos.

Hace relativamente poco se han introducido sistemas anaerobios por generación de gas que no requieren catalizador ni adición de agua para su activación. El AnaeroPack® (Mitsubishi Gas Chemical America, Nueva York, NY), por ejemplo, absorbe oxígeno y genera dióxido de carbono, pero no genera hidrógeno. Parece una excelente alternativa al GasPak® y a otros sistemas de incubación anaerobia establecidos.⁴⁹ Otro tipo de sistema comercial libre de catalizador hace uso de limaduras de hierro en un saché al que se le agrega agua (Anerocult®, Merck, Darmstadt, Alemania), produciendo una atmósfera rica en dióxido de carbono, libre de oxígeno.

Uso de la cámara de anaerobiosis

Una cámara de anaerobiosis ("caja con guantes" o *glove-box*) es un sistema anaerobio completo que permite al microbiólogo procesar muestras y realizar la mayoría de las técnicas bacteriológicas para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias sin exposición al aire. Pueden estar construidas de varios materiales, como acero, plástico acrílico o fibra de vidrio (fig. 16-4). La cámara anaerobia de plástico vinílico flexible desarrollada en la University of Michigan ha gozado de una amplia popularidad¹¹ y se dispone de una modificación de este diseño en varios tamaños de la marca Coy Manufacturing® (Ann Arbor, MI). Una cámara anaerobia de diseño diferente se muestra en la figura 16-5. Entre otros fabricantes de cámaras anaerobias se encuentran Forma Scientific (Marietta, OH) y Toucan Technologies (Cincinnati, OH). Las cámaras rígidas son comercializadas por Anaerobe Systems® (Bactron Anaerobe Chamber; Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR) y por Russkinn Technology y Don Whitley (Shipley, West Yorkshire, Inglaterra).

Una cámara de anaerobiosis, si está construida de forma apropiada, es económica para operar porque permite el uso del medio en placas convencionales y el costo de los gases para la operación del sistema es mínimo. Una vez armada, el principal gasto es la mezcla gaseosa de 85% de nitrógeno-10% de hidrógeno-5% de dióxido de carbono para reemplazar el aire en el

Figura 16-4 Cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, MI). Los materiales se pasan hacia dentro y afuera de la cámara plástica, flexible, grande mediante una entrada automática. Las condiciones anaerobias se mantienen por recirculación constante de la atmósfera dentro de la cámara plástica (85% de N_2 , 10% de H_2 , y 5% de CO_2) mediante un catalizador de paladio. Los cultivos se incuban dentro de una estufa separada en el interior de la cámara de anaerobiosis o por mantenimiento de la caja íntegra a 35 °C mediante el uso de cajas calentadas con catalizador.





Figura 16-5 Cámara de anaerobiosis Forma Modelo 1024® (Forma Scientific, Marietta, OH). Este sistema tiene una boca de entrada automática. Durante la operación diaria de rutina, el aire atmosférico burbujea a través de una solución buffer HEPES-glucosa-azul de metileno, que ayuda al control de las pérdidas de O_2 o para determinar si el catalizador no funciona en forma adecuada.

orificio de entrada cuando los materiales se pasan hacia el interior de la cámara de anaerobiosis.

Sistema de capa extendida por rodamiento (*roll-streak*)

El sistema de capa extendida por rodamiento (*roll-streak*) creado por WEC Moore y asociados del Laboratorio VPI Anaerobe¹⁰⁷ es una modificación de la técnica en tubo desarrollada por Hungate y asociados para el cultivo de bacterias anaerobias del rumen de vacas y otros animales herbívoros. El equipamiento para el sistema de cultivo anaerobio VIP (incluidos los tubos Hungate) es comercializado por Belco Glass (Vineland, NJ).

El sistema de capa extendida por rodamiento usa medios PRAS preparados en tubos con tapones de goma. Después de la esterilización en autoclave los tubos de medios de agar se enfrían en una máquina rodante, lo que produce el depósito de una capa delgada del medio solidificado en las superficies internas de los tubos. Los tubos y los medios líquidos PRAS requieren la adición de un agente reductor, como clorhidrato de L-cisteína, que se agrega justo antes de la esterilización en autoclave para ayudar a mantener un bajo potencial de oxidoreducción dentro del sistema. Todas las inoculaciones y subcultivos de los medios líquidos y sólidos PRAS se realizan bajo una corriente de dióxido de carbono libre de oxígeno, que reduce la exposición al aire y ayuda a mantener un potencial de oxidoreducción en el medio antes y después del desarrollo de los anaerobios obligados. La técnica de Hungate requiere menos equipamiento que la técnica de la capa extendida por rodamiento para inocular el medio líquido. La inoculación en los medios PRAS de los tubos Hungate se realiza con una jeringa y aguja a través del tapón de goma de la tapa de rosca.

Bolsas plásticas anaerobias

Se dispone del sistema de bolsa plástica anaerobia fabricado por BD Microbiology Systems (Sparks, MD). Un segundo sistema, el AnaeroPouch®, es comercializado por Mitsubishi (Nueva York, NY). Un tercer sistema de bolsa anaerobia, Anaerocult P®, se fabrica en Alemania (Merck, Darmstadt,

Alemania). Otros sistemas de bolsas son el Anaerogen® (Oxoid) y el Anabag® (Hardy Diagnostics).

La bolsa anaerobia (BD) consiste en una bolsa de plástico transparente (de varios tamaños con capacidad para una a tres placas de Petri de 100 mm de diámetro), un generador de gas H_2 - CO_2 que produce una atmósfera cuando se le agrega agua (análogo al generador usado en una jarra GasPak), partículas de catalizador de paladio frío y resazurina como indicador. La bolsa se sella con calor luego de la activación del generador para permitir el mantenimiento de las condiciones anaerobias de acuerdo con el mismo principio descrito para el sistema de la jarra GasPak.

Por otro lado, el AnaeroPouch y el Anaerocult logran las condiciones anaerobias en forma diferente, sin catalizador, para eliminar el oxígeno de la atmósfera y generar CO_2 . El oxígeno se elimina desde dentro de la bolsa Anaerocult sellada por combinación con el polvo del hierro para producir óxidos de hierro. Estos sistemas de bolsas anaerobias parecen ser alternativas prácticas a las jarras o a los sistemas de cámaras de anaerobiosis para la incubación de anaerobios cuando sólo se incuban unas pocas placas.

Uso de la jarra contenedora anaerobia

Una modificación del procedimiento de la jarra contenedora de Martin es un aditamento económico y conveniente ante los sistemas de la jarra y la cámara anaerobias que permite la siembra en placa primaria, la inspección de los cultivos y el subcultivo de colonias en la mesada del laboratorio con una mínima exposición de las bacterias anaerobias al oxígeno atmosférico.^{9,168}

El armado de la jarra contenedora se ilustra en la figura 16-6 y su uso se describe brevemente en el recuadro 16-6.

En el sistema de jarra contenedora se puede usar N_2 grado comercial, que es muy económico. Se abre la pequeña válvula de aguja pequeña del tubo múltiple (fig. 16-7) y se coloca el regulador del tanque de gas en 0,28 kg/cm² durante 20 a 30 segundos para purgar en forma rápida la jarra de aire. Luego se baja el regulador de presión hasta casi 0,04 a 0,07 kg/cm² y se ajusta el flujo de cada jarra en 50 a 100 mL/min, usando la vál-



Figura 16-6 Equipo de cultivo en bolsa anaerobia (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD). Este equipo de cultivo incluye una placa de agar sangre para anaerobios de los CDC contenida en una bolsa impermeable al oxígeno. El sistema tiene su propio equipo generador de gas y catalizador en frío.

vula de la aguja pequeña en el tubo múltiple. Esto es equivalente a una relación de flujo de una a dos burbujas por segundo cuando el tubo de goma de la jarra apenas se sumerge en el agua de un vaso. Como alternativa, en las jarras contenedoras se puede usar CO_2 pasado a través de un tubo de catalizador de cobre caliente (horno Sargent) en lugar de N_2 .

Incubación de los cultivos

En la mayoría de los casos, 35°C a 37°C es la temperatura más adecuada para el aislamiento primario de bacterias anaerobias a partir de muestras clínicas. Las placas inoculadas en la mesada de laboratorio y colocadas en jarras de anaerobiosis deben incubarse al menos durante 48 horas y reincubarse por otros 2-4 días para permitir que los microorganismos de crecimiento lento formen colonias; algunos anaerobios, como ciertas especies de *Actinomyces* y *Eubacterium*, crecen más lentamente y las colonias no pueden detectarse si las jarras se abren antes. Además, si la jarra se abre muy pronto, algunos de los microorganismos de crecimiento lento pueden morir debido a

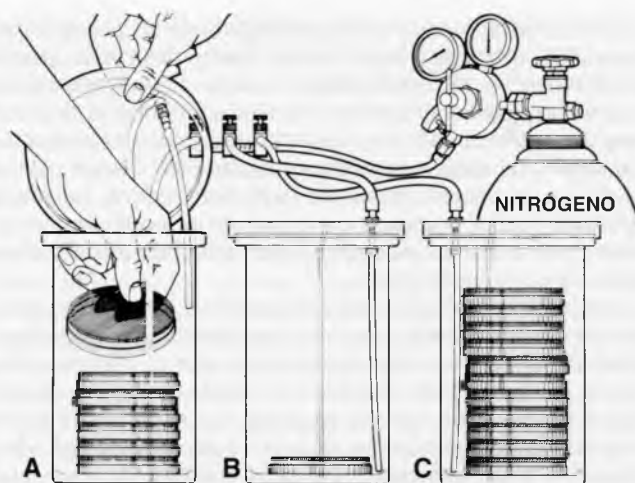


Figura 16-7 Esquema del sistema de jarra de anaerobiosis. La velocidad de flujo de nitrógeno para cada jarra se regula por las válvulas agujas en el múltiple juego de tres válvulas (disponible donde se venden artículos para acuarios). Las jarras A, B y C contienen placas sin inocular, placas con colonias para ser subcultivadas y placas recién inoculadas, respectivamente.

la exposición al oxígeno. En situaciones de emergencia, se pueden incubar dos grupos de medios en placas en jarras diferentes: un grupo durante 18-24 horas y el otro durante 3 a 5 días. Este procedimiento permite el pronto aislamiento de anaerobios de crecimiento rápido en la jarra de 18-24 horas de incubación y el aislamiento tardío de los que se desarrollan en forma lenta en las jarras dejadas para la incubación demorada. Si se sospecha una mionecrosis causada por clostridios, las placas deben inspeccionarse tan rápido como 6 a 12 horas después de la inoculación.

Recuadro 16-6 Procedimiento de utilización de la jarra de anaerobiosis

1. Se usan tres jarras de anaerobiosis, la primera para colocar medios sin inocular, la segunda para placas en las que se desarrollan colonias subcultivadas y la tercera para recibir placas de medios recién inoculados.
2. Se pueden usar placas de agar comerciales o medios de agar recién preparados en el laboratorio. Se pueden mantener en refrigerador por más de 6 semanas si están embolsadas en celofán.
3. Las placas para ser usadas en un día dado se deben colocar primero en una cámara de anaerobiosis o en una jarra de anaerobiosis durante 4 a 15 horas antes de usar para reducir el medio.
4. A medida que se necesiten, los medios reducidos se colocan en la primera jarra de mantenimiento y se hace pasar en forma continua una corriente suave de N_2 .
5. Las placas con los medios reducidos se inoculan en superficie, de una por vez, en el aire ambiente e inmediatamente se colocan en la tercera jarra, que también se ha llenado con N_2 . La segunda jarra se usa para guardar algunas placas sacadas de la jarra GasPak que requieran subcultivos.
6. Después que la jarra que contiene las placas recién inoculadas se llenan, las placas se pueden transferir a un sistema anaerobio convencional, como una jarra GasPak o en una cámara de anaerobiosis para incubación a 35°C .

Debe evitarse la exposición prolongada de las placas recién inoculadas al aire ambiente. Ciertos anaerobios por lo general encontrados en muestras clínicas, como *Peptostreptococcus anaerobius*, pueden no crecer o mostrar un retraso prolongado en el desarrollo cuando las placas recién inoculadas se mantienen en el aire ambiente por lapsos de tan sólo 2 horas. Así, si no se usa un procedimiento de jarra contenedora, las placas inoculadas deben colocarse de inmediato en un sistema anaerobio (jarra o cámara de anaerobiosis) para permitir el cultivo eficaz de estos anaerobios.

Los medios de tioglicolato enriquecido y de carne picada y glucosa también deben inocularse con muestras clínicas incubadas en un sistema anaerobio para permitir el máximo aislamiento de anaerobios. También se pueden usar los medios PRAS en tubos con tapones de goma. No es necesario hervir los tubos de tioglicolato enriquecido o caldo de carne picada y glucosa si están preparados en tubos con tapa de rosca bien ajustados y con gas en una cámara después de la esterilización en autoclave. A pesar de que el desarrollo se observa a simple vista, los cultivos en caldo deben mantenerse un mínimo de 5 a 7 días antes de descartarlos como negativos.

Inspección de los subcultivos de colonias

Después de la incubación, las placas incubadas en atmósferas con 5-10% de CO_2 se deben examinar con lentes de aumento o, de preferencia, con un microscopio de disección. Si se usan jarras anaerobias, se debe usar un sistema de jarra contenedora en el momento de examinar las colonias y subcultivar para reducir la exposición al aire de los aislamientos sensibles al oxígeno. La cámara de anaerobiosis y los sistemas de bolsas (fig. 16-6) permiten la inspección de las colonias en ausencia de aire.

El uso de microscopio estereoscópico de disección durante el examen de las colonias es muy útil porque los anaerobios tienen colonias con características distintivas. El microscopio de disección también es una valiosa ayuda durante el subcultivo de colonias para obtener aislamientos puros.

Durante la inspección de las colonias se debe registrar cualquier acción en el medio, como la hemólisis del agar sangre o la decoloración del agar yema de huevo, así como el tamaño y las características distintivas de las colonias. Las características de las colonias de los anaerobios se ilustran en las láminas en

color 16-1, 16-2 y 16-3. Cuando se registran las características, se debe observar lo siguiente: el tiempo transcurrido del cultivo y el nombre del medio, el diámetro en milímetros de cada colonia además de su color, características de la superficie (brillantes, opacas), la densidad (mate, translúcida), la consistencia (cremosa, viscosa, membranosa, friable) y otras particularidades (véanse caps. 1 y 2).

Se deben examinar los frotis teñidos con Gram de las colonias de las placas incubadas en CO_2 y en anaerobiosis. No hay que presuponer sobre la base del tipo de colonia y de las características microscópicas solas que las colonias en las placas que han sido incubadas en un sistema anaerobio son anaerobios obligados. Aunque la morfología y las características de las colonias de ciertos anaerobios son distintivas, a menudo es imposible distinguir algunos anaerobios facultativos de los anaerobios obligados sin pruebas de aerotolerancia, incluso cuando las placas incubadas con CO_2 no muestran crecimiento.

Se debe determinar el número de tipos diferentes de colonias en las placas anaerobias y registrar una estimación semicuantitativa del número de cada tipo (escaso, moderado o abundante desarrollo). Con una aguja o una pipeta capilar de Pasteur, se transfiere cada colonia diferente a otra placa de agar sangre para anaerobios para obtener un cultivo puro y a una placa de agar sangre para aerobios para probar la aerotolerancia (descrita más adelante). Si las colonias están bien separadas en la placa de aislamiento primario, se deben inocular en un tubo de caldo enriquecido, como medio de tioglicolato enriquecido o de carne picada y glucosa, para proveer una fuente de inóculo para las pruebas diferenciales.

Después de la incubación, los subcultivos en medios de carne picada y glucosa y de tioglicolato enriquecido se tiñen con Gram. Si los microorganismos parecen estar en un cultivo puro, se pueden usar para inocular medios diferenciales apropiados para su identificación.

Se examinan los cultivos en carne picada y glucosa y en tioglicolato enriquecido que fueron inoculados con la muestra original junto con todas las placas de aislamiento primario. Si no existe desarrollo evidente en las placas anaerobias primarias o si las colonias aisladas no corresponden a los tipos morfológicos encontrados en los frotis directos teñidos con Gram de la muestra, cada medio de caldo debe ser subcultivado en dos placas de agar sangre anaerobio: una para incubación anaerobia y la otra incubada en una estufa con CO_2 al 5-10%. Como alternativa para el subcultivo puede utilizarse una placa con agar chocolate que se incuba en estufa con CO_2 al 5-10%. Estas pla-

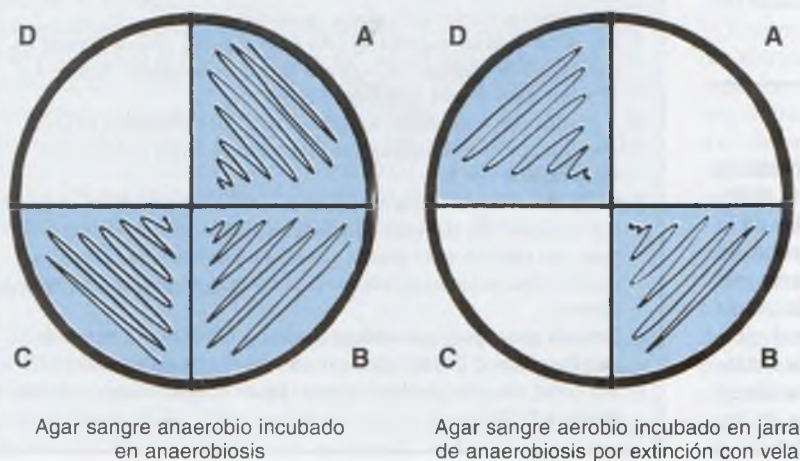


Figura 16-8 Técnica de placas en cuadrantes usadas para las pruebas de aerotolerancia de cuatro aislamientos anaerobios. La placa de la izquierda ha sido incubada en una jarra de anaerobiosis durante 18 a 24 horas, mientras que la placa de la derecha se incubó en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela. Los aislamientos A y C son anaerobios obligados. El aislamiento B es anaerobio facultativo. El aislamiento C es un microaerófilo o un anaerobio obligado y debe ser probado luego por su capacidad de crecimiento en aire ambiente y comparado con el medioambiente que contiene CO_2 aumentado. La jarra de anaerobiosis por extinción con vela no es adecuada para probar a *Campylobacter jejuni*; esta especie crece de manera óptima en 5-10% de CO_2 , 10% de CO_2 y 85% de N_2 .

de subcultivo deben examinarse más tarde como ya se describió.

Pruebas de aerotolerancia

Cada tipo de colonia de la placa de aislamiento anaerobio se subcultiva en una placa de agar sangre aerobia (5-10% de CO₂ o una jarra de anaerobiosis por extinción con vela) y anaerobia para una incubación de toda la noche.

Hemophilus influenzae, que se desarrolla en agar sangre anaerobio en anaerobiosis pero no en agar sangre ordinario en aerobiosis, puede ser confundido con un anaerobio. Esto se puede evitar mediante la inoculación en una placa de agar chocolate (en lugar de la placa agar sangre aerobia) e incubación en estufa con CO₂ al 5-10%. Puede ser conveniente inocular los cuadrantes o extensiones de la placa de agar chocolate para probar la aerotolerancia de cuatro a seis colonias en una placa de aislamiento primario (fig. 16-8). Sin embargo, sólo debe hacerse si las colonias están bien separadas o si se seleccionan de una placa pura. O bien, se deben sembrar en estría placas únicas con cada aislamiento para transferir un cultivo puro y evitar la contaminación.

Informes preliminares de los resultados

Se debe informar al médico de inmediato si se comprobó que los microorganismos son anaerobios obligados, junto con los resultados de la observación de un frotis teñido con Gram y de las características de las colonias. Sin embargo, no se justifica el informe de la presencia de un anaerobio obligado hasta que se hayan completado los estudios de aerotolerancia.

Lamentablemente, a menudo se requiere un período de 3 días o más para completar estos estudios. Los médicos deben conocer que ese tiempo prolongado no se puede evitar con algunos anaerobios de crecimiento lento (p. ej., algunas especies de *Actinomycetes* y *Propionibacterium*). Por fortuna, la morfología de las colonias de ciertas bacterias anaerobias a menudo es distintiva, de modo que los informes preliminares o presuntivos de esos aislamientos se pueden hacer antes de los estudios de aerotolerancia. Son ejemplos de ellas, *Clostridium perfringens*, miembros del grupo *Bacteroides fragilis*, del grupo *Prevotella* pigmentada y *Porphyromonas*, y otras.

Determinación de las características bioquímicas y de cultivo para la diferenciación de aislamientos anaerobios

Una vez confirmada la presencia de anaerobios por las pruebas de aerotolerancia y que se ha informado una descripción de las características morfológicas, la próxima prioridad es identificar el cultivo puro aislado del modo más rápido y exacto posible e informar los resultados al médico dentro de un tiempo apropiado. Aunque en la actualidad los taxonomistas reconocen más de varios cientos de especies de anaerobios, la tarea de identificar anaerobios para el microbiólogo clínico no es tan compleja como podría parecer porque sólo un pequeño número de especies participan en infecciones anaerobias con alguna frecuencia.^{69,125}

Identificación presuntiva

Casi todos los aislamientos clínicamente significativos son anaerobios obligados moderados o anaerobios aerotolerantes, y

con práctica no son difíciles de aislar e identificar. Los microorganismos del grupo *Bacteroides fragilis*, del grupo *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentado, *F. nucleatum* y los cocos anaerobios se aíslan con bastante frecuencia; no obstante, otros anaerobios menos comunes tienen un potencial patológico mayor. Por lo tanto, es importante estar familiarizado y ser capaz de reconocer a: *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *A. meyeri*, *Propionibacterium propionicum* y *Bifidobacterium dentium* (antes *B. eriksonii*), que pueden ser causa de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas graves; *Prevotella bivia* y *P. disiens*, por lo común resistentes a varias penicilinas y cefalosporinas; *Fusobacterium necrophorum* (que puede ser altamente virulento); *F. mortiferum* y *F. varium*, que varían en su sensibilidad a ciertas penicilinas, cefalosporinas y clindamicina; *C. septicum*, microorganismo asociado con frecuencia con carcinoma de colon o neoplasia hematopoyética cuando se aísla en la sangre de esos pacientes; los clostridios "histotóxicos", además de *C. perfringens*, que pueden causar gangrena gaseosa y varias infecciones de heridas; *C. difficile*, la causa principal de diarrea y colitis asociada con antibióticos, y *C. tetani* y *C. botulinum* debido a las enfermedades que provocan.^{7,10,69,125}

Los laboratorios de referencia suelen usar numerosas series de pruebas en la caracterización de aislamientos anaerobios mencionados para la identificación o confirmación, las cuales se enumeran en el recuadro 16-7. Además, se están reconociendo nuevas especies mediante métodos quimiotaxonómicos y estudios de genética molecular. Los datos derivados de la caracterización de cultivos con un gran número de pruebas han proporcionado bases de datos valiosas para recopilar cuadros de características diferenciales, como los publicados por los CDC, el Virginia Polytechnic Institute (VPI), la State University y los Wadsworth Anaerobe Laboratories.^{53,107,125,259} Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios diagnósticos no es práctico o factible desde el punto de vista económico usar un gran número de medios diferenciales y determinaciones bioquímicas para identificar aislamientos en muestras clínicas.

Por fortuna, ciertas características (recuadro 16-8) son muy útiles en la identificación de anaerobios. Estas características forman la base de una aproximación práctica para identificar aislamientos anaerobios que se encuentran con mayor frecuencia en el laboratorio clínico y de otras especies menos comunes o patógenos potenciales importantes, incluso raros.

Recuadro 16-7 Caracterización de bacterias anaerobias

Relación con el oxígeno
Morfología de las colonias
Reacción de tinción de Gram
Rasgos microscópicos
Movilidad
Desarrollo en medio líquido
Pruebas bioquímicas
Productos metabólicos (CGL)
Sensibilidad a los antibióticos
Pruebas serológicas
Toxicidad, neutralización de toxinas, patogenicidad en animales
Electroforesis en gel de poliácridamida de proteínas solubles
Ácidos grasos de cadena larga de la pared celular; menaquinonas

Recuadro 16-8 Algunas características principales de los anaerobios

Relación con el oxígeno
 Características de las colonias
 Pigmentos
 Hemólisis
 Hoyuelos en el medio
 Reacción con la tinción de Gram
 Morfología
 Esporas
 Movilidad
 Flagelos
 Otras
 Desarrollo en caldo tioglicolato, catalasa, lecitinasa, lipasa; reacciones en medio lácteo; producción de indol; hidrólisis de almidón, esculina y gelatina; reducción de nitrato; fermentación de hidratos de carbono claves (p. ej., glucosa, manitol, lactosa, ramnosa); desarrollo en presencia de bilis, penicilina, rifampicina y kanamicina; inhibición por polianetol-sulfonato de sodio; producción de toxinas; productos metabólicos.

Usos de medios de agar diferenciales

Se pueden obtener varias características valiosas para la identificación de bacterias anaerobias a partir de cultivos puros en agar sangre para anaerobios de los CDC y en medio de tioglicolato enriquecido. Estas características, señaladas en el cuadro 16-7, proveen datos importantes para la diferenciación de anaerobios en general. Se determinan características adicionales mediante el uso de discos diferenciales, que se agregan a placas de agar sangre para anaerobios recién inoculadas. Los discos de 2-U de penicilina, de 1 000 µg de kanamicina y de 15 µg de rifampicina (Becton Dickinson Microbiology Systems) ayudan a la diferenciación de bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios. Los discos de colistina y vancomicina también pueden ser muy útiles.¹²⁵ La prueba con disco de polianetolsulfonato de sodio es una forma práctica de separar *Peptostreptococcus anaerobius* de otros cocos anaerobios. Para demostrar la reducción de nitrato conviene incluir una prueba con disco de nitrato durante el procesamiento de las bacterias anaerobias (en general).

PLACAS PRESUMPTO

Dowell, Lombard y cols. crearon tres tipos de placas en cuadrantes (Presumpto 1, 2 y 3) que contienen 12 medios agar diferenciales en un sistema que permite la determinación de 20 características diferentes (cuadro 16-7) de aislamientos anaerobios a un mínimo costo.⁵⁵ La información derivada de usar las placas de tres cuadrantes, junto con las otras características obtenidas de agar sangre anaerobio y medio de tioglicolato enriquecido más el análisis del producto metabólico usando GLC permite la identificación definitiva de muchas bacterias anaerobias significativas que se encuentran en el laboratorio. Además, las placas en cuadrantes, en especial las placas Presumpto 1 y 2, se pueden usar para suplementar a varios de los equipos comerciales, tanto como a los sistemas de identificación en caldo tradicional, con pruebas o características importantes de los que esos sistemas sin agar carecen.

El medio básico en el sistema de placa en cuadrantes Presumpto es el medio de Lombard-Dowell (LD). El agar LD es un medio especialmente diseñado para el desarrollo de una amplia variedad de anaerobios, incluidos algunos con requerimientos nutricionales especiales. Es notable que el caldo LD (el mismo medio sin agar o con sólo una pequeña cantidad) es el caldo de inoculación para el Minitek® (Becton Dickinson Microbiology Systems) y los sistemas API® (BioMérieux-Vitek).⁸

La placa Presumpto 1 es una placa de Petri de cuatro cuadrantes que contiene los siguientes medios: agar LD, agar esculina LD, agar yema de huevo LD y agar bilis LD. Dowell y Lombard de los CDC publicaron por primera vez los detalles del uso de esa placa.⁵⁴ En principio, se usó para la identificación presuntiva de *Bacteroides* y *Fusobacterium* (sin placas de Presumpto 2 y 3), pero desde entonces ha sido útil para la identificación de otras bacterias anaerobias.

La placa Presumpto 2 contiene agar glucosa LD, agar DNA LD agar leche LD y agar almidón LD. Es útil para la caracterización de clostridios, bacilos grampositivos y gramnegativos no formadores de esporas anaerobios y cocos anaerobios. Como la placa Presumpto 1, puede usarse junto con micrométodos envasados comerciales que carecen de las pruebas que contiene o junto con pruebas convencionales en tubo.

La placa Presumpto 3 contiene agar gelatina LD, agar manitol LD agar lactosa LD y agar ramnosa LD. El uso del agar gelatina LD y de hidratos de carbono en esta placa en cuadrantes ya se describió.⁵⁵

Las características que se pueden determinar con cada una de las tres placas en cuadrantes se muestran en el cuadro 16-7. Las formulaciones y la preparación de los medios y reactivos usados en el sistema de placa en cuadrantes se brindan en detalle en otra parte.^{8,259}

Inoculación y lectura de las placas Presumpto. Los procedimientos para la inoculación de los medios en las placas en cuadrantes Presumpto, el método de incubación y el uso de pruebas con discos de antibióticos e inhibitorias diferenciales se reseñan en el recuadro 16-9.

Observación e interpretación de los resultados. Después de la incubación, se examinan las placas en cuadrantes y las placas de agar sangre para anaerobios que contienen los discos antibióticos y los discos de diferenciación de SPS y nitrato.

Placa en cuadrantes Presumpto 1 (lámina en color 16-5)

Agar LD Se observa y registra el grado de desarrollo en agar LD (escaso, moderado, abundante). Se prueba para indol con el agregado de dos gotas de reactivo para-dimetilaminocinamaldehído a un disco de papel sobre el medio. Se observa el desarrollo de color azul o verde-azulado en el disco dentro de los 30 segundos, que es una reacción positiva para indol. El desarrollo de otro color (rosa, rojo, violeta) o sin color es una reacción negativa para indol. Un color lavanda a violeta indica una reacción positiva para los derivados del indol.

Agar yema de huevo LD La formación de una zona de precipitado insoluble en el medio alrededor de las colonias bacterianas indica una reacción positiva para la producción de lecitinasa. Esto se observa mejor con luz transmitida.

La presencia de un brillo iridiscente (una capa nacarada sobre la superficie de las colonias y en el medio alrededor de las colonias bacterianas, más evidente con luz reflejada) indica producción de lipasa. Si la reacción es dudosa, se agregan unas gotas de agua y se busca una película que flota en la parte superior del agua.

La decoloración del medio en la vecindad del desarrollo bacteriano indica proteólisis, como lo demuestran ciertos clostridios proteolíticos.

Cuadro 16-7 Medios y características de los cultivos que pueden determinarse con la utilización de medios diferenciales de agar para la identificación de anaerobios

MEDIOS	CARACTERÍSTICAS
Agar sangre	Relación con el O ₂ ^a , características de la colonia, hemólisis, pigmento, fluorescencia con luz UV (lámpara de Wood), hoyuelos en el agar, morfología celular, reacción de tinción de Gram, esporas, movilidad (montaje húmedo); inhibición por penicilina, rifampicina y kanamicina
Medio de tioglicolato enriquecido	Aparición del desarrollo, rapidez de crecimiento, producción de gas, olor, morfología celular
Placa Presumpto 1	
Agar LD	Indol, desarrollo en medio LD, catalasa ^b
Agar esculina LD	Hidrólisis de esculina, H ₂ S, catalasa
Agar yema de huevo LD	Lipasa, lecitinasa, proteólisis
Agar bilis LD	Desarrollo en presencia de 20% de bilis (2% de bilis bovina), precipitado insoluble debajo y alrededor del desarrollo
Placa Presumpto 2	
Agar glucosa LD	Fermentación de glucosa; estimulación del desarrollo por hidratos de carbono fermentables
Agar almidón LD	Hidrólisis de almidón
Agar leche LD	Hidrólisis de caseína
Agar DNA LD	Actividad de desoxirribonucleasa
Placa Presumpto 3	
Agar manitol LD	Fermentación de manitol
Agar lactosa LD	Fermentación de lactosa
Agar ramnosa LD	Fermentación de ramnosa
Gelatina LD	Hidrólisis de gelatina

^a Por comparación de desarrollos en placa anaerobia con agar sangre (o agar chocolate) incubada en incubador de 5-10% de CO₂ (o jarra de anaerobiosis por extinción con vela) o en aire ambiente.

^b La prueba de catalasa puede realizarse por agregado de peróxido de hidrógeno al 3% al desarrollo en agar LD, pero las reacciones de cultivos catalasa positiva son más vigorosas en agar esculina LD.

Agar esculina LD Una prueba positiva para la hidrólisis de esculina se indica por la aparición de un tono marrón rojizo a marrón oscuro en el agar esculina alrededor de las colonias bacterianas después de exponer al aire el cultivo en placa en cuadrantes durante al menos 15 minutos. El examen del cuadrante de agar esculina bajo la lámpara de Wood puede dar información adicional de la hidrólisis de esculina. El agar esculina exhibe un brillo azul fluorescente bajo la luz ultravioleta que no aparece después que la esculina se hidroliza.

El ennegrecimiento de las colonias bacterianas en el agar esculina indica la producción de H₂S. El ennegrecimiento se disipa muy rápido después de la exposición al aire. Por lo tanto, el desarrollo bacteriano debe observarse por el ennegrecimiento en condiciones anaerobias (cámara anaerobia) o inmediatamente después de abrir las jarras anaerobias al aire. Para probar la degradación de peróxido de hidrógeno como una indicación de catalasa se exponen las placas al aire al menos 30 minutos y luego se inunda el cuadrante de agar esculina con unas gotas de H₂O₂ al 3% fresca. Un burbujeo persistente después de la adición de H₂O₂ es una reacción positiva para catalasa. En algunos casos, el burbujeo rápido puede no ser evidente hasta después de 30 segundos a un minuto.

Agar bilis LD Se compara el grado de crecimiento bacteriano en el agar bilis LD con el del agar LD común y se registra como I (crecimiento menor que en el control agar LD) o E (crecimiento igual o mayor que en el agar control LD). Usando luz transmitida, se observa la presencia o la falta de un precipitado blanco insoluble debajo o alrededor del desarrollo bacte-

riano. En caso de duda, se inspecciona bajo un estereomicroscopio usando luz transmitida.

Placa en cuadrantes Presumpto 2 (lámina en color 16-5)

Agar glucosa LD La fermentación de la glucosa se indica por la producción de ácido o por un color amarillo donde hay desarrollo en el medio de cultivo y alrededor de esas zonas. Un color azul alrededor del desarrollo es una reacción negativa. Algunas bacterias reducen el indicador, por lo tanto, a veces es necesario irrigar el cuadrante con reactivo azul de bromotimol diluido para observar si se ha producido ácido.

La estimulación con glucosa puede observarse por comparación de la cantidad de desarrollo en agar glucosa LD con el del agar LD común.

Agar almidón LD Para detectar la hidrólisis de almidón, se irriga el cuadrante con solución yodada de Gram; la decoloración alrededor del desarrollo indica una reacción positiva. Un color pardusco indica almidón no hidrolizado y una reacción negativa.

Agar leche LD Una zona clara alrededor del desarrollo en el cuadrante indica la hidrólisis de la caseína (la digestión de las proteínas de la leche) y una reacción positiva. Si la caseína no se hidroliza, el medio permanece turbio (reacción negativa).

Agar DNA LD Una zona rosada a rojiza alrededor del desarrollo en el cuadrante indica una reacción positiva para la degradación de DNA (actividad de desoxirribonucleasa). Si el medio permanece azul alrededor del desarrollo, el DNA no se degradó y la reacción es negativa.

Recuadro 16-9 Uso de las placas en cuadrante Presumpto

1. Preparar el inóculo a partir del desarrollo de un cultivo puro del aislamiento anaerobio. Usar una suspensión celular turbida (McFarland 3) en caldo LD preparada a partir de colonias aisladas o un subcultivo en medio de tioglicolato enriquecido de 24 a 48 horas de una colonia aislada (también se puede usar un subcultivo en caldo de glucosa y carne picada de 24 a 48 horas).
2. Inocular las placas cuadrantes como sigue:
 - a. Saturar un hisopo estéril (para cada placa cuadrante que se inocule) en la suspensión celular o en el cultivo en caldo.
 - b. Sembrar en estría la porción media de cada cuadrante con el hisopo que contiene bacterias.
3. Colocar un disco de papel de 1.25 cm de diámetro, blanco y estéril sobre el agar LD cerca de la periferia externa del cuadrante. Este disco se usa para la prueba de indol después de la incubación de las placas.

Además de montar las placas Presumpto, también:

1. Inocular la superficie de una placa de agar sangre con un hisopo estéril embebido en la suspensión celular o en el cultivo en caldo.
2. Colocar los discos de antibióticos (penicilina, 2 U; rifampicina, 15 µg; kanamicina, 1 000 µg) en el agar sangre con pinzas estériles. Espaciar los discos de tal modo que la superposición de las zonas de inhibición no sea un problema.
3. Colocar los discos de polianetosulfonato de sodio (SPS) y nitrato en una segunda placa de agar sangre anaerobio, si se usan además de los discos de antibióticos. Para preparar el disco de SPS, pipetear 20 µL de SPS al 5% (disponible en Anaerobe Systems [Morgan Hill, CA] y Remel [Lenexa, KS] en discos blancos estériles de 0.635 cm [Becton Dickinson [BD], Sparks, MD] y secar. Los discos de SPS son estables a temperatura ambiente por 6 meses. Para preparar el disco de nitrato, disolver 30 g de KNO₃ y 0.1 g de molibdato de sodio (Na₂MoO₄ · 2H₂O) en 100 mL de agua destilada y esterilizada por filtración usando un filtro de membrana de 0.45 µm. Luego, agregar 20 µL de este reactivo a los discos blancos, estériles de 0.635 cm y secar a temperatura ambiente por lo menos 72 horas.

Placa en cuadrantes Presumpto 3

Agar gelatina LD Para detectar la hidrólisis de la gelatina, se irriga el cuadrante con reactivo cloruro de mercurio acidificado. Este reactivo se une a la gelatina no hidrolizada. Una zona de aclaramiento completo alrededor del desarrollo en el cuadrante indica que la gelatina ha sido hidrolizada y se registra como una prueba positiva.

Agar manitol LD, agar lactosa LD y agar ramnosa LD Se examinan e interpretan estos cuadrantes como se describió para el agar glucosa LD.

PLACAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS**Inhibición del desarrollo en agar sangre para anaerobios con antibióticos**

PRUEBAS con discos. Las zonas de inhibición alrededor de los discos de antibióticos se observan y registran como sigue:

Penicilina, disco de 2 U: sensible (S) si la zona de inhibición de desarrollo es ≥ 12 mm de diámetro; resistente (R) si la zona es < 12 mm.

Rifampicina, disco de 15 µg: sensible (S) si la zona de inhibición del desarrollo es ≥ 15 mm; resistente (R) si la zona es < 12 mm.

Kanamicina, disco de 1 000 g: sensible (S) si la zona de inhibición de desarrollo es ≥ 12 mm; resistente (R) si la zona es < 12 mm.

Uso de pruebas de SPS y de nitrato con discos

Prueba de SPS con disco Medir la zona de inhibición alrededor del disco de 6 mm. Una zona de inhibición ≥ 12 mm se registra como sensible.

Prueba de nitrato con disco Prueba para la reducción de nitrato mediante el agregado de una gota de reactivo A para nitrato (ácido sulfanílico) y una gota de reactivo B (ácido 1,6 de Cleave) al disco.¹²⁵ Un color rosa o rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el disco estaba incoloro después del agregado de los reactivos A y B, se esparce polvo de cinc en el disco para confirmar una reacción negativa. El desarrollo de color rojo después que se agrega el polvo de cinc confirma que el nitrato todavía está presente en el disco (reacción negativa).

En los cuadros 16-14 al 16-16 y 16-18 al 16-25 se resumen las características para la identificación de varias especies de anaerobios usando pruebas diferenciales en los medios de agar.

El agar sangre para anaerobios, las placas en cuadrantes Presumpto y otros medios descritos en esta sección se venden en el comercio (Remel) o se pueden preparar en el laboratorio. Los detalles para la preparación de los medios y los reactivos se pueden encontrar en ediciones previas de este libro y en otros sitios.^{53,55,56} Si se preparan en el propio laboratorio, existe la opción de poner un único medio diferencial en una placa y no usar placas de Petri de cuatro cuadrantes. Esta modalidad de mayor flexibilidad es apropiada para los microbiólogos que prefieran usar otras combinaciones de pruebas.

Caracterización de anaerobios usando pruebas bioquímicas convencionales en tubos grandes

No es posible tratar en este libro todos los procedimientos disponibles para la caracterización bioquímica de anaerobios. Los procedimientos convencionales de cultivo en tubo se describen en forma breve más adelante. Para más detalles, recurrir a los manuales de laboratorio en bacteriología de anaerobios.^{53,107,125,179}

En lugar de utilizar las pruebas diferenciales descritas para medios con agar, se puede usar el medio PRAS en tubos grandes para determinar las características bioquímicas. Éstos se inoculan mediante un diafragma de goma en tubos Hungate o mediante un dispositivo especial que emite de gas de acuerdo con los procedimientos del manual VPI.^{107,179} Los medios PRAS se pueden preparar en el laboratorio u obtener en el comercio. Si se los usa para la caracterización de los aislamientos, también se pueden usar las tablas de Holdeman, Moore y cols.^{107,109,112,179}

El pH de las pruebas de fermentación de hidratos de carbono basadas en medios con peptona y extracto de levadura (PY), prerreducido antes de esterilizar (PRAS) se determina directamente usando un pHímetro; se inserta un electrodo de combinación delgado y largo en cada tubo de cultivo. De acuerdo con el manual VIP, el pH 5,5 a 6 se registra como ácido débil, mientras que el pH por debajo de 5,5 es ácido fuerte. Nótese que el pH de los cultivos de hidratos de carbono en PY se deben comparar con los cultivos en medios PY comunes (sin hidratos de carbono). El pH del caldo PY oscila entre 6,2 y 6,4 cuando se inocula bajo CO₂. También, algunos microorganismos pueden producir ácido de peptonas en un medio PY común.¹⁰⁷ Además, el pH de PRAS PY- arabinosa, PY-ribosa o PY-xilosa sin inocular puede ser tan bajo como 5,9 después que el medio se ha

mantenido durante 1 a 2 días bajo una atmósfera de CO_2 ; así, el pH de los cultivos en esos medios no se interpreta como ácido a menos que sea inferior a 5.7.¹⁰⁷

Los medios convencionales de Dowell y cols. se comercializan en tubos con tapa de rosca de 15 mm $\times$ 90 mm (Remel, Lenexa, KS). Los detalles de la preparación y el uso de esos medios se publican en otra parte.⁵³ Cuando se usan estos medios diferenciales, deben consultarse los cuadros de identificación de Dowell y Hawkins.⁵³ Con cualquiera de los sistemas convencionales VPI o CDC, las reacciones bioquímicas pueden leerse después de la incubación de toda la noche en ciertos cultivos anaerobios de crecimiento rápido (p. ej., algunos *B. fragilis* y clostridios) o se observa un buen desarrollo más tarde (por lo general 48 horas y más para especies de crecimiento lento). Las pruebas de fermentación se leen mediante el uso de azul de bromotimol (amarillo a pH 6) o usando un pHímetro (un pH por debajo de 6 se considera ácido). En nuestra experiencia, algunos de los llamados sistemas de micrométodos rápidos no son en verdad más rápidos.

Procedimientos alternativos

El uso de medios convencionales en tubos de Hungate o en otros tubos grandes insume un tiempo considerable y los medios son costosos para preparar o comprar. Como alternativa a los medios y métodos convencionales, así como al sistema de placas en cuadrantes Presumpto, se describieron diversos procedimientos para la caracterización e identificación de aislamientos y esquemas de identificación alternativos.^{8,10} Algunos contienen volúmenes más pequeños de medios en envases que pueden ser manipulados con razonable velocidad en la mesada del laboratorio. Una de las propuestas alternativas más populares ha sido la prueba para ciertas características claves de aislamientos en medios de agar diferencial (p. ej., agar esculina bilis Bacteroides; Anaerobe Systems®, Morgan Hill, CA). Otra ha sido el uso de discos impregnados con antibióticos o varios otros químicos para probar la inhibición del desarrollo o su estimulación. Otra propuesta excelente ha sido el uso de pequeños comprimidos (p. ej., WEE-TABS®, Key Scientific Products, Round Rock, TX) para determinar ciertas reacciones enzimáticas de sustrato cromogénico. WEE-TABS se han usado como pruebas suplementarias o solas para diferenciar varios anaerobios. Los detalles de su uso y las descripciones de varias otras pruebas para la caracterización de aislamientos anaerobios se encuentran en el Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual¹²⁵ y han sido revisados en otros sitios.⁸

LA PRUEBA DE NAGLER Y LA PRUEBA DE CAMP PARA *C. PERFRINGENS*

Históricamente, la prueba de Nagler se usó para la identificación presuntiva de *Clostridium perfringens*. Aunque la mayoría de los clostridios aislados en el laboratorio clínico que dan una reacción positiva son *C. perfringens*, la antitoxina usada en la prueba no es específica. *C. bifermentans*, *C. sordellii*, y *C. barattii* (antes *C. parapaperfringens*) también se sabe que son Nagler positivos y son necesarias otras pruebas para separarlos. Durante los últimos años, la popularidad de la prueba de Nagler ha disminuido porque no se dispone de la antitoxina. Los detalles que describen la prueba de Nagler se hallan en las ediciones previas de este libro.

Una alternativa a la prueba de Nagler, usada en algunos laboratorios, es la llamada prueba de CAMP inversa.³⁵ Para realizar la prueba, se inocula una placa de agar sangre para anaerobios con una sola estría de un microorganismo desconocido

que posiblemente sea una cepa de *C. perfringens*. Luego, se efectúa una única estría a un ángulo de 90° a la distancia de 1-2 mm de la primera estría, usando un inóculo de un *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B. Una punta de flecha de hemólisis sinérgica, con el extremo de la flecha señalando desde *Streptococcus* hacia *C. perfringens*, es una prueba positiva. Pueden ocurrir resultados falsos negativos y falsos positivos. Se necesitan más datos sobre la especificidad de esta prueba para los aislamientos clínicos de *C. perfringens*. Según nuestro punto de vista, la mayoría de los laboratorios experimentados en bacteriología de anaerobios y en las características de los cultivos y morfológicas adicionales de *C. perfringens* pueden recobrar el uso de la prueba de Nagler y la prueba de CAMP inversa, por lo que quizá sea innecesaria una prueba "nueva".

Microsistemas comerciales

Dos equipos de micrométodos comerciales creados en la década de 1970 se continúan usando a través de los años en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de anaerobios: el API-20A® (BioMérieux-Vitek) y el Minitek® (Becton Dickinson Microbiology Systems). La construcción y el uso de estos sistemas han sido repasados por Stargel y cols.²³³

Equipos comerciales para la identificación de anaerobios después de 4 horas de incubación aerobia

Varios fabricantes han comercializado equipos completos que prueban enzimas preformadas. La mayoría de estos sistemas utilizan una serie de sustratos cromogénicos para probar en forma rápida diversas aminopeptidasas y glucosidasas. Cada sistema requiere la preparación de una suspensión celular cargada a partir de la superficie de un cultivo puro en placa. Estos equipos permiten a los microbiólogos determinar múltiples características enzimáticas de un cultivo puro aislado después de 4 horas o menos de incubación aerobia. Excepto el equipo API-ZYM®,^{8,233} todos estos sistemas comerciales proveen códigos numéricos, bases de datos en el ordenador y cuadros de identificación para ayudar a la identificación una vez que ha sido caracterizado usando el sistema. La lista de productos incluye los siguientes:

API An-Ident® (BioMérieux-Vitek)
API-ZYM® (BioMérieux-Vitek)
Crystal Anaerobe Identification System® (Becton Dickinson Microbiology Systems)
MicroScan Rapid Anaerobe Panel® (Dade Behring Microscan)
RapID-ANA II® (Remel)
Rapid ID 32A® (BioMérieux-Vitek)
Vitek Anaerobe Identification (ANI) Card® (BioMérieux-Vitek)

Estos equipos son populares entre los microbiólogos y se están utilizando ampliamente en los laboratorios de microbiología diagnóstica. En general, son de uso simple e insumen menos tiempo que los métodos convencionales. En otro sitio se describe con detalles cada uno de los sistemas, incluidos los sustratos, los procedimientos de uso, la interpretación de los resultados de la prueba y un tratamiento de las evaluaciones del desempeño.⁸ Todos los microsistemas comerciales mencionados con anterioridad deben suplementarse con otras pruebas para la identificación definitiva y exacta de los grupos de anaerobios.

erobios seleccionados (p. ej., el uso de agar yema de huevo y cromatografía gas-líquido [CGL] para clostridios además de para *C. perfringens*; el uso tanto de medios sólidos como líquidos para desarrollos rápidos, varias pruebas suplementarias adicionales, más CGL para los bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas; el uso de 20% de bilis, esculina, de pruebas de hidratos de carbono seleccionados para especies de *Bacteroides*, el uso de CGL y reacciones en yema de huevo para la diferenciación de especies de *Fusobacterium*, así como pruebas adicionales para otros anaerobios). Por supuesto, es necesario observar e interpretar correctamente las reacciones de Gram, la morfología de las colonias y los resultados de las pruebas de aerotolerancia y usar siempre cultivos puros cuando se intenta diferenciar anaerobios con sistemas comerciales.

Cuando un equipo produce una identificación de una especie rara, no se la debe aceptar sin repetir las pruebas con procedimientos alternativos o quizá con la confirmación de un laboratorio de referencia cuando sea clínicamente importante.

Determinación de productos metabólicos por cromatografía de gas-líquido

El análisis de los productos metabólicos por CGL es un procedimiento práctico y poco costoso que es realizado con facilidad por el personal de laboratorio.²¹⁷ Los productos metabólicos, liberados en el medio de cultivo en caldo durante el desarrollo anaerobio, son características claves de las bacterias anaerobias y de muchas bacterias anaerobias facultativas. Junto con la determinación de la relación con el oxígeno, la mayoría de los anaerobios se pueden identificar hasta la categoría de género sobre la base de la presencia o ausencia de esporas, la reacción de Gram, la morfología celular y los resultados del análisis por CGL. Esta técnica mejora la velocidad y precisión de la identificación y disminuye los costos a causa del ahorro de tiempo.¹⁸⁰

Como ya se mencionó, los anaerobios facultativos usan respiración aerobia en su producción de energía a partir de la glucosa, pero además pueden obtener energía por reacciones de fermentación. Los anaerobios obligados son similares a los anaerobios facultativos con respecto a las vías usadas para las reacciones de fermentación. Como los aerobios obligados y los anaerobios facultativos, algunos anaerobios obligados también usan respiración anaerobia como manera de obtener energía; sin embargo, los anaerobios obligados no usan respiración aerobia y para ellos el oxígeno no es el aceptor final de electrones. Muchos anaerobios obligados aislados en el laboratorio clínico, cuando se desarrollan en un medio líquido que contiene glucosa, producen piruvato de la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof y por otras vías. Sin embargo, muchas bacterias anaerobias obtienen energía en medios deficientes en glucosa u otros hidratos de carbono mediante la fermentación de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, *Clostridium sporogenes* fermenta alanina y glicina (reacción de Strickland) para producir acetato, CO_2 y NH_3 .¹⁶³ Existe una relación directa entre las cantidades de peptona y glucosa en un medio y la producción de ácidos grasos de cadena corta ramificados (p. ej., isobutirato, isovalerato, isocaproato) por ciertos anaerobios.¹⁵² Los productos de fermentación producidos por las bacterias a partir de compuestos orgánicos, como el ácido pirúvico, varían entre los diferentes géneros y especies de anaerobios obligados y entre microorganismos anaerobios facultativos

Los patrones de fermentación de microorganismos se han usado durante mucho tiempo para determinar grupos taxonómicos.¹⁶³ Ciertas levaduras, como *Saccharomyces*, llevan a cabo una fermentación alcohólica en la que los productos metabólicos se componen principalmente de etanol y CO_2 . Las bacterias ácido lácticas, que incluyen el género *Lactobacillus* y *Streptococcus*, son bien conocidas por sus patrones característicos de fermentación en los que acumulan ácido láctico como producto principal. *Escherichia coli* y ciertas *Enterobacteriaceae* se caracterizan por su fermentación ácida mixta en la cual se forman en cantidades significativas acetato, lactato y succinato junto con etanol, CO_2 e H_2 . Otros miembros de *Enterobacteriaceae*, por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*, producen un tipo de fermentación con producción de butanodiol; los principales son 2,3-butanodiol, etanol, CO_2 e H_2 , y se forman pequeñas cantidades de acetato, lactato y succinato. La presencia de este tipo de fermentación se determina en forma ordinaria en el laboratorio clínico por la prueba de Voges-Proskauer (véase cap. 6). La fermentación ácido butírica, en la cual se producen ácido butírico, cantidades limitadas de ácido acético, CO_2 e H_2 , se lleva a cabo por ciertas especies de *Clostridium* (p. ej., *C. butyricum*). El patrón de fermentación ácido butírico permite establecer uno de los casi 14 grupos o subdivisiones de este género sólo sobre la base del análisis del producto metabólico. Por otro lado, muchos de los otros géneros de anaerobios han sido definidos de acuerdo con un patrón metabólico único (p. ej., ácido propiónico para el género *Propionibacterium*).

Las definiciones de géneros basadas en vías metabólicas tienen un sustento científico porque las vías metabólicas representan rasgos conservados o genéticamente estables de las bacterias.¹⁸⁰ Los esquemas de los cuadros 16-8 y 16-9 ilustran el valor del análisis de los productos metabólicos ácidos para la diferenciación de los géneros de bacterias anaerobias.

Aunque el análisis por CGL no es obligatorio para la identificación presuntiva del grupo *B. fragilis*, de los bacilos gram-negativos anaerobios pigmentados, *F. nucleatum*, *C. perfringens*, *P. anaerobius* y unos pocos anaerobios aislados por lo común de muestras clínicas, es necesario para la identificación definitiva de muchas especies de *Bacteroides* y *Fusobacterium*, para la mayoría de *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y para casi todos los cocos anaerobios.²¹⁷

Los cromatógrafos gaseosos son relativamente económicos, seguros, simples de operar y confiables y los fabrican varias compañías de instrumentos científicos. El equipamiento y los procedimientos para la determinación de productos metabólicos por CGL se describen con más detalle en otra parte.^{53,107,125,152,180,217}

Identificación de ácidos grasos volátiles

La CGL se usa para identificar ácidos grasos de cadena corta que son solubles en éter. Los ácidos detectados con este procedimiento son: el acético, propiónico, isobutírico, butírico isovalérico, valérico, isocaproico y caproico. El procedimiento se explica en el recuadro 16-10.

Los ácidos grasos volátiles se pueden identificar por comparación de los tiempos de elusión de los productos en los extractos con los de una mezcla de ácidos conocidos (estándar de ácidos grasos volátiles) cromatografiados en las mismas condiciones el mismo día. En la figura 16-9 se muestra un trazado estándar representativo y en las figuras 16-10, 16-11 y 16-12 se presentan ejemplos de los resultados de la CGL en tres aislamientos anaerobios.

Cuadro 16-8 Diferenciación de géneros de bacilos bacilo(s) gramnegativos anaerobios no formadores de esporas

I. No móviles o móviles con flagelos peritricosos; bacilos cocobacilares o rectos	
A. Propuesta por Shah y Collins ²¹⁰ para incluir sólo las especies resistentes a bilis y altamente fermentativas que se asemejan a <i>B. fragilis</i> (<i>B. distasonis</i> , <i>B. caccae</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. merdae</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. eggerthii</i> y <i>B. stercoris</i>). Otras especies continúan en este género; son necesarios más estudios para determinar su ubicación correcta (p. ej., <i>B. capillosus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. cellulosolvens</i> , <i>B. pectinophilus</i> , <i>B. tectum</i> , <i>B. ureolyticus</i> y otras) Hasta que no se traslade el último grupo este género continuará siendo heterogéneo	<i>Bacteroides</i> ^a
B. A menudo colonias pigmentadas de negro; produce ácidos acético, butírico y succínico, con cantidades menores de ácidos propiónico, isobutírico e isovalérico. Todas son asacarolíticas e indol positivas	<i>Porphyromonas</i> ^b
C. Colonias no pigmentadas a pigmentadas; inhibidas por bilis y sacarolíticas; por lo general microflora bucal	<i>Prevotella</i> ^a
D. Resistente a bilis, catalasa positiva, reduce nitrato y ureasa positiva	<i>Bilophila</i> ^b
E. Encontradas como parte de la flora humana normal, pero rara vez en muestras clínicas seleccionadas en forma adecuada	<i>Alistipes</i> ^c <i>Anaerostipes</i> ^c <i>Anaerorhabdus</i> ^c <i>Catonella</i> ^c <i>Cetobacterium</i> ^c <i>Dialister</i> ^c <i>Faecalibacter</i> ^c <i>Fibrobacter</i> ^c <i>Johnsonella</i> <i>Megamonas</i> ^c <i>Mitsuokella</i> ^c <i>Oxalobacter</i> ^c <i>Sneathia</i> ^c <i>Sutterella</i> ^c <i>Tannerella</i> ^c <i>Tissierella</i> ^c
F. Encontradas en animales y en la naturaleza	<i>Dichelobacter</i> ^c <i>Pectinatus</i> ^c <i>Rikenella</i> ^c <i>Roseburia</i> ^c <i>Ruminobacter</i> ^c <i>Sealdella</i> ^c
G. Produce grandes cantidades de ácido butírico (pero muy poco o nada de isoácido) como el principal producto metabólico; no se produce ácido succínico; todas las especies son no móviles	<i>Fusobacterium</i> ^a
H. El ácido láctico es el principal y único producto; <i>L. buccalis</i> , la única especie, es no móvil	<i>Leptotrichia</i> ^b
I. El ácido acético es el principal producto metabólico ácido; produce sulfuro de hidrógeno; reduce sulfato; <i>D. pigra</i> , la única especie, es no móvil	<i>Desulfomonas</i> ^c
II. Móvil, no producido por flagelos peritricosos	
A. Bacilos curvados con flagelos polares lofotricosos o monotricosos o flagelos subsolares; el ácido butírico es el principal producto de fermentación	<i>Butyrivibrio</i> ^b
B. Los ácidos acético y succínico son los principales productos de fermentación	<i>Succinimonas</i> ^c
1. Bacilos rectos cortos a cocobacilos; un flagelo polar único; encontrado sólo en rumen bovino	<i>Succinivibrio</i> ^b
2. Bacilos helicoidales, curvos con extremos aguzados; movilidad tipo vibración por un único flagelo polar	<i>Anaerobiospirillum</i> ^b
3. Bacilos curvos, helicoidales; penachos bipolares de flagelos	<i>Campylobacter</i> ^d
C. Bacilos espiralados y curvos, oxidasa positivos, microaerófilos, con ausencia de una envoltura flagelar; no fermenta hidratos de carbono; produce ácido succínico de ácido fumárico	<i>Wolinella</i> ^c
D. Los ácidos acético y propiónico son los principales productos de fermentación	<i>Selenomonas</i> ^b
1. Penachos de flagelos en lado cóncavo de las células en forma de media luna	<i>Anaerovibrio</i> ^b
2. Flagelo polar único; bacilos curvos; lipolíticos	<i>Centipeda</i> ^c
3. Los flagelos están insertados en una espiral a lo largo de la célula	

^a Comúnmente encontrados en muestras clínicas.^b Rara vez encontrados en muestras clínicas.^c Flora normal humana o de otros animales.^d *Campylobacter gracilis* es oxidasa negativo y carece de flagelos, pero tiene "movilidad espasmódica"; difiere de otras especies de *Campylobacter* por estos dos aspectos.^e *Wolinella succinogenes*, aislada en el rumen bovino y ahora la única especie que permanece en el género *Wolinella*, es difícil de diferenciar de las especies del género *Campylobacter*.Modificado de Koneman et al.¹³⁵ y otras referencias citadas en el texto.

Cuadro 16-9 Diferenciación de géneros de bacilos grampositivos anaerobios encontrados en muestras humanas

I. No producen endoesporas bacterianas	
A. Producen grandes cantidades de ácidos acético y propiónico; a menudo producen catalasa; bacilos de forma regular o irregular, células cocoides; en ocasiones ramificados	<i>Propionibacterium</i>
B. Producen ácidos acético y láctico (relación >1:1); bacilos muy irregulares con formas bífidas y ramificaciones	<i>Bifidobacterium</i>
C. Producen ácido láctico como único producto	
1. Bacilos cortos a largos delgados; es común la formación de cadenas; no es común la presencia de bacilos irregulares; a menudo se desarrollan en agar jugo de tomate a pH $\leq 4,5$ (véase cap. 14)	<i>Lactobacillus</i>
2. Cocos alargados pequeños que se encuentran solos, en pares, o en cadenas cortas	<i>Atopobium</i>
D. Producen grandes cantidades de ácidos láctico y succínico y moderadas de ácido acético; predominan las formas de bacilos irregulares; formas filamentosas con ramificaciones	<i>Actinomyces</i>
E. Producen mezclas de ácidos acético, butírico, láctico y a veces fórmico; bacilos difteroides pleomorfos; sacarolíticos	<i>Eubacterium</i>
F. Producen cantidades pequeñas de ácido acético y vestigios de ácidos láctico y succínico; asacarolíticos	<i>Eggerthella</i>
G. Producen grandes cantidades de ácido acético y pequeñas cantidades de succinato; bacilos rectos a curvos con algunas ramificaciones ("similar a <i>Actinomyces</i> ")	<i>Actinobaculum</i>
H. Acetato y butirato son los únicos productos metabólicos; sacarolíticos; bacilos delgados	<i>Anaerotruncus</i>
I. Produce una cantidad importante de lactato con cantidades variables de ácidos fórmico, acético y succínico; cocobacilos, pleomorfos, bacilos difteroides cortos; anaerobios facultativos; sacarolíticos; <i>A. pyogenes</i> es β -hemolítico en agar sangre de carnero	<i>Arcanobacterium</i>
J. Producen cantidades moderadas de acetato y lactato y vestigios de ácido succínico; sacarolíticos; bacilos cortos	<i>Bulleidia</i>
K. Se encuentran como bacilos cortos en cadenas entrecruzadas; sacarolíticos; producen ácidos acético, butírico, isobutírico y láctico	<i>Catenibacterium</i>
L. Bacilos muy cortos; asacarolíticos; no se detectan productos metabólicos en caldo peptona y extracto de levadura y glucosa	<i>Cryptobacterium</i>
M. Producen ácidos acético, fórmico y láctico, a veces con vestigios de ácido succínico; abundante etanol; sacarolíticos; a menudo en forma de cocos pleomorfos a bacilos cortos; pueden ser confundidos con estreptococos o lactobacilos pero se distinguen por producir abundante H_2	<i>Collinsella</i>
N. Acetato y lactato son los principales productos con una pequeña cantidad de succinato; sacarolíticos (débil); bacilos cortos a largos que se encuentran en pares y cadenas cortas	<i>Holdemania</i>
O. El ácido fenilacético producido como único producto metabólico en caldo de peptona, extracto de levadura y glucosa; asacarolíticos; bacilos cortos que se encuentran solos, en cadenas cortas o en racimos	<i>Mogibacterium</i>
P. Los ácidos succínico y acético son los principales productos de fermentación, con ácido láctico o sin él; oxidasa negativos, bacilos curvos, móviles con múltiples flagelos subterminales; fermentadores en caldo de peptona, extracto de levadura y glucógeno, suplementado con suero de conejo	<i>Mobiluncus</i>
Q. Producen formato, acetato, butirato, caproato e H_2 ; bacilos pleomorfos que se encuentran en pares asemejándose a pájaros en vuelo, racimos o letras chinas (antes <i>Eubacterium alactolyticum</i>)	<i>Pseudoramibacter</i>
R. Producen sólo ácido acético o productos metabólicos no ácidos; se encuentran en forma de bacilos, cocos o cocobacilos en cadenas y racimos	<i>Slackia</i>
II. Producen endoesporas bacterianas	<i>Clostridium</i>

Adaptado de Koneman et al.¹³⁵ y de otras referencias citadas en el texto.

Análisis de ácidos no volátiles

Los ácidos pirúvico, láctico, fumárico, succínico, hidrocínámico y fenilacético no se detectan con el procedimiento de extracción con éter para ácidos grasos volátiles. Estos ácidos no volátiles se identifican después de la preparación de derivados metilados. El procedimiento se reseña en el recuadro 16-11.

Se realiza el análisis de los extractos clorofórmicos usando las mismas condiciones cromatográficas que para los ácidos volátiles. Se identifican los ácidos metilados o no volátiles por comparación de los tiempos de elusión en los extractos con los de los ácidos grasos conocidos cromatografiados el mismo día. Después de probar aproximadamente 20 muestras metiladas, se inyectan 14 μ L de metanol en el cromatógrafo de gas.

Controles de la cromatografía de gas-líquido

Las soluciones estándares que contienen 1 mEq/100 mL de cada ácido volátil y no volátil deben ser analizadas al mismo tiempo que se prueban las soluciones desconocidas. El estándar

de ácidos volátiles debe contener al menos los siguientes ácidos: acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico y caproico. El estándar de ácidos no volátiles debe contener al menos los ácidos pirúvico, láctico, fumárico, succínico, hidrocínámico y fenilacético. Se debe analizar un tubo con medio sin inocular de la misma forma, porque varios lotes de caldo PYG pueden contener cantidades significativas de estos ácidos.

Lombard y cols. encontraron que varios medios líquidos tanto como el caldo PYG pueden usarse para el análisis de productos metabólicos ácidos.¹⁵² Estos medios son: caldo de tioglicolato enriquecido, glucosa y carne picada, caldo con glucosa de Lombard-Dowell y caldo de Schaedler (BD Microbiology Systems). Sin embargo, cuando crecen en esos medios de caldo, los resultados de un microorganismo dado pueden diferir de los logrados en PYG. Así, se debe tener cuidado en la interpretación de los productos de diferentes medios cuando los cuadros de identificación han sido preparados a partir de una base de datos PYG. Se garantiza una nota adicional de cuidado; la cantidad de ácido acético, láctico y otros ácidos presentes en cier-

Recuadro 16-10 Identificación de ácidos grasos volátiles

1. Inocular tubos que contienen 7 a 8 mL de caldo glucosa-extracto de levadura-peptona (PYG) prerreducido con unas gotas (0,05 a 0,1 mL) de un cultivo en desarrollo activo.
2. Incubar en condiciones anaerobias durante 48 horas o hasta obtener un desarrollo adecuado.
3. Transferir 2 mL del cultivo a un tubo con tapa de rosca de 13 por 100 mm.
4. Acidificar el cultivo hasta un pH de 2 o menor por el agregado de 0,2 mL de solución acuosa al 50% (v/v) de H_2SO_4 .
5. Agregar 1 mL de éter etílico, apretar la tapa y mezclar por inversión suave del tubo cerca de 20 veces.
6. Centrifugar en una centrifuga clínica (1 500 a 2 000 rpm) para romper la emulsión éter-cultivo.
7. Colocar la mezcla éter-cultivo en el congelador a $-20^\circ C$ o menos o en un baño de hielo seco-alcohol hasta que la porción acuosa (de abajo) se congele.
8. Vaciar en forma rápida la capa de éter en un tubo de tapa de rosca limpio. Si se desea, agregar una o dos partículas de $CaCl_2$ al extracto de éter para eliminar el agua residual.
9. Inyectar 14 μL del extracto en la columna de un cromatógrafo gaseoso cargada con SP-1220.

tos medios líquidos, como caldo con glucosa y carne picada pueden hacer difícil o a veces imposible determinar si el pico de ácido acético o láctico fue producido por el aislamiento desconocido o simplemente por el medio sin inocular.¹⁵²

En las figuras 16-9 hasta 16-13 se muestran los trazados cromatográficos de un estándar de ácidos volátiles; cultivos en caldo PYG de *Fusobacterium mortiferum*, *Clostridium difficile* y *Peptostreptococcus anaerobius*, y un estándar de ácidos no volátiles. Los productos metabólicos de especies comunes de bacilos gramnegativos anaerobios se enumeran en el cuadro 16-11.

Identificación de bacterias anaerobias

En el cuadro 16-2 se proporciona una actualización extensa de la nomenclatura (nombres actuales y antiguos) de las bacterias anaerobias. Por fortuna, los anaerobios clínicamente más importantes o los aislados con mayor frecuencia en muestras clínicas recolectadas y seleccionadas de manera apropiada comprenden una lista bastante más pequeña (cuadro 16-3). Sólo 12-15 grupos o especies dan cuenta del 75% o más de los aislamientos de especies aisladas en forma adecuada. Éstas incluyen el grupo de *Bacteroides fragilis*, el grupo *Prevotella*-*Porphyromonas pigmentado*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fingoldia magna* (y algunas otras especies de cocos anaerobios), *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, *C. ramosum* y especies de *Veillonella*. El personal de laboratorio debe estar familiarizado con estas especies porque no son muy comunes y a menudo son clínicamente significativas. También es importante que los microbiólogos clínicos conozcan y puedan reconocer a: *Fusobacterium necrophorum*, *Actinomyces israelii*, *Propionibacterium propionicum*, el grupo *C. clostridioforme*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. tetani* y algunas otras especies (tratadas más ade-

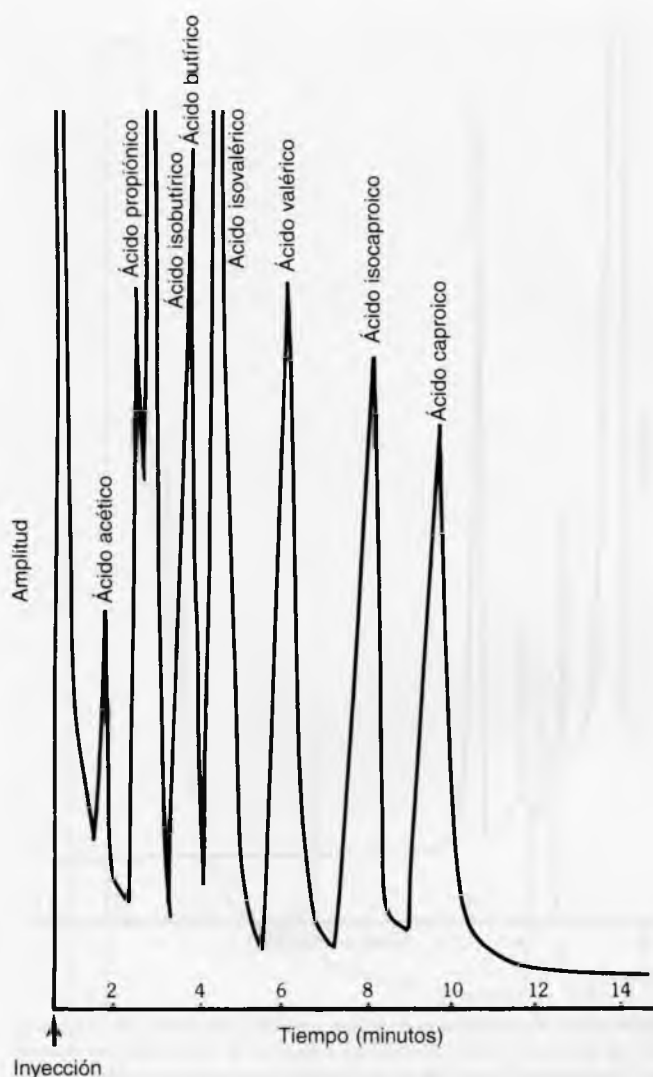


Figura 16-9 Cromatograma estándar de ácidos volátiles típicos. El tiempo transcurrido entre la inyección de un extracto etéreo de la solución estándar y el pico para cada ácido (tiempo de retención) se usa para identificar los ácidos. Nótese, por ejemplo, que el tiempo de retención para el ácido acético es de 1,8 minutos y para el ácido valérico es de 6 minutos (instrumento usado: Dohrmann Anabac, Clinical Analysis Products, Sunnyvale CA; Detector: conductividad térmica; carga de la columna: 15%, SP-1220/1% de H_3PO_4 en 100/120 Chromasorb W/AW® de Supelco, Bellefonte, PA).

lante) porque estos microorganismos pueden ser altamente patógenos para los pacientes (incluso si no son comunes).

Más allá de considerar la necesidad de estar familiarizado con los anaerobios comunes o clínicamente importantes se ha propuesto que los microbiólogos podrían desear limitar la extensión de la identificación anaerobia, basada en niveles de capacidad.^{8,10} Como ya se propuso, los laboratorios con capacidad limitada (nivel 1 o extensión 1) deben poder aislar anaerobios en cultivos puros y evaluar la morfología de la colonia y las características microscópicas. Junto con los resultados de las pruebas de aerotolerancia, esta información debe transmitirse a los médicos (como informe preliminar). Si es clínicamente relevante sobre la base de 1) la situación clínica vista por el médico; 2) un frotis directo teñido con Gram de una herida o un absceso, líquido peritoneal u otras muestras, que revelen

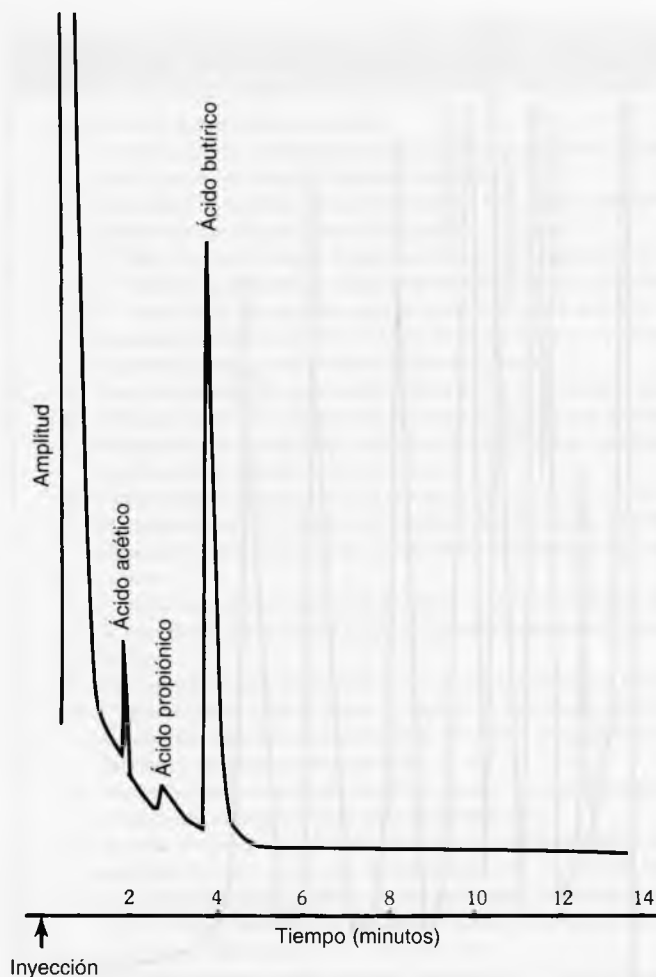


Figura 16-10 Cromatograma de ácidos volátiles de un cultivo de 48 horas en caldo de peptona, extracto de levadura y glucosa de *Fusobacterium mortiferum*. Los tiempos de retención de los productos en el cultivo en caldo se comparan con los del trazado estándar (véase fig. 16-9) para identificar los ácidos desconocidos. Los picos indican las cantidades mayores de ácido butírico y acético, pero sólo una cantidad menor de propionato para este cultivo. Se usaron las mismas condiciones y el mismo instrumento que en el trazado de la figura 16-9.

evidencia de inflamación aguda (como numerosos leucocitos polimorfonucleares, pero ausencia de células epiteliales pavimentosas) o necrosis; 3) evidencia microscópica de mionecrosis de clostridios (lámina en color 16-3D); 4) gránulos de azulre sugestivos de actinomicetos (lámina en color 16-2C y D), 5) hemocultivos positivos o cultivos positivos de líquidos corporales (p. ej., líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido articular), los aislamientos junto con los extendidos directos deben ser transportados a un laboratorio de referencia y procesados con más detalle. A su vez, los laboratorios incluso con la capacidad de identificación definitiva (nivel 4) de aislamientos anaerobios podrían querer limitar la extensión del proceso al nivel 1 cuando no existe razón clínica para realizar la identificación adicional. Un ejemplo podría ser una muestra de hisopado peritoneal obtenida en la operación de un paciente a pocas horas de una herida penetrante de cuchillo o de un disparo de arma de fuego en el abdomen. La perforación del intestino

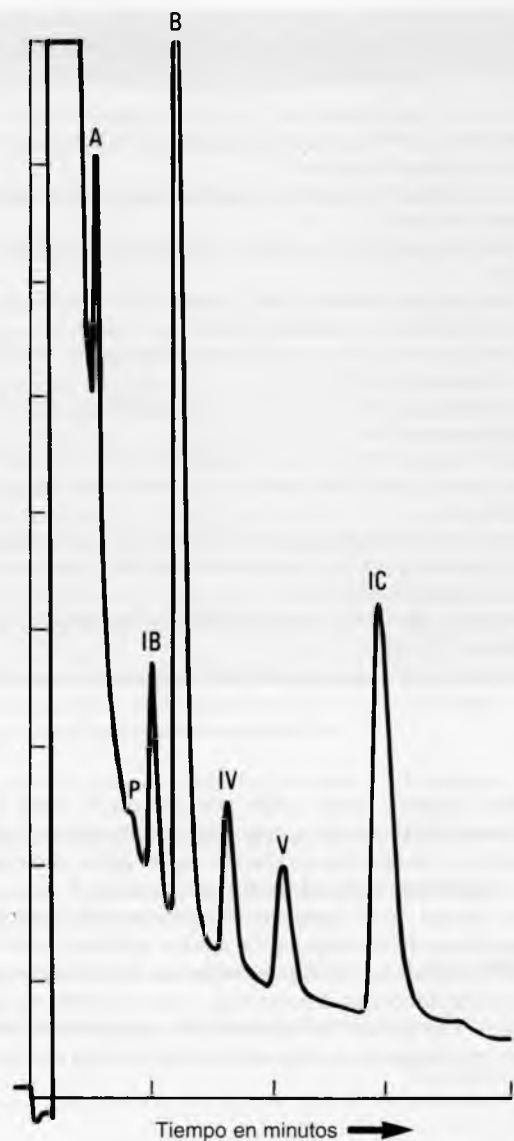


Figura 16-11 Ejemplo de un cromatograma de ácidos volátiles de un cultivo de 48 horas en caldo de peptona, extracto de levadura y glucosa de *Clostridium difficile*. A, ácido acético; P, ácido propiónico; IB, ácido isobutírico; B, ácido butírico; IV, ácido isovalérico; V, ácido valérico; IC, ácido isocaproico.

grosso y del intestino delgado distal provoca un derramamiento fecal en el abdomen. Las muestras obtenidas en ese momento probablemente mostrarán formas morfológicas bacterianas mixtas y algunos leucocitos polimorfonucleares en los frotis teñidos con Gram y desarrollarán una mezcla de flora intestinal normal. La identificación de estos microorganismos no tendría utilidad clínica y sería desmedidamente costosa.

El segundo nivel de capacidad propuesto requeriría, además del nivel 1, alguna capacidad de identificación.^{8,10} Debe realizarse la diferenciación del grupo *B. fragilis* de los anaerobios gramnegativos y la identificación de *C. perfringens*. De modo similar al primer nivel de identificación, los aislamientos y los frotis directos de los casos relevantes deberán ser transportados a un laboratorio de referencia para identificaciones adicionales de los aislamientos.

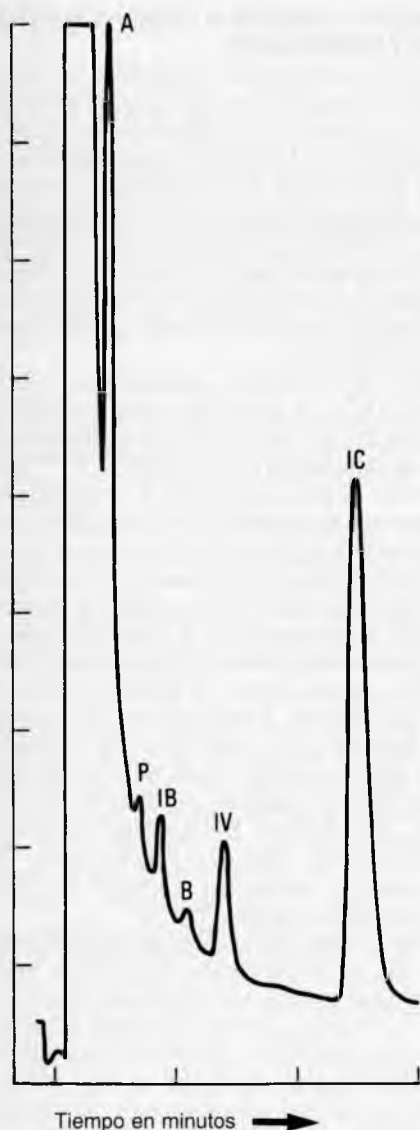


Figura 16-12 Ejemplo de un trazado cromatográfico de ácidos volátiles de un cultivo de 48 horas en caldo de peptona, extracto de levadura y glucosa de *Peptostreptococcus anaerobius*: A, ácido acético; P, ácido propiónico; IB, ácido isobutírico; B, ácido butírico; IV, ácido isovalérico; IC, ácido isocaproico.

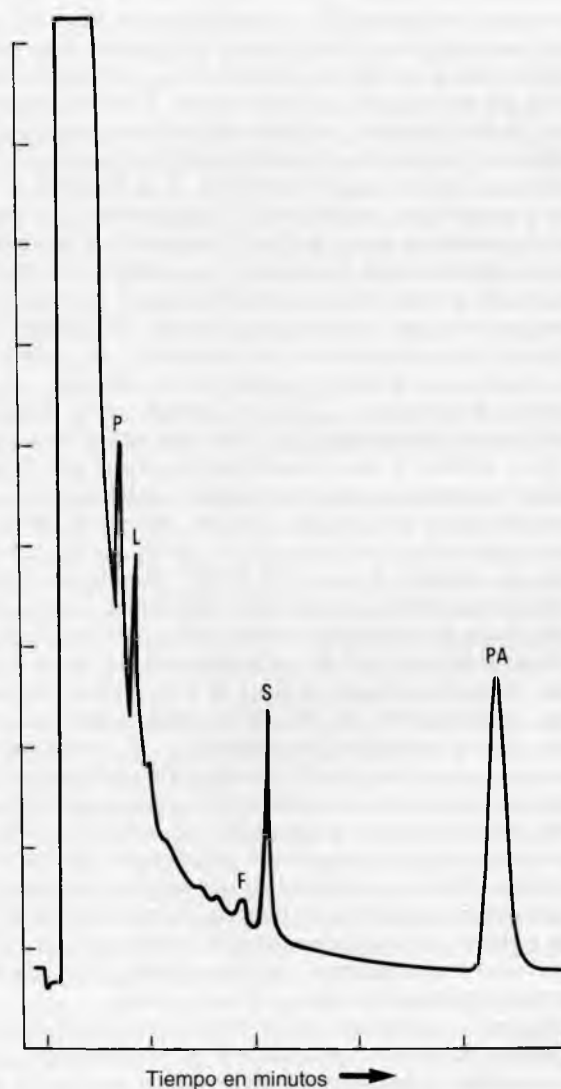


Figura 16-13 Cromatograma estándar de ácidos no volátiles típicos. La columna está cargada con 10% de SP. 1000/1% de H_3PO_4 en 100/120 de Chromasorb W/AW® (Supelco, Bellefonte, PA). P, ácido pirúvico; L, ácido láctico; F, ácido fumárico; S, ácido succínico; PA, ácido fenilacético.

Recuadro 16-11 Identificación de ácidos grasos no volátiles

1. Transferir 1 mL del cultivo en PYG original a un tubo con tapa de rosca de 13 por 100 mm limpio.
2. Agregar 0,4 mL de H_2SO_4 y 2 mL de metanol.
3. Colocar el tubo en un baño de agua a 55 °C por 1 hora o durante toda la noche.
4. Agregar 1 mL de agua destilada y 0,5 mL de cloroformo, y centrifugar poco tiempo para romper la emulsión en la capa de cloroformo (el cloroformo estará en la parte inferior del tubo).
5. Llenar una jeringa con el extracto clorofórmico después de colocar el extremo de la aguja por debajo de la capa acuosa.
6. Limpiar la parte exterior de la aguja con un tisú limpio e inyectar 14 μ L en una columna CGL cargada con SP-1000.

El tercer nivel de capacidad propuesto requeriría la identificación presuntiva de la mayoría de los doce grupos anaerobios más comunes y de especies mencionadas antes. Esta tercera categoría o extensión de identificación puede ser cumplimentada sin el uso de cromatografía gaseosa. Como se dijo en la explicación de los procedimientos de CGL, los anaerobios comunes y clínicamente importantes que pueden ser identificados de forma presuntiva, usando unas pocas pruebas rápidas simples, son el grupo *B. fragilis*, los grupos *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentados (cuando se forma pigmento), *F. nucleatum*, *P. anaerobius*, *F. magna*, *P. acnes*, *C. perfringens*, *C. ramosum*, *A. israelii* y varias especies no tan comunes. Los detalles de la morfología, las características del desarrollo, la aerotolerancia, algunas pruebas rápidas de manchas, el sistema de placa Presumpto y otros métodos prácticos que permiten el reconocimiento y la diferenciación de esos grupos y especies se dan a continuación. Ya se señaló que entre los ais-

lamientos que requieren CGL y caracterización adicional para permitir una identificación precisa se incluyen la mayoría de las especies de *Clostridium* además de *C. perfringens* o *C. ramosum*, la mayoría de las especies de *Fusobacterium*, la mayoría de los géneros y especies de bacilos gramnegativos anaerobios no formadores de esporas además del grupo *B. fragilis*, algunos de los cocos anaerobios, y la mayoría de los bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas. Esto se menciona de nuevo porque el cuarto nivel de identificación (o identificación definitiva), que abarca las pruebas hechas en los niveles previos, también incluye CGL para los microorganismos que lo requieran. Además de determinar la morfología, las características del desarrollo, las relaciones con el oxígeno, las pruebas preliminares de manchas, el uso del sistema Presumpto y CGL, la identificación definitiva (nivel 4) incluye determinar qué otras características se necesitan para arribar a una identificación exacta de especie (incluidas las especies que no se aíslan con frecuencia). Así, las características adicionales pueden obtenerse mediante pruebas bioquímicas tradicionales en caldo, ciertas pruebas enzimáticas rápidas (p. ej., API-ZYM® [BioMérieux-Vitek, Inc., Hazelwood, MO], RapID-ANA II® [Remel, Lenexa, KS] o en uno de los otros equipos comerciales), pruebas de toxicidad, electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles de la célula entera, análisis de ácidos grasos de cadena larga, secuenciación de 16S rRNA-DNA u otros procedimientos que se consideren necesarios (p. ej., remitiendo el aislamiento a un laboratorio de investigación para pruebas moleculares más extensas). Los laboratorios capaces de la identificación definitiva tienen la alternativa de limitar las identificaciones a los niveles presuntivos o preliminares descritos con anterioridad. Entre los laboratorios que realizan la identificación definitiva o de nivel 4 se pueden incluir aquellos de los centros médicos universitarios grandes, muchos de los hospitales privados y comunitarios más importantes y los laboratorios de salud pública federales y de cada estado.

Se requiere la identificación definitiva para definir mejor el papel de las bacterias anaerobias en las enfermedades, para proveer un diagnóstico microbiológico exacto que pueda ayudar a la elección óptima de los antibióticos y al tratamiento clínico del paciente, para objetivos de la salud pública (p. ej., diarrea causada por *C. difficile*) y para contribuir a la educación de médicos y microbiólogos clínicos. Cuán lejos se debe ir en la identificación de anaerobios depende de varias consideraciones que diferirán entre los distintos laboratorios. No se puede esperar que todos los laboratorios realicen los mismos niveles de estudios bacteriológicos anaerobios. Los factores que influyen en la toma de decisiones en la extensión de la identificación son la competencia técnica y la experiencia de las personas que trabajan en el laboratorio, el número de personal disponible, la provisión y el presupuesto para equipamiento, la población de pacientes a la que se presta el servicio y las necesidades de los médicos que tienen la responsabilidad de sus pacientes.^{8,10} Los microbiólogos clínicos deben ser competentes en su trabajo y no vacilar en usar los servicios de los laboratorios de referencia como ayuda para la identificación definitiva o para la confirmación de referencia de los aislamientos, así como las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, las pruebas de toxigenicidad, los estudios de ácidos nucleicos u otros procedimientos cuando sean de importancia clínica, si el laboratorio mencionado carece de esta capacidad. En otra parte se brindan aproximaciones adicionales e información actualizada de la identificación de anaerobios basadas en varias combinaciones de pruebas en diferentes niveles.^{60,125}

Bacilos gramnegativos anaerobios no formadores de esporas

CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Las bacterias gramnegativas anaerobias no formadoras de esporas se clasifican ahora en los géneros presentados en el cuadro 16-1. Las características claves para la diferenciación se dan en el cuadro 16-8. Los bacilos gramnegativos anaerobios están entre la flora normal de la orofaringe, el intestino grueso, la vagina, el cuello uterino, la uretra y los genitales externos. *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, y *Biophila* son los géneros que por lo común se aíslan en muestras recolectadas y seleccionadas en forma adecuada (muestras sin contaminación con flora normal) de seres humanos con infecciones significativas.

Los nombres de los bacilos gramnegativos continúan cambiando (cuadro 16-2), en gran parte como resultado de estudios taxonómicos en los que se usan los procedimientos moleculares, como la secuenciación de 16S rDNA.^{67,123,124} Las bacterias anaerobias están siendo clasificadas y reclasificadas sobre la base del parentesco filogenético y los resultados de esas investigaciones taxonómicas pueden no relacionarse con la reacción de Gram, la morfología de coco o bacilo, la capacidad para formar esporas, las relaciones con el oxígeno u otras características fenotípicas tradicionales para clasificar anaerobios. De acuerdo con los estudios filogenéticos actuales, muchas especies de bacilos gramnegativos se agrupan dentro del subfilo *Clostridium* de bacterias grampositivas; éste incluye un gran número de bacterias que están entre la microflora natural humana y de varios animales, y son raras en muestras clínicas o todavía no han sido aisladas en ellas (p. ej., especies de *Leptotrichia*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Catonella morbi*, *Centipeda periodontii*, *Dialister pneumosintes*, *Johnsonella ignava*, *Mitsuokella multiacida*, especies de *Selenomonas*, especies de *Tissierella* y otras).^{44,67,123,124}

A pesar de los numerosos avances taxonómicos nuevos basados en métodos de investigación de genética molecular, las pruebas fenotípicas todavía son importantes para los objetivos de diagnóstico clínico y pueden confiarse a los laboratorios hospitalarios para identificar anaerobios hasta que los procedimientos de identificación molecular de bajo costo, simples y fáciles de usar se vuelvan accesibles para esas bacterias.⁶⁷ Así, para la identificación de aislamientos en los laboratorios diagnósticos, los microbiólogos clínicos continúan dependiendo de las características morfológicas claves, las características bioquímicas y fisiológicas, y, en muchas oportunidades, de la sensibilidad o resistencia a ciertos antibióticos.

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR O PRESUNTIVA DEL GRUPO DE BACTEROIDES, PREVOTELLA, PORPHYROMONAS Y FUSOBACTERIUM

Como ya se indicó, el objetivo primero y principal de la identificación debe ser determinar si las bacterias anaerobias están presentes y aislarlas en cultivos puros.¹⁰ La presencia de bacilos gramnegativos anaerobios sugestivos de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* o especies de *Fusobacterium* (basándose en las relaciones con el oxígeno), junto con los resultados de la tinción de Gram y de la observación de las colonias, debe informarse enseguida al médico. La identificación presuntiva o preliminar del grupo *B. fragilis* y el grupo *Prevotella*-*Porphyromonas*, junto con otros bacilos gramnegativos, anaerobios obligados, puede realizarse fácilmente usando características diferenciales obtenidas con la placa Presumpto 1 y agar sangre para anaerobios (cuadros 16-10 y 16-11). En los cuadros 16-12 a 16-16 se encuentran otros datos para la identificación de grupo junto con las características claves de varias

especies. Nótese que todos los bacilos gramnegativos anaerobios no formadores de esporas encontrados en la clínica (cuadros 16-10 y 16-11) son no móviles. En la práctica no es necesario determinar la movilidad y realizar tinciones de flagelos para diferenciar los otros géneros de bacilos gramnegativos anaerobios (cuadro 16-8), a menos que las características diferenciales de un aislamiento (en cultivo puro) no se ajusten a las de las especies enumeradas en los cuadros 16-10 a 16-16.

Identificación de *Bacteroides*: el grupo de *Bacteroides fragilis*. Como ya se mencionó, los microorganismos del grupo *B. fragilis* son las bacterias anaerobias aisladas con más frecuencia en infecciones humanas y son importantes desde el punto de vista clínico (cuadro 16-10). Son parte de la microflora natural del tubo digestivo de la mayoría de las personas, pero rara vez se encuentran en la boca. A través de los años, se han usado numerosos nombres de especies para este grupo (p. ej., *convexus*, *convexa*, *pseudoinsolita*, *inequalis*, *incommunis*, *uncata*) y también varios nombres de género, pero ahora el grupo incluye sólo los referidos en el cuadro 16-2.

El grupo VPI "3542A" de DNA homólogo, antes sin nombre, que se asemeja mucho fenotípicamente a *B. distasonis*, ha sido nombrado *B. caccae*.¹¹⁸ La mayoría de las cepas de *B. caccae* fueron aisladas en las heces; no son comunes en muestras clínicas humanas recolectadas de modo apropiado. Otros dos grupos de DNA homólogo, VPI "T4-1" y "B5-21", fueron nombrados *B. merdae* y *B. stercoralis*, respectivamente. Estas especies también tienen similitud fenotípica con *B. fragilis* y con todas las otras especies del grupo *B. fragilis*. *B. merdae* y *B. stercoralis* fueron aisladas en muestras fecales y rara vez en muestras clínicas contaminadas con heces o contenidos intestinales (Allen SD y Siders JA, datos no publicados).

B. fragilis es la especie más común del grupo encontrada en muestras clínicas, pero no se aísla a menudo en las heces durante los estudios de flora intestinal. Por otro lado, *B. ovatus* no se aísla con tanta frecuencia en muestras bien recolectadas, pero es común en la materia fecal. Sin embargo, *B. ovatus* se aísla en ocasiones en la sangre de pacientes inmunodeprimidos con bacteriemia polimicrobiana secundaria a un traumatismo masivo o a necrosis del intestino. Las probabilidades de aislamiento de *B. ovatus*, *B. caccae*, *B. merdae* o *B. stercoralis* en muestras no intestinales recolectadas en forma apropiada son tan bajas que los aislamientos que muestren características diferenciales de esas especies deben ser comunicados al supervisor o director del laboratorio. *B. thetaiotaomicron* es la segunda especie más común del grupo *B. fragilis* en infecciones clínicas (cuadro 16-2). Para más información sobre las propiedades patógenas y las infecciones causadas por el grupo *B. fragilis*, el lector puede remitirse a otro sitio.^{6,70,155,222}

Los microorganismos del grupo *B. fragilis* son bacilos gramnegativos, no móviles, con extremos redondeados, de 0.5-0.8 µm de diámetro × 1.5-9 µm de largo.²²² Las células del cultivo en caldo tienden a ser pleomorfas, a menudo con vacuolas. Muchas cepas son capsuladas; la importancia patológica de sus cápsulas no está clara. Las colonias de *B. fragilis* en agar sangre para anaerobios de los CDC tienen un diámetro de 1 a 4 mm, son no hemolíticas, grises, de bordes lisos, semiopacas y con espirales concéntricas o estructuras en forma de anillo en el interior de las colonias (lámina en color 16-1). Las colonias de otras especies del grupo son similares en forma y tamaño, pero difieren con respecto a sus estructuras internas. Una característica clave de las especies del grupo *B. fragilis* es que su crecimiento se mejora con bilis (cuadros 16-10 y 16-12). Todas son resistentes a penicilina, kanamicina, colistina y vancomicina, pero sensibles a la rifampicina por

la técnica con disco (cuadro 16-10). Todas son sacarolíticas y sus patrones de fermentación de hidratos de carbono (junto con el indol) ayudan a diferenciar entre las especies (cuadro 16-12). Las características detalladas de las especies se dan en los cuadros 16-10 al 16-15. Hay dos especies de *Bacteroides* en el cuadro 16-12 que no fermentan sacarosa: *B. eggerthii* y *B. splanchnicus* y comparten varias características fenotípicas. En su objetivo por restringir el género *Bacteroides* a *Bacteroides fragilis* y especies muy relacionadas, Shah y Collins incluyeron *B. eggerthii*, pero no *B. splanchnicus* en el grupo *B. fragilis*.²¹⁰ En la práctica, ambas especies se aíslan con poca frecuencia en muestras clínicas recolectadas y seleccionadas apropiadamente. Así, la diferenciación entre *B. eggerthii* y *B. splanchnicus* es un informe raro en el laboratorio clínico. Para más detalles sobre las características de *B. splanchnicus*, véase el cuadro 16-14. Para más información acerca de *B. splanchnicus* y *B. eggerthii*, se recomienda el capítulo de Holdeman y cols. del *Manual de Bergey*.¹¹⁰

Bacilos gramnegativos anaerobios pigmentados. Como ya se mencionó, Shah y Collins propusieron que el género *Bacteroides* esté restringido al grupo *Bacteroides fragilis* y especies relacionadas, que fermentan la glucosa (pH ≤ 5.4) (altamente sacarolíticas), se desarrollan en presencia de 20% de bilis e hidrolizan esculina.²¹⁰ Sus productos metabólicos ácidos más importantes a partir del metabolismo de la glucosa son los ácidos acético y succínico, y se pueden producir cantidades menores de otros ácidos grasos de cadena corta.²¹⁰ Por lo tanto, los bacilos gramnegativos anaerobios pigmentados no se clasifican más en el género *Bacteroides*. Las especies pigmentadas, moderadamente sacarolíticas, se colocaron en el género *Prevotella*. En 1988, los *Bacteroides* pigmentados, asacarolíticos, todos aislados en seres humanos, se reclasificaron en el género *Porphyromonas* como *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.²⁰⁹ Las especies de *Porphyromonas* adicionales de origen humano ahora incluyen *P. catoniae* (no pigmentada) y aquellas consideradas similares a *P. levii*.¹²⁴

Las siguientes especies sacarolíticas pigmentadas se encuentran en muestras clínicas humanas: *Prevotella melaninogenica*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. loeschii*, *P. tanneriae* y *P. pallens*, *P. shahii* y *P. salivae*.^{136,178,204,211,213,214,261} Muchas especies de *Prevotella* se aíslan a menudo en la cavidad bucal, en infecciones que comprometen la cabeza, el cuello y las vías respiratorias bajas, y en el aparato urogenital.

Una gran proporción, si no la mayoría, de las cepas de *Porphyromonas* aisladas en la cavidad bucal son *Porphyromonas gingivalis*;²⁴⁴ la mayoría de los aislamientos clínicos no bucales de *Porphyromonas* aislados en otras regiones anatómicas humanas son *Porphyromonas asaccharolytica*, mientras que las cepas de *Porphyromonas endodontalis* han sido aisladas en infecciones de conductos radiculares infectados.²⁰⁹

Desde 1992, el género *Porphyromonas* ha cambiado mucho, ahora con un total de 13 especies (cuadro 16-2). Cinco de esas especies sólo se aislaron en la cavidad bucal de perros (*P. canis*, *P. gingivalis*, *P. canoris*, *P. cansulci*, *P. crevioricanis* y *P. gingivicanis*),^{45,105,159} una se ha aislado sólo en la cavidad bucal de gatos (*P. circumdentaria*),¹⁵⁷ y otra, en monos y gatos (*P. macaccae*, que incluye los llamados con anterioridad *P. salivosa*),¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ otra es del ganado (*P. levii*),²¹² una especie fue aislada en la cavidad bucal humana (*P. catoniae*)²⁶² y *P. gulae*, descrita en 2001, fue aislada en varios animales (osos, gatos, coyotes, perros, lobos y monos). Aunque su importancia clínica en los seres humanos se desconoce, las especies aisladas en la boca de animales pueden encontrarse en infecciones de heridas por mordeduras.

Cuadro 16-10 Identificación presuntiva o preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios obligados

GRUPOS O ESPECIES	AGAR SANGRE PARA ANAEROBIOS							PLACA CUADRANTE PRESUMPTO 1					
	Fluorescencia roja (luz UV)	Colonias marrón-negras	Colonias < 1 mm de diámetro	Agar con hoyuelos	Penicilina (discos de 2 U)	Rifampicina (disco de 15 µg)	Kanamicina (disco de 1 µg)	Indol	Lipasa	Esculina	H ₂ S	Catalasa (agar esculina LD)	Crecimiento en agar bilis
Grupo <i>B. fragilis</i>	–	–	–	–	R	S	R	V	–	+/-	–	V	E
Pigmentados													
<i>Porphyromonas-Prevotella</i>	+	+	–	–	S o R	S	R	+	-/+	–	–	–	I o E
<i>B. ureolyticus</i>	–	–	+	+	S	S	S	–	–	–	–	–	I
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	–	–	–	–	R o S	R	S	–	–	+	+	–	E
<i>F. necrophorum</i>	–	–	–	–	S	S	S	+	+	–	+	–	I
<i>F. nucleatum</i>	–	–	–	–	S	S	S	+	–	–	–	–	I
<i>F. varium</i>	–	–	–	–	R o S	R	S	+	–	–	+	–	E
R, crecimiento no inhibido; S, crecimiento inhibido; LD, Lombard-Dowell; V, reacción variable; +, reacción positiva del 90-100% de las cepas probadas; –, reacción negativa en las cepas probadas; E, crecimiento ≥ crecimiento en agar LD; I, crecimiento inhibido (en comparación con agar LD).													

Cuadro 16-11 Algunas de las características claves diferenciales de especies de *Bacteroides* y *Fusobacterium* aisladas con frecuencia en agar sangre para anaerobios de los CDC

ESPECIE	RELACIÓN CON O ₂	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	HEMÓLISIS DE SANGRE DE CARNERO	FLUORESCENCIA ROJO-LADRILLO	PIGMENTO NEGRO	HOYUELOS EN EL AGAR	MORFOLOGÍA CELULAR	GRAM-NEGATIVO, ESPORAS, MOVILIDAD	PENICILINA (DISCO DE 2 U)	RIFAMPICINA (DISCO DE 15 µg)	KANAMICINA (DISCO DE 1 µg)	REDUCCIÓN DE NITRATO
<i>B. distasonis</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, semiopacas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>B. fragilis</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, de superficie moteada, anillos concéntricos, bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>B. ovatus</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, opacas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>B. thetaiotaomicron</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, opacas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>B. uniformis</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, opacas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>B. ureolyticus</i>	AO	Diminutas, convexas, de bordes irregulares	—	—	—	+	Bacilos pequeños, delgados, de longitud variable	—	S	S	S	+
<i>B. vulgatus</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, semiopacas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos pequeños de longitud variable	—	R	S	R	—
<i>Porphyromonas</i> como un grupo <i>P. gingivalis</i> asacrolítico	AO	Pequeñas a medianas, convexas, de bordes lisos	+	+	+	—	Bacilos cocoides diminutos	—	S	S	R	—
<i>Prevotella bivia</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos cocoides diminutos, varían en longitud	—	R	S	R	—
<i>P. disiens</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, de bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos cocoides diminutos, varían en longitud	—	R	S	R	—
<i>P. intermedia</i>	AO	Pequeñas a medianas, convexas, de bordes lisos	+	+	+	—	Bacilos cocoides diminutos	—	S o R	S	R	—
<i>Fusobacterium F. mortiferum</i>	AO	Pequeñas a medianas, con forma de huevo frito ^a	—	—	—	—	Bacilos altamente pleomorfos, filamentosos, corpúsculos redondos grandes	—	R o S	R	S	—
<i>F. naviforme</i>	AO	Pequeñas, poco convexas, moteadas, bordes lisos	—	—	—	—	Bacilos delgados pleomorfos, algunos con extremos aguzados	—	S	S	S	—
<i>F. necrophorum</i>	AO	Pequeñas a medianas, elevadas con centros opacos	—	—	—	—	Muy variables en anchura y longitud	—	S	S	S	—
<i>F. nucleatum</i>	AO	Pequeñas a medianas, de opalescencia jaspeada. ^c A veces las colonias se asemejan a migas de pan	Verde	—	—	—	Bacilos filamentosos delgados, por lo general con extremos aguzados	—	S	S	S	—
<i>F. varium</i>	AO	Pequeñas a medianas, con forma de huevo frito ^a	—	—	—	—	Bacilos pequeños, de longitud variable, con extremos redondeados	—	R o S	R	S	—

^a Forma de huevo frito: centro opaco elevado con borde entero translúcido.^b *F. necrophorum* hidroliza hemáties de conejo, pero no de carnero.^c Opalescencia moteada: las colonias de *F. nucleatum* muestran motas (en las colonias) cuando se observan con un microscopio de disección con luz reflejada; por lo común no son hemolíticas, pero pueden causar decoloración grisácea del agar sangre en exposición al oxígeno.

AO, anaerobio obligado; +, reacción positiva en el 90% de las cepas probadas; —, reacción negativa en el 90% de las cepas probadas; R, resistente; S, sensible.

Según Dowell VR, Allen SD. Anaerobic bacterial infections. En: Balows A, Hausler WJ Jr eds. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic, and Parasitic Infections. 6ª ed. Washington, DC: 174-219.

Cuadro 16-12 Algunas características de los bacilos gramnegativos que se aíslan con frecuencia en medios diferenciales de agar de los CDC

ESPECIE	Nº DE CEPAS EXAMINADAS	PLACA PRESUMPTO 1								PLACA PRESUMPTO 2				PLACA PRESUMPTO 3			
		Indol	Derivado del indol	Hidrólisis de esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinasa	Lipasa	Crecimiento en agar bilis	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de almidón	Proteólisis de leche	DNasa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación de manitol	Fermentación de lactosa	Fermentación de ramsosa
<i>B. distasonis</i>	21	—	—	+	—	+/-	—	—	C	+	—	-/+	—	—	—	+	+
<i>B. fragilis</i>	135	—	—	+	—	+	—	—	Cpp	+	-/+	-/+	—	—	—	+	—
<i>B. ovatus</i>	5	+/-	—	+	—	V	—	—	Cpp	+	V	V	V	—	+/-	+	+
<i>B. thetaiotaomicron</i>	71	+	—	+	—	+	—	—	C	+	-/+	-/+	+/-	—	—	+	+
<i>B. uniformis</i>	5	+	—	+/-	—	—	—	—	C	+	—	V	V	—	—	+	-/+
<i>B. vulgatus</i>	23	—	—	-/+	—	—	—	—	C	+	—	—	—	—	—	+	+
<i>B. splanchnicus</i>	2	+	—	+	V	—	—	—	C	+	—	—	—	V	—	+	—
<i>B. ureolyticus</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	V	—	—	-/+	—	-/+	—	—	—
<i>Campylobacter gracilis</i>	10	—	—	—	—	—	—	—	V	—	—	—	-/+	—	—	—	—
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	6	+/-	—	—	—	—	—	-/+	SC	—	—	+/-	-/+	V	—	—	—
<i>P. gingivalis</i>	13	+	—	—	V	—	—	—	SC	—	-/+	+	—	+	—	—	—
<i>Prevotella bivia</i>	14	—	—	—	—	—	—	—	SC	+	-/+	+/-	+/-	V	-/+	+	-/+
<i>P. disiens</i>	3	—	—	—	—	—	—	—	V	+/-	—	+	V	+	—	—	—
<i>P. denticola</i>	5	—	—	-/+	—	—	—	—	SC	+	+	—	+/-	-/+	—	+	—
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	16	+	—	—	—	—	—	+	SC	+/-	+/-	+	+	+	—	—	—
<i>P. melaninogenica</i>	10	—	—	—	—	—	—	—	SC	+	+	—	+/-	V	—	+	—
<i>P. oralis</i>	2	—	—	+	—	—	—	—	SC	V	V	—	V	—	—	V	V
<i>P. oris/buccae</i>	9	—	—	+	—	—	—	—	SC	+	+	+/-	+	—	—	+	-/+
<i>P. veroralis</i>	2	—	—	V	—	—	—	—	SC	+	+	—	V	—	—	+	V
<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	6	+/-	—	—	-/+	—	—	—	SC	-/+	—	—	—	—	—	—	—
<i>F. mortiferum</i>	5	-/+	—	+	—	—	—	—	C	+	—	—	—	—	—	V	—
<i>F. naviforme</i>	6	+	—	—	—	—	—	—	SC	-/+	—	—	—	—	—	—	—
<i>F. necrophorum</i>	18	+	—	—	V	—	—	+	SC	V	—	+	-/+	-/+	—	—	—
<i>F. nucleatum</i>	31	+	—	—	V	—	—	—	SC	V	—	—	—	—	—	—	—
<i>F. varium</i>	6	V	—	—	V	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—

+, reacción positiva en < 90% de las cepas; —, reacción negativa en < 90% de las cepas; +/-, la mayoría de las cepas positivas con ocasionales cepas negativas; -/+, la mayoría de las cepas negativas, con ocasionales cepas positivas; V, variable; I, crecimiento inhibido; E, crecimiento igual al control sin bilis; Cpp, crecimiento igual con un precipitado adyacente o debajo de las colonias, SC, sin crecimiento.

Adaptado de Whaley DN, Wiggs LS, Miller PH, Srivastava PU, Miller JM. Use of Presumpto plates to identify anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 33: 1196-1202, 1995, y ediciones previas de este libro.

Cuadro 16-13 Características útiles en la diferenciación del grupo *Bacteroides fragilis* y especies muy relacionadas que crecen bien en 20% de bilis

ESPECIES	PRODUCCIÓN DE		FERMENTACIÓN DE									
	Indol	Catalasa	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Melecitosa	Ramnosa	Ribosa	Salicina	Sacarosa	Trealosa	Xilano
Grupo <i>B. fragilis</i>												
A. Subgrupo indol negativo												
<i>B. caccae</i>	—	—	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	—
<i>B. distasonis</i>	—	+	—	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	—
<i>B. fragilis</i>	—	+	—	-/d	+	—	—	—	—	+	—	—
<i>B. merdae</i>	—	—	-/+	—	+	+	-/+	—	d	+	+	—
<i>B. vulgatus</i>	—	V	+	—	+	—	+	-/+	—	+	—	-/+
B. Subgrupo indol positivo												
<i>B. ovatus</i>	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>B. stercoris</i>	+	—	-/+	—	+	—	+	-/d	—	+	—	—
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+	+	V	+	+	-/+	+	+	—
<i>B. uniformis</i>	+	—	+	+	+	—	-/+	-/+	+/-	+	—	ND
<i>B. eggerthii</i>	+	V	+	-/d	+	—	d/-	—	—	—	—	+
Otros <i>Bacteroides</i> y especies relacionadas												
<i>B. splanchnicus</i>	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	ND

+, Reacción positiva para el 90% o más de las cepas (incluye reacciones fuertes y débiles); +/-, 51-89% de cepas positivas; -/+, 10-50% de cepas positivas; —, menos del 10% de cepas positivas; V, reacción variable; d, reacción débil; ND, datos no disponibles. De Holdeman et al.,¹⁰⁵ Johnson et al.¹¹⁶ y Allen y Siders, datos no publicados.

Cuadro 16-14 Características de fermentación de la glucosa, sensibilidad a la bilis, pigmentación y no pigmentación de especies de *Prevotella* aisladas en muestras clínicas^a

	FERMENTACIÓN DE									HIDRÓLISIS DE ESCULINA	INDOL
	Amigdalina	Arabinosa	Celobiosa	Lactosa	Melibiosa	Rafinosa	Salicina	Sacarosa	Xilosa		
Pueden ser pigmentadas											
<i>P. corporis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. denticola</i>	—	—	V	+	—	+	V	+	—	+	—
<i>P. intermedia</i>	—	—	—	—	—	V	—	+	—	—	+
<i>P. loescheii</i>	—	—	+	+	V	+	V	+	—	+	—/+
<i>P. melaninogenica</i>	—	—	V	+	—/+	+	—	+	—	V	—
<i>P. nigrescens</i>	—	—	—	—	—	NP	—	+	—	—	+
<i>P. tannerae</i>	—	—	—	V	—	V	—	V	—	V	—
No pigmentadas											
<i>P. bivia</i>	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. buccae</i>	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
<i>P. buccalis</i>	NP	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—
<i>P. dentalis</i>	NP	+	+	+	d	+	—	d	—	—	—
<i>P. disiens</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. enoeca</i>	—	—	—	+	—	—	—	—	V	V	—
<i>P. heparinolytica</i> ^b	NP	+	+	+	NP	—	+	+	+	+	+
<i>P. oralis</i>	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—
<i>P. oris</i>	+/-	+	+	+	V	+	+	+	—	+	—
<i>P. oulora</i>	NP	—	—	+	d/+	+	—	+	—	+	—
<i>P. veroralis</i>	—	—	V	+	d	+	V	+	V	V	—
<i>P. zoogloeiformans</i> ^b	—/d	V	V	V	V	V	V	+	V	V	+/-

^a Características bioquímicas modificadas de Holdeman, Nelly y Moore (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984), Shah y Collins (Int J System Bacteriol 1990; 40: 205-208), Shah y Gharbia (Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 542-546), Moore y Moore (Int J System Bacteriol 1994; 44: 599-602), y Williams y Collins (Int J System Bacteriol 1995; 45: 832-836).

^b Los cultivos en caldo tienen un sedimento cohesivo o pegajoso.

—, reacción negativa; +, reacción positiva; V, reacción variable; +/-, la mayoría de las cepas positivas; —/+, la mayoría de las cepas negativas; NP, no probadas; +/d, la mayoría de las cepas positivas, algunas positivas débiles; d/+, la mayoría de las cepas positivas débiles; d, reacción débil.

Cuadro 16-15 Productos metabólicos de especies de *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium* en cultivos en caldo de peptona, extracto de levadura y glucosa después de 48 horas a 35 °C°

ESPECIE O GRUPO	A	P	IB	B	IV	V	IC	C	L	S	PA ^s	PROPIONATO DE TREONINA
Bacteroides												
<i>B. capillosus</i>	+	V	—	—	—	—	—	—	—	+		
<i>B. distasonis</i>	+	+/-	—	—	V	—	—	—	+/-	+	+	
<i>B. fragilis</i>	+	+/-	V	—	V	—	—	—	+	+	+	
<i>B. ovatus</i>	+	+	V	—	V	—	—	—	V	+	+	
<i>B. splanchicus</i>	+	+	+	+	V	—	—	—	V	S		
<i>B. thetaiotaomicon</i>	+	+/-	V	—	V	—	—	—	V	+	+	
<i>B. uniformis</i>	+	+/-	V	—	V	—	—	—	+	+		
<i>B. ureolyticus</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+		
<i>B. vulgatus</i>	+	+	V	—	—	V	—	—	+	+	—	
Porphyromonas												
<i>P. asaccharolytica</i> ^b	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	
<i>P. gingivalis</i>	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	
Prevotella												
<i>P. bivia</i>	+	—	V	—	+/-	—	—	—	—	+		
<i>P. disiens</i>	+	V	V	—	V	—	—	—	—	+		
<i>P. intermedia</i>	+	V	V	—	+	—	—	—	—	+	—	
Fusobacterium												
<i>F. gonidiaformans</i>	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—		+
<i>F. mortiferum</i>	+	+/-	—	+	—	-/+	—	—	—	—		+
<i>F. naviforme</i>	+	V	—	+	—	—	—	—	—	—		—
<i>F. necrophorum</i>	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—		+
<i>F. nucleatum</i>	+	+	—	+	—	—	—	—	—	-/+		+
<i>F. varium</i>	+	+	—	+	—	—	—	—	+	-/+		+

^a Las especies enumeradas en este cuadro son las que pueden distinguirse usando el sistema de medios de agar diferenciales (véanse cuadros 16-10, 16-11 y 16-12). *Porphyromonas* pigmentadas negras, *asaccharolytica*, *P. asaccharolyticus* y *P. gingivalis* se pueden diferenciar en forma presuntiva por la presencia o ausencia de ácido fenilacético (PA) y otras pruebas descritas en el texto.

^b Los datos para la diferenciación de ciertos microorganismos del grupo *Bacteroides fragilis* y especies pigmentadas negras usando ácido PA son de Mayrand y Shah y Collins, como se citan en la 5ª edición de este libro.

A, ácido acético; P, ácido propiónico; IB, ácido isobutírico; B, ácido butírico; IV, ácido isovalérico; IC, ácido isocaproico; C, ácido caproico; L, ácido láctico; PA, ácido fenilacético; S, ácido succínico; +, pico principal; —, pico no principal; +/-, por lo general un pico principal, pero puede ser negativo; -/+, por lo general negativo, pero puede estar presente; V, variable.

De Dowell VR, Lombard GL. Presumptive identification of anaerobic non-spore-forming gram-negative bacilli. Atlanta: CDC, 1977:13.

En 1995, Willems y Collins no sólo reclasificaron *Oribaculum catoniae* como *Porphyromonas catoniae*, sino que también enmendaron el género *Porphyromonas*. De acuerdo con su nueva descripción, algunas especies ahora se incluyen como sacarolíticas (*P. levii*, *P. macacae* y *P. catoniae*) y *P. catoniae* no forma pigmento.²⁶²

Las características presuntivas para el reconocimiento de bacilos gramnegativos anaerobios que corresponden al género *Porphyromonas* son la formación de colonias de color bronce que emiten fluorescencia rojo ladrillo cuando se exponen a la luz ultravioleta de onda larga o la presencia de colonias marrones a negras (la mayoría de las especies), la inhibición del desarrollo en presencia de vancomicina (falta de desarrollo en agar

sangre kanamicina-vancomicina), inhibición por bilis, inhibición por penicilina y rifampicina, pero resistencia a kanamicina, formación de indol, y falta de fermentación de glucosa u otros hidratos de carbono de la mayoría de las especies. La identificación definitiva de las especies de *Porphyromonas* sobre la base de características fenotípicas es dificultosa. Algunas características diferenciales claves de las especies asacarolíticas, pigmentadas y catalasa negativas encontradas en enfermedades humanas se enumeran en el recuadro 16-12.

Por lo tanto, la determinación de actividades enzimáticas mediante el uso de un sistema de pruebas rápidas en 4 horas (el sistema Rapid ID 32 A o RapID ANAII) es una ayuda práctica para identificar las especies de *Porphyromonas* encontradas en

Recuadro 16-12 Características para la identificación de especies de *Porphyromonas*

1. *P. gingivalis*: produce ácido fenilacético (véase cuadro 16-11) y aglutina hemáties de carnero;¹⁷³ produce β -galactosa-6-fosfatasa y *N*-acetil- β -glucosaminidasa, pero no α -fucosidasa; puede ser probada en el sistema Rapid ID 32A (BioMérieux-Vitek).^{204,206}
2. *P. asaccharolytica*: no como la especie anterior; produce α -fucosidasa; probada en el sistema Rapid ID 32A.^{204,206}
3. *P. endodontalis*: como ninguna de las dos especies anteriores.

seres humanos.^{50,243,244} Otras características de las especies de *Porphyromonas* se indican en el cuadro 16-16.

A diferencia de *Porphyromonas*, todas las especies pigmentadas de *Prevotella* fermentan la glucosa y otros hidratos de carbono (cuadros 16-14 y 16-16). Se enfatiza que el grupo *Prevotella* "pigmentado" descrito en el cuadro 16-16 puede tomar de 2 días a 3 semanas para formar pigmento en agar sangre para anaerobios de los CDC o incluso puede faltar la producción de colonias pigmentadas. *Prevotella intermedia* es distintiva en que forma colonias negras, produce indol, es lipasa positiva en agar yema de huevo y fermenta la sacarosa. *Prevotella nigrescens* es una especie derivada de un grupo distinto genéticamente de cepas antes incluidas en *Prevotella intermedia*.²¹³ Algunas de estas cepas eran de pacientes con periodontitis; otras eran de individuos sanos. Mientras *P. nigrescens* y *P. intermedia* forman colonias de marrón a negras en agar sangre, producen indol y fermentan la sacarosa, sólo *P. intermedia* produce lipasa. *Prevotella corporis*, antes clasificada como *Bacteroides melaninogenicus* subespecie *intermedius*, difiere de *P. intermedia* en que no produce indol, es lipasa negativa y no fermenta la sacarosa (cuadro 16-16). *Prevotella bivia* y *Prevotella disiens* son muy similares desde el punto de

vista fenotípico a *P. intermedius* y *P. corporis*. *Prevotella bivia* se encuentra en el aparato urogenital y en la boca, y *P. disiens* se aísla por lo común en el aparato urogenital. Son sacarolíticas y se pueden confundir con facilidad cuando *P. intermedia* y *P. corporis* no producen pigmentos. Además, Ueno informó (comunicación personal) que *P. bivia* puede producir pigmento en ciertas condiciones. Otras cuatro especies de *Prevotella* sacarolíticas pigmentadas que se pueden aislar en seres humanos (*Prevotella melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. denticola* y *P. tanneriae*) a menudo fermentan lactosa, a diferencia de *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. corporis*, que son lactosa negativas. *P. denticola* es lenta para producir pigmento; algunas cepas no pueden producir pigmento incluso después de 3 semanas de incubación. *P. denticola* fermenta esculina y ribosa, característica que ayuda a separarla de *P. melaninogenica* (que es negativa para estas características).¹⁰⁹ *P. loescheii* tampoco fermenta esculina, a diferencia de *P. denticola* y *P. melaninogenica* y es celobiosa positiva. La mayoría de las cepas de *P. tanneriae* no hidrolizan esculina (86% de las cepas negativas para esculina) y la mayoría (69%) no fermentan la sacarosa. Otro microorganismo pigmentado, *Porphyromonas levii*, se ha aislado en rumiantes y no se tratará más adelante.²¹²

El principal problema en identificar las especies del grupo pigmentado es que a menudo son microorganismos con requerimientos nutricionales especiales y de crecimiento lento, y pueden requerir de 2 días hasta 3 semanas completas para formar el pigmento (en agar sangre de carnero o en agar sangre hemolizada de conejo lacada). Los grupos *Prevotella*-*Porphyromonas* son parte de la flora normal de la orofaringe, la nariz y los aparatos genitourinario y gastrointestinal. Son los segundos grupos más comunes de bacterias anaerobias encontradas en infecciones humanas (cuadro 16-3). En algunas situaciones clínicas, por ejemplo, en lesiones orofaciales e infecciones pleuropulmonares anaerobias, son más comunes que el grupo *B. fragilis*. Ciertas especies, en particular *Prevotella intermedia* (y posiblemente *P. nigrescens*), son de especial interés clínico porque por lo común producen β -lactamasa y pue-

Cuadro 16-16 Características útiles para identificar especies de *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium* encontradas con frecuencia

CARACTERÍSTICAS	ESPECIE
Fluorescencia rojo-ladrillo (con luz de longitud de onda UV) o pigmento marrón-negro	Grupo <i>Prevotella melaninogenica</i> ^a , especies de <i>Porphyromonas</i>
Buen crecimiento en bilis al 20%; resistente a penicilina (disco de 2 U), kanamicina (disco de 1 µg); e inhibido por rifampicina (disco de 15 µg)	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> ^a
Produce catalasa en agar esculina LD	<i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. distasonis</i> , <i>B. ovatus</i>
Produce lipasa en agar yema de huevo LD	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>F. necrophorum</i>
Asacarolítico (no fermenta glucosa ni otros hidratos de carbono)	<i>Bacteroides</i> del grupo F2 de los CDC, <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>B. capillosis</i> (esta especie es rara), <i>B. ureolyticus</i> , <i>F. gonidiaformans</i> (rara), <i>F. naviforme</i> , <i>F. nucleatum</i>
Agar con hoyuelos; ureasa positiva	<i>B. ureolyticus</i>
Hidroliza gelatina; digiere leche	<i>Prevotella bivia</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. intermedia</i>
DNasa positiva; desarrollo potenciado en bilis al 20%	<i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. ovatus</i>
Resistente a rifampicina; hidroliza esculina	<i>F. mortiferum</i>
Resistente a rifampicina; no hidroliza esculina	<i>F. varium</i>
Bacilos filamentosos, delgados, largos; manchas internas en las colonias; produce propionato a partir de treonina	<i>F. nucleatum</i>

^a Para el listado de especies incluidas véase el texto.

den ser resistentes in vitro a la penicilina G y a otros antibióticos.⁶⁰ Antes de la pigmentación, las colonias jóvenes a menudo emiten una fluorescencia rojo ladrillo cuando se exponen a la luz ultravioleta de onda larga (365 nm). En las preparaciones teñidas con Gram, las células son bacilos gramnegativos, cocoides, cortos, por lo general de 0,3-0,4 µm de diámetro × 0,6-1 µm de largo (lámina en color 16-1). En el sistema de placa Presumpto, estas especies se inhiben por bilis, a menudo (pero no siempre) son sensibles a la prueba con disco de 2 U de penicilina, sensibles a la rifampicina y resistentes a la kanamicina. En el cuadro 16-16 se incluyen otras características para la diferenciación o pueden determinarse usando pruebas para las actividades enzimáticas.^{50,178,214,242,244}

Otras especies de Prevotella. Como se mencionó, *Prevotella bivia* y *P. disiens* son especies que se asemejan fenotípicamente a *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. corporis*. Se inhiben por bilis, a menudo son resistentes a la penicilina, sensibles a la rifampicina y resistentes a la kanamicina. El acetato y el succinato son los principales productos metabólicos. Además de su usual falta de pigmento en agar sangre para anaerobios de los CDC mantenidos por 5 a 7 días, *P. bivia* y *P. disiens* difieren de *P. intermedia-nigrescens* en que son indol negativas y lipasa negativas. Además, *P. bivia* fermenta la lactosa, mientras que *P. disiens* y *P. intermedia-nigrescens* no lo hacen.¹⁰⁸ Un *P. corporis* no pigmentado parecería idéntico a *P. disiens* (cuadro 16-16). Como los grupos *B. fragilis* y *Prevotella-Porphyrromonas* pigmentados, las cepas de *P. bivia* y *P. disiens* producen β-lactamasa y pueden ser resistentes a varios antibióticos β-lactámicos.⁶⁹ Se han aislado en sangre, infecciones de cuello y cabeza, infecciones genitourinarias en hombres y mujeres, y otros sitios de infección. Las características útiles para la separación de *P. bivia* y *P. disiens* de *P. oralis* y especies relacionadas similares se presentan en el cuadro 16-16. Además de *Prevotella tanneriae*, descrita antes, Moore y cols. describieron otra especie que habita el surco gingival humano, *Prevotella enoeca*, y enmendaron la descripción de *Prevotella-zoogleoformans*.¹⁷⁸ Ambas especies han sido aisladas en pacientes con periodontitis, ninguna produce pigmentos en agar sangre y ambas fermentan una variedad de hidratos de carbono. Los rasgos claves que ayudan a distinguir *P. enoeca* de otras especies de *Prevotella* son su incapacidad para digerir gelatina, su falta de fermentación a la sacarosa y su perfil de ácidos grasos celulares. La fermentación de celobiosa y lactosa, la falta de pigmento y el perfil de ácidos grasos celulares son características claves que ayudan a diferenciar *P. zoogleoformans* de otras especies de *Prevotella* indol positivas, en especial *P. intermedia* y *P. nigrescens*, con las cuales comparte características fenotípicas.¹⁷⁸ Un cambio taxonómico adicional en 1995 fue la reclasificación de *Hallella seregens* y *Mitsuokella dentalis* como *Prevotella dentalis*.²⁶¹ Aisladas en conductos de raíces dentales, las colonias de *P. dentalis* no son pigmentadas; difieren de las otras especies *Prevotella* por su aspecto característico de “gota de agua”.

Prevotella oralis y especies relacionadas. Los principales cambios en la clasificación taxonómica de los microorganismos antes llamados *Bacteroides oralis* y *B. ruminicola* (cepas humanas) se realizaron sobre la base de estudios de homología de DNA.¹⁰⁶ Algunas de las cepas aisladas como “*B. oralis*” en el pasado fueron miembros del grupo *B. melaninogenicus* no formador de pigmentos, en especial *Prevotella denticola* (tratada con anterioridad). *Prevotella buccalis*, *P. veroralis* y *B. oralis* eran llamadas *B. oralis*. Todas se inhiben en el medio con 20% de bilis, son indol negativas, positivas para la hidrólisis de esculina y fermentan varios hidratos de carbono.¹⁰⁹ Las pruebas

diferenciales que ayudan a separar estas especies son la fermentación de salicina, amigdalina y xilano y la hidrólisis de almidón (cuadro 16-16). Si no producen pigmentos, *P. denticola* y *P. melaninogenicus* pueden ser fácilmente confundidas con *P. buccalis*, *P. veroralis* y *P. oralis*. Sin embargo, las tres especies anteriores fermentan celobiosa; *P. denticola* y *P. melaninogenicus* son celobiosas negativas. *P. oris* y *P. buccae* han sido aisladas en infecciones periodontales y varios otros sitios de infecciones humanas.¹¹³ Muchas cepas de estas especies antes se llamaban *B. ruminicola* (cepas humanas). Como *P. buccalis*, *P. veroralis* y *P. oralis*, *P. oris* y *P. buccae* se inhiben por bilis, son indol negativas y positivas para la hidrólisis de esculina, y fermentan glucosa más hidratos de carbono adicionales. La producción de ácido de arabinosa o xilosa separa *P. oris* y *P. buccae* de *P. oralis*.¹¹³ La fermentación de salicina ayuda a separar *P. buccae* y *P. oris* de *P. buccalis* y *P. veroralis*, que son salicina negativas. Una prueba que es positiva para la actividad β-glucosidasa por *P. buccae* pero negativa para *P. oris* ayuda a separar estas especies.¹⁰⁹ Las reacciones obtenidas usando el sistema RapiD-ANA II® también pueden ser útiles como un suplemento a las pruebas presentadas en el cuadro 16-16, para ayudar a diferenciar estas especies.⁵⁰

Bacteroides ureolyticus y otras especies asacarolíticas nitrato positivas. *Bacteroides ureolyticus* (antes *B. corrodens*) es un bacilo gramnegativo relativamente pequeño (casi 0,5 µm de diámetro por 1,5 a 2 µm de longitud), microaerófilo (sin embargo, antes se había pensado que era anaerobio), con requerimientos nutricionales especiales, que produce hoyuelos en el agar sangre para anaerobios. Esta especie debe reclasificarse. Las células no producen flagelos y no son móviles. Como característica, las colonias pueden ser de dos tipos: 1) de 0,5-1 mm de diámetro después de 2 días o más de incubación, circular, convexa y translúcida con bordes lisos o recortados, o 2) delgada, chata, extendida, colonias translúcidas irregulares hacia el exterior de un área central algo elevada. Este último tipo de colonia produce depresiones u “hoyuelos” dentro de la superficie del agar, que quizás se asemejan a la “corrosión” de las planchas de metal. *B. ureolyticus* se inhibe por penicilina (disco de 2 U), rifampicina (disco de 15 µg) y kanamicina (disco de 1 µg) y no se desarrolla en presencia de bilis al 20% ni fermenta ningún hidrato de carbono (es asacarolítico). *Campylobacter gracilis*, antes llamado *Bacteroides gracilis*,²⁴⁵ también es microaerófilo y desarrolla características similares a las de *B. ureolyticus*. Una prueba positiva para la actividad ureasa separa *B. ureolyticus* de *C. gracilis* y de especies similares de *Campylobacter* y *Wollinella succinogenes* (la única especie restante después que *W. curva* y *W. rectus* fueron reclasificadas como *Campylobacter curvus* y *C. rectus*), que son todos ureasa negativos. *C. gracilis* (*B. gracilis*) no forma flagelos y no es móvil, a diferencia de *C. curvus*, *C. rectus* y *W. succinogenes*. *C. rectus*, por ejemplo, es muy móvil (por medio de un único flagelo polar).¹²⁵ De acuerdo con un informe,¹¹⁶ *B. ureolyticus* fue el aislamiento más frecuente en infecciones leves de tejidos blandos superficiales o huesos. *C. gracilis* (*B. gracilis*), por el contrario, por lo común fue aislado en infecciones profundas “graves”, incluidas infecciones de cuello y cabeza, infecciones pleuropulmonares y lugares infectados dentro del abdomen y la pelvis. *B. ureolyticus* fue sensible en forma uniforme a varias penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos (entre ellos clindamicina, cloranfenicol, metronidazol e incluso aminoglucósidos), mientras que los aislamientos de *C. gracilis* por lo común fueron resistentes a penicilinas, cefalosporinas y clindamicina.¹¹⁶ Por lo tanto, es probable que *C. gracilis* sea un microorganismo más virulento para los seres

humanos que *B. ureolyticus* y su frecuente resistencia a los antibióticos puede contribuir a su importancia clínica. La importancia clínica de *C. concisus* y *C. recta*, que comparten algunas características con *B. ureolyticus* y *C. gracilis*, todavía no ha sido establecida.

Ejemplos de otras especies de *Bacteroides* o antiguas especies de *Bacteroides* cuya importancia clínica no sea bien conocida o establecida son *B. amylophilus*, *B. coagulans*, *B. eggerthii*, *B. hypermegas* (ahora *Megamonas hypermegas*), *B. multiaacidus* (ahora *Mitsuokella multiaacidus*), *B. nodosus*, *B. pneumosintes*, *B. praeacutus* (ahora *Tissierella praeacuta*), *B. putredinis*, *B. splanchnicus* y otras. La mayoría de estas especies se encuentran sólo rara vez en muestras clínicas humanas. Las características detalladas de estas y otras especies de *Bacteroides* poco conocidas pueden consultarse en el Manual VIP¹⁰⁷ y en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey.¹⁰⁹ Para una revisión excelente de su papel en las infecciones y de su sensibilidad a los antibióticos, véase Kirby y cols.¹³³

Especies de *Bilophila*. Baron y cols., durante un estudio de aislamiento bacteriano de muestras de apendicitis y heces humanas, aislaron un bacilo gramnegativo anaerobio nuevo particular en agar bilis esculina para *Bacteroides*.¹⁷ Se informó que esta nueva especie mostraba las características enumeradas en el recuadro 16-13.

Aunque *Bilophila wadsworthia* es similar a la especie del grupo *B. fragilis* y a ciertas especies de *Fusobacterium* que se desarrollan en presencia de 20% de bilis, varias de las propiedades fenotípicas de *Biophila wadsworthia* son diferentes de las del grupo *Bacteroides fragilis* y de las especies de *Fusobacterium*. *Biophila wadsworthia* difiere del grupo *B. fragilis* por su falta de fermentación de hidratos de carbono, su producción de ureasa y su falta de producción de una cantidad importante de ácido succínico. La producción de una considerable actividad de catalasa y su falta de producción de ácido butírico son características claves que separan *B. wadsworthia* de las especies de *Fusobacterium*.

Recuadro 16-13 Características las especies de *Bilophila*

Bacilo(s) gramnegativos, pleomorfos, no móviles, no formadores de esporas; 0,7-1,1 µm de ancho por 1-10 µm de longitud.
Desarrollo potenciado por 20% de bilis y por 1% de piruvato; crecimiento lento en bacteroides bilis esculina (BBE); las colonias en BBE después de 4 días de incubación se describieron como de 1 a 2 mm de diámetro, circulares, irregulares, umbilicales y translúcidas con centros oscuros, o como colonias negras opacas, poco convexas, irregulares.
Las colonias en agar *Brucella* formadas lentamente (4 a 7 días) eran punteadas, de menos de 1 mm de diámetro, circulares, irregulares, translúcidas y grises.
Catalasa fuertemente positiva (usando H₂O₂ al 15%).
Asacarolítica.
Ureasa positiva.
H₂S positiva, desulfoviridina positiva.
Nitrato positiva.
Negativa para la hidrólisis de esculina o almidón.
Indol negativa; no licua gelatina, no produce reacciones agar yema de huevo o leche; oxidasa negativa.
β-lactamasa negativa (prueba de la nitrocefina) pero, no obstante, resistente a los antibióticos β-lactámicos.
El acetato es el producto metabólico principal; no se detecta lactato; se producen cantidades menores o restos de succinato en glucosa-levadura-peptona (suplementado por piruvato).

Fusobacterium. El género *Fusobacterium* incluye varias especies de bacilos gramnegativos anaerobios no formadores de esporas que pueden diferenciarse de las especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Leptotrichia* por su producción de cantidades mayores de ácido butírico pero no de ácido isobutírico e isovalérico (fig. 16-10 y cuadro 16-15). Las especies de *Bacteroides* y *Porphyromonas* que producen ácido butírico también producen ácidos isobutírico e isovalérico. Históricamente, las especies de *Fusobacterium* tenían muchos otros nombres de género, como *Sphaerophorus*, *Fusiformis*, *Pseudobacterium*, *Ristella*, *Necrobacterium* y *Zuberella*.²²²

Aunque su nombre parecería sugerir que las fusobacterias son "fusiformes", sólo algunas de ellas lo son, la mayoría no; más bien son bacilos con lados paralelos y extremos redondeados (no aguzados). Crecen bien en agar sangre anaerobio en condiciones anerobias y mueren con facilidad por exposición al aire ambiente. La mayoría de las especies son o no fermentativas o fermentativas débiles.²²²

Las especies de *Fusobacterium* se encuentran normalmente en las vías respiratorias altas, el tracto digestivo y el aparato genitourinario humanos. Están involucradas en infecciones graves en distintos sitios del cuerpo.^{6,155} Se asocian con infecciones de la boca, heridas por mordedura y del aparato respiratorio, lo que no sorprende porque la boca es un hábitat importante. En algunos casos hospitalarios, las fusobacterias son comunes en los hemocultivos.⁵ Felner y Dowell⁶⁶ describieron 55 pacientes con bacteriemia por *Fusobacterium* (comparados con 196 casos de bacteriemia por *Bacteroides*). Henry y cols. publicaron una serie adicional de 26 casos de bacteriemia por *Fusobacterium*.⁹⁹ Bourgault y cols. informaron tasas de mortalidad significativas en las bacteriemias por *Fusobacterium*; 13 de 40 pacientes (32,5%) con hemocultivos positivos murieron.³⁰ En un estudio posterior, se identificaron 36 aislamientos de especies que incluyeron *F. nucleatum* (17 aislamientos), *F. necrophorum* (8 aislamientos), *F. mortiferum* (5), *F. varium* (3) y *F. gonidiaformans* (3). Los siguientes antibióticos fueron activos contra las 36 cepas: penicilina, piperacilina, cefoxitina, clindamicina, metronidazol e imipenem.³⁰

F. nucleatum y los miembros del grupo *Prevotella-Porphyromonas* son los microorganismos que con más frecuencia producen infecciones pleuropulmonares anaerobias (p. ej., neumonía por aspiración, absceso pulmonar, neumonía necrosante, empiema torácico). Las fusobacterias también son patógenos bastante comunes en abscesos cerebrales, sinusitis crónica, osteomielitis metastásica, artritis séptica, absceso hepático y otras infecciones intraabdominales.⁶

F. nucleatum es la especie encontrada con mayor frecuencia en materiales clínicos. Han llamado la atención en forma reciente las infecciones sistémicas causadas por *F. nucleatum* en pacientes con neutropenia y mucositis posteriores a la quimioterapia.^{36,65,143} El reconocimiento temprano de *F. nucleatum* en muestras clínicas, en particular durante el examen microscópico directo de líquidos corporales o exudados, puede ser importante. Las células en forma de huso son largas, con filamentos delgados y extremos afilados (lámina en color 16-1).¹⁶⁶ A veces hay protuberancias esféricas. Las células miden 5 µm a 10 µm de largo, pero a menudo se observan formas más cortas. Las colonias que se desarrollan en agar sangre para anaerobios tienen un diámetro de 1 a 2 mm, son levemente convexas con bordes algo irregulares y tienen una mancha característica denominada "estructura cristalina interna" por J. A. Siders y "mancha opalescente", por G. L. Lombard (lámina en color 16-1). *F. nucleatum* es relativamente inactivo desde el punto de vista bioquímico (cuadro 16-12). Sobre la base de patrones

electroforéticos de proteínas de la célula íntegra y estudios de homología de DNA, en 1990 se sugirió que *F. nucleatum* se subdividiera en tres subespecies: *F. nucleatum* subespecie *nucleatum*, *F. nucleatum* subespecie *polymorphum* y *F. nucleatum* subespecie *vincentii*.⁵⁷ En 1992, Gharbia y Shah propusieron que se debían reconocer otras dos subespecies: *F. nucleatum* subespecie *fusiforme* y *F. nucleatum* subespecie *animalis*.⁸² En la actualidad, los métodos fenotípicos tradicionales no diferencian entre estas subespecies y tampoco es clínicamente importante su distinción.

F. necrophorum puede causar infecciones graves (p. ej., absceso hepático) y no es inusual que se aísle solo (en cultivo puro) en lesiones de los tejidos blandos.^{6,222} Varios informes recientes han atraído la atención hacia el síndrome de Lemierre potencialmente mortal o la septicemia posangina, una enfermedad supurativa grave causada por este microorganismo.^{25,194,198,237} El síndrome de Lemierre, también llamado "necrobacilosis", sucede en su mayoría en personas de entre 12 y 25 años. Casi todos los pacientes carecen de factores predisponentes y antes eran sanos. La afección se caracteriza por infección orofaríngea (p. ej., amigdalitis, absceso periamigdalino o absceso faríngeo) seguido de septicemia anaerobia y complicaciones metastásicas, que con frecuencia involucran los pulmones o las grandes articulaciones y, con menor frecuencia, las meninges.⁸⁹ Los hallazgos comunes con diseminación metastásica hacia los pulmones son abscesos pulmonares y empiema torácico. Este síndrome debe ser sospechado en especial en pacientes jóvenes en los que se desarrolla tromboflebitis séptica de la vena yugular interna. Desde 1980, la mortalidad en los pacientes tratados ha sido cercana al 18%, pero sin antibióticos es > 50%. Por fortuna, *F. necrophorum* es sensible in vitro a metronidazol, clindamicina, cloranfenicol, imipenem y a casi todos los β -lactámicos, incluida la penicilina G y las penicilinas más nuevas, así como las cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, la eritromicina sólo es activa en forma moderada, muchas cepas del microorganismo son resistentes a las tetraciclinas, y es resistente a aztreonam, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos.^{40,89}

Las células de *F. necrophorum* miden cerca de $0,6 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ y son pleomorfas, a menudo con formas curvadas y áreas esféricas en su interior (lámina en color 16-1). Como *F. mortiferum* (tratado más adelante), también producen corpúsculos cocoides libres que, en el examen directo, a veces se asemejan a leucocitos degradados. La mayoría de las cepas producen lipasa en agar yema de huevo LD. *F. necrophorum* ha sido dividido en tres variedades (o "biovariedades" A, B y C). En 1990, se propuso una especie nueva, *Fusobacterium pseudonecrophorum* para *F. necrophorum* biovariedad C.²¹⁶ *F. necrophorum* es patógeno, productor de abscesos hepáticos en ratones y es sensible a la penicilina (500 U/mL), mientras que la especie nueva no produce abscesos en ratones y es muy resistente a la penicilina (500 U/mL).

Las cepas de *F. mortiferum* y *F. varium* a menudo son resistentes a la clindamicina,^{6,135} y pueden producir β -lactamasa.⁷⁰ Las células miden $0,5\text{--}2 \mu\text{m}$ de ancho por $2\text{--}10 \mu\text{m}$ de largo, son muy pleomorfas, cocoides a filamentosas, con espirales esféricas cerca del centro o un extremo de los bacilos teñidos en forma desigual. Las colonias en agar sangre son de 1 a 2 mm de diámetro y tienen una apariencia característica en forma de huevo frito, con centros elevados, opacos, y bordes chatos y translúcidos. *F. mortiferum* y *F. varium* son resistentes a la rifampicina (disco de $15 \mu\text{g}$), lo que ayuda a separarlas de otras especies de *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* y *Prevotella*. Estas dos especies *Fusobacterium* se pueden dife-

renciar con pruebas para la hidrólisis de esculina y fermentación de lactosa (cuadro 16-12).

Rara vez se pueden encontrar otras especies de *Fusobacterium* en infecciones. Las características de *F. gonidiaformans* y *F. naviforme* obtenidas usando el sistema de placa Presumpto se observan en el cuadro 16-12. Se recomiendan las siguientes referencias para conocer características complementarias de estas y de otras especies.^{6,41,124,125,155}

Identificación de cocos anaerobios

Los cocos anaerobios son el segundo grupo más común de anaerobios encontrados en infecciones humanas; los primeros son los bacilos gramnegativos (cuadro 16-3). Del mismo modo que los bacilos gramnegativos anaerobios, se encuentran con frecuencia en el laboratorio clínico en hemocultivos, en otros líquidos corporales y en una amplia variedad de muestras de abscesos y heridas. En la octava edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, los cocos grampositivos anaerobios fueron clasificados en la familia *Peptococcaceae* en los siguientes géneros: *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* y *Sarcina*.¹³⁴ Los cocos anaerobios gramnegativos fueron enumerados en tres géneros en la familia *Veillonellaceae* como sigue: *Veillonella*, *Acidaminococcus* y *Megasphaera*. Más tarde, en 1974, Holdeman y Moore propusieron agregar un género nuevo, *Coprococcus*, a la familia *Peptococcaceae*.¹¹¹ También sugirieron dos especies nuevas de *Ruminococcus* y una especie nueva de *Streptococcus*. Recomendaron la transferencia de *Peptostreptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus morbillorum* y *Peptococcus constellatus* al género *Streptococcus*, porque estas especies producen ácido láctico como el principal y único producto metabólico. En 1981, *Peptococcus saccharolyticus* fue transferido al género *Staphylococcus*.¹³¹ Por lo tanto, *S. saccharolyticus* se considera una especie anaerobia del género *Staphylococcus*. En 1983, se hicieron grandes cambios en la clasificación taxonómica de los cocos anaerobios, basados en los datos del porcentaje de guanina más citosina (G + C) y en los estudios de homología del DNA de Ezaki y cols.⁶³ Excepto *Peptococcus niger*, todas las antiguas especies del género *Peptococcus* fueron transferidas al género *Peptostreptococcus*. Luego, en 1994, Ezaki y cols. determinaron las secuencias 16S rDNA de todas las especies de *Peptostreptococcus* e informaron que los miembros del género debían ser divididos en cinco grupos filogenéticos diferentes; en 1994 transfirieron las especies antes llamadas *Peptostreptococcus productus* y *Streptococcus hansenii* al género *Ruminococcus*.⁶² Ambas son miembros de la microflora fecal humana, pero son raras en muestras clínicas.

Desde 1999, se han hecho muchos cambios en el género *Peptostreptococcus*, incluida la transferencia de todas menos una especie a cinco géneros nuevos (cuadro 16-2).^{61,182} La única especie remanente de *Peptostreptococcus* es *P. anaerobius*.¹⁸³ Los antes llamados *P. magnus* y *P. micros*⁶¹ ahora son *Finegoldia magna* y *Micromonas micros*, respectivamente.¹⁸² Los llamados *Peptostreptococcus hydrogenalis*, *P. lactolyticus*, *P. octavius*, *P. prevotii*, *P. tetradius* y *P. vaginalis* todavía tienen los mismos nombres de especies, pero ahora son miembros del género *Anaerococcus*.⁶¹ Otras especies denominadas *Peptostreptococcus* *asaccharolyticus*, *P. hareii*, *P. indolicus*, *P. ivorii* y *P. lacramaris* retuvieron sus nombres de especie, pero fueron movidas al nuevo género *Peptoniphilus*.⁶¹

Se propuso un género nuevo con una especie única: *Gallicola barnesae*; ha sido aislada en heces de pollos, pero no se tratará más adelante porque no se han informado fuentes

humanas.⁶¹ Tampoco se tratará una especie aislada en el rumen de oveja: *Slackia heliotrinireducens* (antes *Peptostreptococcus heliotrinireducens*).²⁴⁷

Además, el ex *Peptostreptococcus parvulus* es ahora *Atopobium parvulum*.⁴⁶ Esta especie ha sido aislada en el surco gingival humano. Se conoce poco acerca del significado clínico de ésta y de otras especies de *Atopobium* (cuadro 16-2). Otros estreptococcus anaerobios o microaerófilos son *Streptococcus intermedius* y *S. pleomorphus*. Los antes llamados *Streptococcus morbillorum* ahora son *Gemella morbillorum*.¹³²

Los cocos gramnegativos anaerobios se clasifican en la familia *Veillonellaceae*.¹⁹⁹ Durante un largo período tres géneros—*Veillonella*, *Acidaminococcus* y *Megasphaera*—han sido miembros de la familia, pero en 2002 se describió un cuarto género (*Anaeroglobus germinatus*).³⁷ Antes de 1982, *V. parvula* era la única especie reconocida de *Veillonella*. En ese año se propusieron otras seis especies: *V. dispar*, *V. atypica*, *V. rodentium*, *V. ratti*, *V. criceti* y *V. caviaei*.¹⁷¹ En 2004, se aisló una nueva especie de *Veillonella* en muestras humanas: *V. montpellierensis*.¹²⁶ Se carece de información sobre su importancia clínica.

Las especies de *Veillonella* son parte de la microflora de la boca, vías respiratorias altas, intestino y aparato genitourinario. *Acidaminococcus* habita en el intestino grueso de los seres humanos. Los hábitats principales de las especies de *Megasphaera* son el intestino grueso y el aparato genitourinario humanos, así como el rumen del ganado.²²² La única cepa de *Anaeroglobus germinatus* descrita fue aislada con una mezcla de otras bacterias en el líquido posoperatorio recogido 27 días después de una gastrectomía y anastomosis esofagoyeyunal en una mujer de 70 años.³⁷ No se conoce su hábitat ni su significado clínico.

Veillonella parvula permanece como la especie más común de todos los cocos gramnegativos anaerobios en muestras humanas recolectadas de modo apropiado. Se ha encontrado como agente causal en endocarditis potencialmente mortales,^{26,192} bacteriemia^{73,150} y en infecciones polimicrobianas en las que el papel patógeno es incierto.⁶

Los géneros mencionados de cocos gramnegativos y grampositivos anaerobios pueden ser parte de la flora normal de varios sitios en seres humanos y en animales; sólo las especies enumeradas en el cuadro 16-3 se encuentran con alguna frecuencia significativa en muestras clínicas procesadas y recolectadas en forma adecuada. Las características identificatorias de las especies encontradas con mayor frecuencia se presentan en los cuadros 16-17 y 16-18. Se recomiendan las siguientes referencias para más información.^{37,61,107,125,199,222} En la figura 16-12 se muestra un trazado cromatográfico típico de ácido volátil de *Peptostreptococcus anaerobius*.

La sensibilidad a los antibióticos in vitro de los cocos anaerobios se describió en otro sitio.^{135,181} De acuerdo con las pautas recientes, los antibióticos de elección para el tratamiento empírico de los pacientes con infecciones por cocos anaerobios son penicilina (p. ej., penicilina G, ampicilina, amoxicilina) y clindamicina.^{18,169} Varias cepas de *P. anaerobius* son resistentes a la penicilina G. El metronidazol es activo contra más del 90% de los cocos anaerobios obligados, pero no contra la mayoría de las cepas de estreptococos microaerófilos (p. ej., *Streptococcus intermedius*).¹³⁵ Otros compuestos activos in vitro contra la mayoría de los cocos anaerobios son cloranfenicol, imipenem, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y cefoxitina, pero no cefoperazona, cefotaxima o cefotetán.¹³⁵ Entre los compuestos que se muestran promisorios contra los cocos anaerobios grampositivos se incluyen algunas de las fluoroquino-

lonas más nuevas (p. ej., moxifloxacino, gatifloxacino), quinupristina/dalfopristina y linezolid.^{18,169} Las especies de *Veillonella* son resistentes a la vancomicina y a algunas de las quinolonas. Los antibióticos que no son activos contra los cocos anaerobios son los aminoglucósidos, aztreonam y trimetoprim-sulfametoxazol.^{18,169}

Identificación de bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas

En este grupo de anaerobios se incluyen las especies del género *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eggerthella*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter* y muchas otras.^{6,67,125,177} En el cuadro 16-2 se provee una lista extensa de los cambios recientes en la taxonomía de estas bacterias. Algunas características diferenciales claves de las especies de bacilos grampositivos, no formadores de esporas se presentan en los cuadros 16-19 y 16-20. La morfología microscópica y las características de las colonias de *Actinomyces israelii* y *Eggerthella lenta* (antes *Eubacterium lentum*) se muestran en la lámina en color 16-2.

La identificación de los bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas requiere el uso de CGL para el análisis de productos metabólicos. La morfología celular de muchos de esos microorganismos tiende a variar con el tipo de medio de cultivo y las condiciones de desarrollo. A veces pueden ser confundidos con otros géneros, como *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Listeria*, *Nocardia*, *Peptostreptococcus* y *Streptococcus*. Así, los resultados de CGL y las características morfológicas, consideradas juntas, ayudan a la diferenciación práctica (cuadros 16-9 y 16-19).

A veces algunas cepas de bacilos anaerobios se asemejan a cocos, en particular en preparaciones teñidas con Gram en colonias jóvenes de agar sangre. Además, algunos estreptococos, como *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. constellatus* y *Gemella morbillorum* y ciertos peptoestreptococos, pueden aparecer en forma de bacilos cuando se observan con el microscopio células de colonias en agar sangre. Por otro lado, estas bacterias suelen formar cadenas largas de células en caldo tioglicolato enriquecido y en otros medios líquidos. Cabe recordar que muchas bacterias grampositivas tienden a volverse gramnegativas con la edad. También algunos clostridios (p. ej., *C. perfringens*, *C. ramosum* y *C. clostridioforme*) no producen esporas en los medios habituales usados en el laboratorio clínico, mientras que otros lo hacen a medida que envejecen. Por lo tanto, las preparaciones teñidas con Gram de cultivos muy jóvenes pueden ser una ayuda para la demostración de la variabilidad de Gram y la observación de frotis de cultivos viejos puede ayudar en la demostración de esporas de los clostridios.

ESPECIES DE *PROPIONIBACTERIUM*

Propionibacterium acnes es con mucho el bacilo anaerobio formador de esporas grampositivo encontrado con mayor frecuencia en muestras clínicas. Es parte de la flora normal de la piel, la nasofaringe, la cavidad bucal, y los aparatos gastrointestinal y genitourinario. Como miembro predominante de la microflora cutánea y habitante del aparato glandular de los folículos pilosos/sebáceos, *P. acnes* es un contaminante frecuente de los hemocultivos. Sin embargo, en ocasiones causa endocarditis, infecciones de derivaciones de líquido cefalorraquídeo del sistema nervioso central y otras infecciones. *P. avidum* y *P. granulosum* rara vez se encuentran en el laboratorio clínico y por lo general no son clínicamente significativos. Las células

Cuadro 16-17 Algunas característica claves de los cocos anaerobios aislados con frecuencia en muestras clínicas

ESPECIE	REACCIÓN DE GRAM	PIGMENTO NEGRO	INDOL	NITRATO	COAGU- LASA	UREASA	INHIBICIÓN POR SPS	FOSFATASA ALCALINA	FERMENTACIÓN DE			PRODUCTOS METABÓLI- COS ÁCIDOS EN PYG, 48 HORAS A 35 °C
									Glucosa	Lactosa	Maltosa	
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	NP	-	A, B
<i>A. prevotii</i>	+	-	-	+/+	-	-/+	-	+	-	-	-	A, (P), B
<i>A. tetradius</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+ ^a	-	+	A, B
<i>Finegoldia magna</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
<i>Gemella morbillorum</i>	+	-	-	-	-	-	-	NP	+	-	d	A, L
<i>Micromonas micros</i> ^b	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	A
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A, (P), B
<i>P. indolicus</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	A, (P), B
<i>Peptococcus niger</i>	+	+	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	A, (P), IB, B, IV, (V), C
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	d/-	-	d/-	A, (IB), (B), (IV), IC
<i>Ruminococcus productus</i>	+	-	-	-	-	-	-	NP	+	+	+	A
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	+	-	-	+	-	-	-	NP	+	-	-	A
<i>Streptococcus intermedius</i>	+	-	-	-	-	-	-	NP	+	+	+	A, L
Especies de <i>Veillonella</i>	-	-	-	+	-	-	-	NP	-	-	-	A, P

^a Las cepas de *A. tetradius* pierden su capacidad de fermentar azúcares en forma rápida después de subcultivarlos de modo que no es infrecuente que estas reacciones sean negativas.

^b La mayoría de las cepas de *M. micros* producen una muy leve β-hemólisis en agar sangre para anaerobios de los CDC (Remel, Lenexa, KS), que ayuda a distinguirlas de *F. magna* (Allen y Siders: datos no publicados). SPS, polianetol sulfonato de sodio; +, reacción positiva; -, reacción negativa; d, fermentador débil; +/-, cepas positivas ocasionales; d/-, la mayoría de las cepas fermentadoras débiles, con cepas negativas ocasionales; A, ácido acético; P, ácido propiónico; IB, ácido isobutírico; B, ácido butírico; IV, ácido isovalérico; V, ácido valérico; IC, ácido isocaproico; C, ácido caproico; L, ácido láctico; (), ácido variable; NP, no probado.

Cuadro 16-18 Reacciones de cocos anaerobios en medios diferenciales de agar de los CDC

ESPECIE	N° DE CEPAS EXAMINADAS	PLACA PRESUMPTO 1							PLACA PRESUMPTO 2				PLACA PRESUMPTO 3			
		Indol	Hidrólisis de esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinasa	Lipasa	Crecimiento en agar bilis	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de almidón	Proteólisis de leche	DNasa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación de manitol	Fermentación de lactosa	Fermentación de ramnosa
<i>Anaerococcus prevotii</i>	15	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Finegoldia magna</i>	21	-	-	-	-/+	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micromonas micros</i>	1	-	-	-	-	-	-	SC	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	22	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	21	-	-	V	-	-	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	2	-	-	-	+	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus intermedius</i>	9	-	+	-	-	-	-	I	+	-	-	-	-	-	+	-
Especies de <i>Veillonella</i>	6	-	-	-	-/+	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-

+, reacción positiva en > 90% de las cepas; -, reacción negativa > 90% de las cepas; -/+, la mayoría de las cepas negativas, cepa positiva ocasional; I, crecimiento inhibido; V, variable; SC, sin crecimiento.
Adaptado de Whaley DN, Wiggs LS, Miller PH, Srivastava PU, Miller JM. Use of Presumpto plates to identify anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 1995; 33: 1196-1202, y ediciones previas de este libro.

de *P. acnes* miden de 0,3-1,3 μm de diámetro $\times$ 1-10 μm de largo.²²² Su morfología se describió como de apariencia difteroide. Las células son marcadamente pleomorfas y se encuentran en formas y tamaños variados, que van desde cocoides hasta bacilos definidos. Las células a menudo se tiñen en forma desigual por el procedimiento de Gram. Del mismo modo que las corinebacterias, las células tienen una morfología de letras chinas, de "pájaros en vuelo" y de estacas aguzadas, se presume que debido a un movimiento súbito después de su división. *P. acnes* se desarrolla como un anaerobio obligado; sin embargo, algunas cepas muestran un desarrollo escaso en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela (pero su crecimiento es mejor en anaerobiosis) y se las describió como aerotolerantes o microaerófilas. Las colonias de *P. acnes* en agar sangre para anaerobios son de 1 a 2 mm de diámetro, circulares, de bordes lisos, convexas, brillantes y opalescentes. Algunas cepas producen una zona estrecha de hemólisis. El análisis de productos metabólicos ácidos de cadena corta por CGL revela la producción de una importante cantidad de ácido propiónico, una cantidad menor de ácido acético y sólo una pequeña cantidad de ácido isovalérico [aP(iv)]. *P. acnes* puede ser reconocido sin el uso de CGL cuando produce indol y catalasa. Sin embargo, no todas las cepas producen indol ni todas producen catalasa. Además, *Actinomyces viscosus*, que tiene una morfología similar en algunos medios, produce catalasa.

Propionibacterium propionicum. En 1988, *Arachnia propionica* fue reclasificada como *Propionibacterium propionicum*.³⁹ Con anterioridad, el nombre *Arachnia propionica* había sido creado para acomodar las bacterias una vez llamadas *Actinomyces propionicus*. Esta especie, mientras su patogenicidad y sus características morfológicas se asemejan a las de ciertas especies de *Actinomyces*, difiere de las especies de *Actinomyces* por la producción de ácido propiónico como producto metabólico principal y por su contenido de mureína y composición de menaquinona de la pared celular que se asemeja a los de las especies de *Propionibacterium*. *Propionibacterium propionicum* todavía debe considerarse un posible agente etiológico de actinomicosis. Los microorganismos han sido incriminados en casos de actinomicosis cervicofacial, formación de absceso pulmonar con empiema torácico o no, un absceso de cuello, una infección de herida de dedo seguida a una mordedura humana, un absceso renal y unos pocos casos de canalculitis lagrimal.³³ Este microorganismo es morfológicamente indistinguible, en tejidos y en cultivos, de *Actinomyces israelii*. *P. propionicum* y *A. israelii* forman bacilos "difteroides" pleomorfos y filamentos ramificados, largos (descritos con más detalle en la sección de especies de *Actinomyces*). Ambas especies son microaerófilas a anaerobias y crecen en forma óptima en condiciones anaerobias.

ESPECIES DE BIFIDOBACTERIUM

En la actualidad, se reconocen más de 30 especies del género *Bifidobacterium* y la mayoría habita los intestinos humanos y de algunos animales.¹¹⁴ Algunos cambios recientes en este grupo incluyen la transferencia de *B. inopinatum* al género *Scardovia* como *Scardovia inopinata* y la de *B. denticolens* a *Parascardovia* como *Parascardovia denticolens*.¹¹⁵ Con la excepción de *Bifidobacterium dentium*, ninguna bacteria del género *Bifidobacterium* parece patógena para los seres humanos.⁶ *Bifidobacterium dentium* ahora incluye los antes llamados *Actinomyces eriksonii* y más tarde *Bifidobacterium eriksonii*. Es parte de la microflora normal de la boca y del tubo digestivo y se ha encontrado en infecciones polimicrobianas de las vías respiratorias bajas. La morfología de *B. dentium* es a veces

similar a la de *Actinomyces*, pero difiere en que no produce filamentos ramificados en medio de tioglicolato. Los frotis teñidos de Gram preparados a partir de medios sólidos o cultivos en caldo muestran formas difteroides grampositivas que son mucho más variables en forma y tamaño que *P. acnes*. Las células varían de formas cocoides a alargadas, a menudo curvadas, con extremos engrosados característicos o formas bifidas que habitualmente se observan en *B. dentium*. En el análisis de los productos metabólicos ácidos de cadena corta por GLC, las bifidobacterias producen cantidades importantes de ácidos acético y láctico.

ESPECIES DE LACTOBACILLUS

Las especies de *Lactobacillus* son parte de la microflora de la cavidad bucal, la faringe, el tubo digestivo y el aparato genitourinario (en especial, la vagina) humanos; a veces se encuentran en muestras clínicas. A menudo es difícil asignar importancia patógena a la mayoría de las cepas aisladas en el laboratorio; sin embargo, las especies de *Lactobacillus* han sido informadas en varios casos de endocarditis bacteriana, meningitis, bacteriemia clínicamente significativa, peritonitis, abscesos y otras infecciones potencialmente mortales. Aunque la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* no son anaerobias estrictas, muchas crecen mejor en anaerobiosis. Las características que ayudan al reconocimiento de los lactobacilos son su desarrollo en un medio selectivo de agar jugo de tomate de Rogosa a pH relativamente bajo (Becton Dickinson Microbiology Systems), su reacción catalasa negativa, su tendencia a formar cadenas de bacilos grampositivos bastante uniformes y su producción de ácido láctico como producto principal con sólo una pequeña cantidad de acetato (detectada usando GLC). La identificación de los lactobacilos más allá de un nivel presuntivo es dificultosa y escapa al alcance de este libro. Es notable que los lactobacilos sean resistentes a la vancomicina. Para más información sobre la identificación y la sensibilidad a los antibióticos de las especies de *Lactobacillus*, véase el capítulo 14.

ESPECIES DE ACTINOMYCES

En los últimos años, se han efectuado numerosas revisiones taxonómicas dentro del género *Actinomyces* (cuadro 16-2). Entre estos cambios están la designación de varias especies nuevas y adicionales que incluyen *A. cardiffensis*,⁹⁰ *A. europaeus*,^{74,203} *A. funkei*,¹⁴⁶ *A. georgiae*,¹¹⁷ *A. gerencseriae*,¹¹⁷ *A. graevenitzii*,¹⁹⁵ *A. hongkongensis*,²⁶⁵ *A. nasicola*,⁹³ *A. neuui*,^{75,76,165} *A. oricola*,⁹² *A. radidentis*,^{43,128,219} *A. radingae*,²⁶⁶ *A. turicensis*,^{203,246} y *A. urogenitalis*.¹⁸⁷ Otros géneros relacionados con el género *Actinomyces* son *Actinobaculum* (p. ej., *Actinobaculum schaalii* y *A. urinale*)^{91,145} y *Arcanobacterium* (p. ej., *Arcanobacterium bernardiae* y *A. pyogenes*).¹⁹⁶ El informe de Clarridge y cols. ayuda a comprender la importancia de varias especies recién descritas.⁴² Aunque las especies nuevas listadas en el cuadro 16-2 han sido aisladas en varias fuentes clínicas humanas, todavía falta información sobre muchas de ellas, así como respecto de su importancia clínica.¹⁷⁰

Las bacterias que se han informado como agentes causales de actinomicosis humana son *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae*, *A. viscosus*, *A. meyeri*, *A. georgiae*, *A. neuui* subespecie *neuui*, *P. propionicum* y *B. dentium* (incluye, en parte, los antes llamados *B. eriksonii*).^{193,206,222} Estas bacterias son parte de la flora normal de la boca y muchas de ellas se pueden encontrar en el aparato genitourinario. *A. is-*

raelii es la especie más común en infecciones clínicas. Sin embargo, la actinomicosis (con lesiones en los tejidos) es rara en la actualidad. En frotis con tinción de Gram preparados a partir de lesiones, se pueden observar gránulos de azufre característicos, que son microcolonias granulares del microorganismo rodeadas por exudado purulento. Las células de *A. israelii* son bacilos grampositivos, por lo general de 1 µm de diámetro, pero muy variables en longitud. Las células pueden ser bacilos difteroides cortos, en forma de clava, filamentos ramificados o no ramificados (lámina en color 16-2). En agar sangre a menudo desarrollan colonias rugosas compuestas por bacilos ramificados o filamentos. Las colonias jóvenes (de 2 a 3 días), cuando se observan con microscopio de disección, aparecen como filamentos radiados delgados conocidos como "colonias de arañas". Cuando las colonias alcanzan los 7 a 14 días de incubación, a menudo son elevadas, apiladas, blancas, opalescentes y brillantes; tienen bordes irregulares o lobulares, y se llaman colonias en forma de "molar" (lámina en color 16-2). Sin embargo, las cepas lisas (cerca de un tercio de *A. israelii*) producen colonias en forma más rápida que las cepas rugosas. Las cepas lisas pueden producir colonias de 1 a 2 mm de diámetro, circulares, algo elevadas, blancas, opalescentes, lisas, brillantes después de sólo 2 a 3 días de incubación. *A. naeslundii* también puede producir colonias lisas o rugosas. Las colonias de *A. viscosus* son en su mayoría de 0,5 a 2 mm de diámetro, enteras, convexas, grisáceas y translúcidas. En las colonias de *A. odontolyticus* puede aparecer un color rojo en agar sangre después de 7 a 14 días de incubación anaerobia o después de que las placas se han dejado al aire y a la temperatura ambiente durante varios días. Como ya se mencionó, las características celulares y de las colonias de *Propionibacterium propionicum* son similares a las de los otros *Actinomyces*.

Además de la morfología, las características de la colonia y los productos metabólicos, las características útiles para la identificación de los actinomicetos incluyen la relación con el oxígeno, la aparición y rapidez de desarrollo en medio de tioglicolato enriquecido, la producción de indol, la hidrólisis de gelatina y esculina, la fermentación de ciertos hidratos de carbono, los resultados de la evaluación con varias pruebas enzimáticas rápidas, la secuenciación de 16S rRNA y otros métodos moleculares. Se recomiendan las siguientes referencias para más información respecto de la caracterización e identificación de las cepas más allá de las indicadas en los cuadros 16-19 y 16-20.^{42,125,177,205}

ESPECIES DE *EUBACTERIUM*

Las especies de *Eubacterium* son bastante comunes en heridas y abscesos, en los que por lo general están mezcladas con otras bacterias. Su importancia patológica en muestras clínicas suele ser incierta.²²² Sin embargo, como lo sugirieron Mascini y Verhoef,¹⁷⁰ las especies de *Eubacterium* han sido informadas, aunque rara vez, como causa de bacteriemia, endocarditis y otras infecciones potencialmente mortales. Las especies aisladas con mayor frecuencia en muestras clínicas durante mucho tiempo fueron *E. lentum* (ahora *Eggerthella lenta*) y *E. limosum*. En los cuadros 16-19 y 16-20 se brinda información para la identificación presuntiva de las especies de *Eubacterium* más comunes.

Como lo informaron Wade y cols., durante muchos años ignorados, el género *Eubacterium* fue considerado heterogéneo y contenía muchas especies no relacionadas.²⁴⁷ Sobre la base de los resultados de las determinaciones de la secuencia génica de 16S rRNA y otros datos, el género en la actualidad está

sufriendo una revisión taxonómica importante. Así, *E. lentum* fue transferida al género *Eggerthella* como *Eggerthella lenta*, mientras *E. limosum* continuó el tipo de especie del género *Eubacterium*.²⁴⁷ En el cuadro 16-2 se enumeran otros numerosos cambios, como la transferencia de *Eubacterium aerofaciens* al género *Collinsella* como *Collinsella aerofaciens*.¹²⁷ Además, el microorganismo llamado *Eubacterium formicigenerans* es ahora *Doria formicigenerans*,²³⁶ la especie antes llamada *E. timidum* ahora es *Mogibacterium timidum*⁹⁴ y la especie conocida como *E. alactolyticum* es *Pseudoramibacter alactolyticus*.²⁶³

Se describieron otros géneros de bacilos grampositivos no formadores de esporas, entre ellos, *Cryptobacterium*, *Bulleidia*, *Atopobium*, *Slackia*, *Holdemania* y *Catenibacterium*, pero su importancia clínica aún se desconoce.^{170,176}

MOBILUNCUS Y VAGINOSIS BACTERIANA

Mobiluncus, junto con otros anaerobios, está presente en muestras vaginales de mujeres con vaginitis inespecífica (vaginosis bacteriana).^{104,177,230} En 1984, Spiegel y Roberts propusieron el nombre *Mobiluncus* para un género nuevo de bacilos anaerobios no formadores de esporas, curvados, móviles, gramnegativos o gramvariables, que se encuentran solos o en pares con una apariencia de "alas de gaviota".²³¹ Mediante la microfotografía electrónica se observaron paredes celulares con capas múltiples sin membrana externa, probablemente más típicas de paredes celulares grampositivas que de gramnegativas; no obstante, los microorganismos tienden a ser gramvariables en los cultivos jóvenes y gramnegativos en los cultivos viejos. El nombre *Mobiluncus* derivó de las palabras latinas *mobilis* (que significa capaz de movimiento) y *uncus* (gancho).²³¹ El potencial patológico de las especies de *Mobiluncus*, si existe alguno, todavía no está claro. Se aisló en pacientes con infecciones extragenitales en pocas ocasiones y existe un caso informado de su aislamiento en un paciente con sepsis grave.^{83,102} El microorganismo es uno de los muchos géneros de anaerobios que colonizan la vagina tanto sana como enferma.¹⁷⁷

La vaginosis bacteriana implica un sobrecrecimiento de bacterias múltiples, incluidas *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, especies de *Mobiluncus*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, otras especies de *Prevotella*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *P. magnus* y otros cocos anaerobios, más bacilos grampositivos anaerobios como las especies de *Propionibacterium*.^{103,104,230} Por lo tanto, es probable que la vaginosis sea una infección sinérgica en la que participan muchos microorganismos. Como se repasó en otro lugar,²²⁵ el diagnóstico de vaginosis bacteriana se basa en la demostración de tres de los siguientes cuatro criterios: 1) secreción vaginal "fluida" (pero profusa), 2) pH mayor de 4,5, 3) olor que por lo común se describe como "a pescado" (en especial después de agregar hidróxido de potasio al 10%), y 4) detección de "células clave" en el examen microscópico.

Las "células clave" son células epiteliales pavimentosas de la vagina con un gran número de bacilos pequeños adheridos a su superficie. Se las puede observar en preparados húmedos o en frotis con tinción de Gram (o en preparaciones teñidas con Papanicolaou).

Las especies de *Mobiluncus* crecen en varios tipos de medios no selectivos en placa, incluidos agar sangre para anaerobios (p. ej., infusión de cerebro y corazón, *Brucella* y medio base de agar sangre para anaerobios de los CDC) y agar chocolate. Después de 3 a 5 días de incubación, las colonias son de 2 a 4 mm de diámetro, incoloras, translúcidas, lisas y chatas, a veces con

Cuadro 16-19 Características diferenciales de bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas

ESPECIE	RELACIÓN CON EL OXÍGENO	RAPIDEZ DE CRECI- MIENTO	COLONIAS EN AGAR SANGRE	PIGMENTO ROJO EN AGAR SANGRE	APARIENCIA EN CALDO TIOGLICOLATO ENRIQUECIDO	MORFOLOGÍA CELULAR EN CALDO TIOGLICOLATO ENRIQUECIDO	REDUC- CIÓN DE NITRATO	PRODUCTOS METABÓLICOS EN CALDO PYG, 48 HORAS A 35 °C
<i>Actinomyces israelii</i>	M o AO	Lento	Rugosas	–	Granular o difusa	Filamentos ramificados o difteroides	V	A, L, S
<i>A. naeslundii</i>	F	Moderado	Lisas	–	Difusa	Difteroide, ramificada	+/-	A, L, S
<i>A. odontolyticus</i>	M o AO	Moderado	Lisas	+	Difusa	Difteroide, ramificada	+	A, L, S
<i>A. viscosus</i>	F	Rápido	Lisas	–	Difusa	Difteroide, ramificada	+	A, L, S
<i>A. meyeri</i>	AO, F		Lisas	–	Difusa	Difteroide, ramificada	–	A, L, S
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	F		Lisas	–	Difusa	Difteroide, cocoide	–	A, L, S
<i>Bifidobacterium dentium</i>	AO	Rápido	Lisas	–	Difusa	Bacilos delgados, extremos bifidos, extremos bulbosos	–	A, L
<i>Eggerthella lenta</i>	AO	Moderado	Lisas	–	Difusa	Bacilos cocoides cortos, difteroides	V	A
<i>Eubacterium limosum</i>	AO	Rápido	Lisas	–	Difusa	Bacilos pletóricos, bifidos y bulbosos	V	A, B (los que producen ácido a partir de un caldo que no contiene glucosa son A, IB, B, IV)
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	AO	Rápido	Lisas	–	Difusa (granular)	Bacilos cortos en cadenas o solos	–	A, L
<i>Propionibacterium avidum</i>	F	Rápido	Lisas	–	Difusa	Difteroides	V	A, P
<i>P. acnes</i>	AO F ^F	Moderado	Lisas	–	Difusa (granular)	Difteroides	+	A, P
<i>P. granulosum</i>	F	Rápido	Lisas	–	Difusa	Difteroides	–	A, P
<i>P. propionicum</i>	M o AO	Lento	Rugosas	–	Granular o difusa	Filamentos ramificados o difteroides	+	A, P
<i>Pseudoramibacter alactolyticum</i>	AO	Lento	Lisas	–	Difusa	Bacilos delgados, en forma de V, entre- cruzados	–	A, B, C

+, reacción positiva para el 90-100% de las cepas probadas; –, reacción negativa para el 90-100% de las cepas probadas, superíndice, reacción observada en el 11-25% de las cepas probadas; V, reacción variable; paréntesis, variable; F, anaerobio facultativo; M, microaerófilo; AO, anaerobio obligado; A, ácido acético; B, ácido butírico; C, ácido caproico; L, ácido láctico; P, ácido propiónico; S, ácido succínico; IB, ácido isobutírico; IC, ácido isocaproico.

Modificado de Dowell VR. Clinical veterinary anaerobic bacteriology. Atlanta: Centres for Disease Control, 1977: 1-25, y adaptado de las siguientes referencias: Allen SD. Gram-positive, non-spore-forming anaerobic bacilli. In: Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ Jr, Shadomy EJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. Ed. 4. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985: 461-472; Jones D, Collins MD. Irregular, nonsporing gram-positive rods. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe MG, Holt JG. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986: 1261-1434.

Cuadro 16-20 Reacciones de bacilos grampositivos no formadores de esporas en medios diferenciales de agar CDC

ESPECIE	N° DE CEPAS EXAMINADAS	PLACA PRESUMPTO 1								PLACA PRESUMPTO 2				PLACA PRESUMPTO 3			
		Indol	Derivado del indol	Hidrólisis de esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinasa	Lipasa	Crecimiento en agar bilis	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de almidón	Proteólisis de leche	DNasa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación de manitol	Fermentación de lactosa	Fermentación de ramnosa
Actinomyces																	
<i>A. israelii</i>	12	–	–	+	–	–	–	–	V	+	–	–/+	–/+	–	V	–/+	–/+
<i>A. meyeri</i>	39	–	–	–	–	–	–	–	I ^{NC}	+/-	–	–	–/+	–	–	V	–
<i>A. naeslundii</i>	31	–	–	+/-	–	–	–	–	V	+	–	–	–	–	–/+	+/-	–
<i>A. odontolyticus</i>	56	–	–	V	–	–	–	–	V	+	–	–	–	–	–	V	–/+
<i>A. viscosus</i>	25	–	–	V	–	+/-	–	–	SC ^I	+	–	–	–	–	–	V	–
Aracnobacterium																	
<i>A. pyogenes</i>	12	–	–	–	–	–	–	–	I ^{NC}	+	–	+	–/+	+/-	–	–/+	–
Bifidobacterium																	
<i>B. adolescentis</i>	8	–	–	V	–	–	–	–	E	+	–/+	–	–	–	–/+	+	–
<i>B. bifidum</i>	4	–	–	–	–	–	–	–	E	+	–	–	–	–	–	+	–
<i>B. breve</i>	4	–	–	+/-	–	–	–	–	E	+	–/+	–	–	–	V	+	–
<i>B. dentium</i> ^a	3	–	–	–	–/+	–	–	–	E	+	–	–	–	–	+	+/-	–
<i>B. infantis/longum</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	E	+	V	–	–	–	–	+	–
Collinsella																	
<i>C. aerofaciens</i>	3	–	–	–/+	–	–	–	–	E	+	–	+/-	–	–	–	+	–
Eggerthella																	
<i>E. lenta</i>	33	–	–	–	–/+	V	–	–	E ^I	–	–	–	–	–	–	–	–
Eubacterium																	
<i>E. brachy</i>	2	–	–	–	–	–	–	–	SC	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. limosum</i>	8	–	–	–	+	–	–	–	E	+	V	–	–	–	+	–	–
<i>E. nodatum</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	SC	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. saburreum</i>	2	V	–	V	–	–	–	–	SC	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. timidum</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	SC	–	–	–	–	–	–	–	–
Propionibacterium																	
<i>P. acnes</i>	144	+/-	–	–	–	+	–	–/+	V	+	–	+/-	–	V	–	–	–
<i>P. avidum</i>	5	–	–	+/-	–	+	–	+/-	E	+	–	V	–	+/-	–	–	–
<i>P. granulosum</i>	7	–	–	–	–	+	–	–/+	V	+	–	V	–/+	–/+	–/+	–/+	–
<i>P. propionicum</i>	10	–	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	V	V	–
Pseudoramibacter																	
<i>P. alactolyticum</i>	4	–	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	–	–	–

^a Antes llamado *B. eriksonii*.+, reacción positiva en más del 90% de las cepas; –, reacción negativa en más del 90% de las cepas; +/-, la mayoría de las cepas positivas, cepa negativa ocasional; –/+, la mayoría de las cepas negativas, cepa positiva ocasional; I, crecimiento inhibido; V, variable; E, crecimiento igual (equivalente) al control sin bilis; E^I, crecimiento igual al control con cepa inhibida ocasional; I^{NC}, crecimiento inhibido con cepas ocasionales que no crecen; SC, sin crecimiento; SC^I, sin crecimiento con cepa inhibida ocasional.

Adaptado de Whaley DN, Wiggs LS, Miller PH, Srivastava PU, Miller JM. Use of Presumpto plates to identify anaerobic bacterie. J Clin Microbiol 1995;33:1196-1202 y ediciones previas de este libro.

aspecto expansivo. Las células miden menos de 0,5 µm de ancho por casi 1,5 a 3 µm de longitud. El succinato y el acetato son los productos más importantes (con pequeñas cantidades de lactato o no) después del desarrollo en caldo con peptona y extracto de levadura suplementado con glucógeno al 2% en suero de conejo. La diferenciación entre las dos especies ahora reconocidas, *M. curtisii* y *M. mulieris*,²³⁸ basada en diferencias de morfología, reacciones negativas para indol y catalasa, desarrollo en presencia de arginina, hidrólisis de hipurato, reducción del nitrato variable y otras características, es dificultosa.^{125,177,231}

OTROS GÉNEROS Y ESPECIES DE BACILOS GRAMPOSITIVOS ANAEROBIOS NO FORMADORES DE ESPORAS

Finegold actualizó los cambios taxonómicos de los anaerobios asociados con los seres humanos, incluida la información de géneros y especies no mencionadas en este libro.⁶⁷ A los interesados en la identificación definitiva de los bacilos grampositivos anaerobios no formadores de esporas que necesiten recursos no disponibles en muchos (si no en la mayoría) de los laboratorios de microbiología clínica se recomienda la lectura de las referencias que siguen.^{42,125,177}

Identificación de especies de *Clostridium*

Los bacilos grampositivos anaerobios formadores de esporas encontrados en muestras clínicas humanas son miembros del género *Clostridium*. En 1994, Collins y cols.,⁴⁴ sobre la base de secuencias génicas de 16S rRNA determinadas por secuenciación directa mediante PCR, encontraron que el género *Clostridium* era muy heterogéneo. Por lo tanto, les dieron nombre a cinco géneros nuevos de bacilos formadores de esporas.⁴⁴ Se incluyeron las siguientes especies: *Caloramator*, *Filifactor*, *Moorella*, *Oxobacter* y *Oxalophagus*. Además, se propusieron 11 combinaciones nuevas de especies. Ninguna de estas designaciones nuevas de género y especie fueron relevantes para enfermedades infecciosas humanas. Las especies recién creadas en el momento que se escribe este texto son *Clostridium bartlettii*,²²⁹ *C. bolteae*,²²⁸ *C. hathewayi*²³⁴ y *C. neonatale*.^{3a} Se deben consultar los documentos originales para obtener información acerca de su importancia clínica.

En la actualidad, las especies de *Clostridium* encontradas en la clínica varían en sus relaciones con el oxígeno y en sus actividades fisiológicas catabólicas y anabólicas. Ciertos clostridios, por ejemplo *C. haemolyticum* y *C. novyi* tipo B, están entre los anaerobios obligados más estrictos. En el otro extremo del espectro, *C. histolyticum*, *C. tertium* y *C. carnis* son aerotolerantes y forman colonias en placas de agar sangre para anaerobios incubadas en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela o en una estufa con 5-10% de CO₂. En el laboratorio clínico a veces el problema se origina en determinar si una cepa es un clostridio aerotolerante o un bacilo anaerobio facultativo. Los clostridios aerotolerantes rara vez forman esporas cuando crecen en aerobiosis y son catalasa negativos, mientras que las especies del género *Bacillus* rara vez forman esporas cuando crecen en condiciones anaerobias y producen catalasa.²²²

Aunque los clostridios se consideran grampositivos, muchos son gramnegativos cuando se preparan los frotis de las colonias en desarrollo. Por ejemplo, *Clostridium ramosum* y *C. clostridioforme* son por lo común gramnegativos.

La demostración de esporas suele ser difícil con algunas especies, por ejemplo, *C. perfringens*, *C. ramosum* y *C. clostridioforme*.

La demostración de producción de esporas no es necesaria para la identificación de estas tres especies. Para demostrar esporas, por lo general son suficientes las preparaciones teñidas con Gram; las tinciones especiales para esporas no suelen tener ventajas particulares. Sin embargo, el examen de preparados húmedos con un microscopio con contraste de fase es útil cuando las esporas son maduras y refringentes. En nuestra experiencia, la mejor forma para demostrar la producción de esporas es inocular un agar inclinado (en pico de flauta) con carne cocida e incubar en anaerobiosis durante 5 a 7 días a 30 °C. Las células del crecimiento en el agar inclinado se observan luego en una preparación teñida con Gram o en una preparación húmeda con microscopio de contraste de fase. Además, se pueden usar técnicas de selección de esporas mediante la aplicación de alcohol o choque térmico.¹³⁸ En los cuadros 16-21, 16-22 y 16-23 se muestran las características identificatorias para la mayoría de los clostridios encontrados en infecciones humanas.

Algunas de las reacciones claves para la identificación de *C. perfringens* se ilustran en la lámina en color 16-3. La doble zona de hemólisis en agar sangre, la producción de lecitinasa en agar yema de huevo y la fermentación abrupta de leche tornasolada (o proteólisis en agar leche) son características de esta especie. Las células de *C. perfringens* son de 0.8-1.5 µm de diámetro × 2-4 µm de longitud con extremos romos. A menudo se describen como en forma de furgón de carga. No obstante, las células examinadas durante el desarrollo temprano en cultivo en caldo tienden a ser cortas y cocoides, mientras que los cultivos más viejos contienen células más largas que pueden ser casi filamentosas. Después de toda una noche de incubación en agar sangre, las colonias por lo común son de 1 a 3 mm de diámetro, pero pueden alcanzar 4 a 15 mm después de una incubación prolongada. Las colonias suelen ser chatas, a veces rizoides y elevadas en el centro. Algunas tienden a extenderse, pero no coalescen. *C. perfringens* es no móvil.

C. perfringens es con mucho la especie de *Clostridium* de origen humano aislada con mayor frecuencia. Sin embargo, los clostridios dan cuenta de tan sólo el 10-12% de los aislamientos de bacterias anaerobias en muestras clínicas recolectadas y seleccionadas en forma apropiada. *C. perfringens* y otros clostridios se encuentran entre la flora normal del tubo digestivo. También habitan de manera transitoria en la piel. Muchos clostridios aislados en muestras clínicas, incluso de hemocultivos, son contaminantes accidentales y pueden no revestir importancia clínica. En otras circunstancias, la presencia de ciertos clostridios en una lesión puede tener consecuencias lamentables para el huésped. Así, las propiedades patogénicas de los clostridios pueden ser manifestadas sólo en circunstancias especiales y la comunicación entre el microbiólogo y el médico que atiende al paciente es casi siempre necesaria para determinar la importancia de una cepa dada. *C. perfringens* también se encuentra en la mionecrosis (gangrena gaseosa), la colecistitis gangrenosa, la septicemia y la hemólisis intravascular posterior a un aborto e infecciones pleuropulmonares anaerobias; es la causa principal de intoxicación alimentaria en los Estados Unidos; también es causa de diarrea asociada con antibióticos y la causa más diseminada de enterocolitis necrosante que afecta a niños y adultos.^{4,7,28,81,189,222,253}

CLOSTRIDIOS HISTOTÓXICOS IMPLICADOS EN MIONECRISIS CLOSTRIDIANA O GANGRENA GASEOSA

Los clostridios implicados más a menudo en la gangrena gaseosa son *C. perfringens* (80%), *C. novyi* (40%) y *C. septi-*

Cuadro 16-21 Algunas características claves de especies de *Clostridium* asociadas con enfermedad humana

ESPECIE ^a	AERO-TOLERANTE	ZONA DOBLE DE HEMÓLISIS	ESPORAS TERMINALES	MOVILIDAD	PRODUCTOS METABÓLICOS VOLÁTILES (CGL) EN PYG, 48 HORAS A 35 °C	OTRAS
<i>C. bifermentans</i>	–	–	–	+	A, IC, (P), (IB), (B), (IV)	Ureasa negativas; indol positivas
<i>C. botulinum</i> ^b	–	–	–	+	A, (P), (IB), B, IV, (V), (IC)	Lipasa positivas
<i>C. butyricum</i>	–	–	–	+	A, B	Muy sacarolíticas
<i>C. difficile</i>	–	–	–	+	A, IB, B, IV, IC	
<i>C. innocuum</i>	–	–	+	–	A, B	Lactosa y maltosa negativas
<i>C. limosum</i>	–	–	–	+	A	Asacarolíticas; gelatina positivas
<i>C. novyi</i> tipo A	–	–	–	+	A, P, B	Es raro encontrarlas en muestras clínicas
<i>C. perfringens</i>	–	+	–	–	A, B, (P)	Rara vez se observan esporas
<i>C. ramosum</i>	–	–	+	–	A	Rara vez se observan esporas; con frecuencia gramnegativas
<i>C. septicum</i>	–	–	–	+	A, B	Sacarolítica, pero sacarosa negativas
<i>C. sordellii</i>	–	–	–	+	A, IC, (P), (IB), (IV)	Ureasa positivas; indol positivas
<i>C. sporogenes</i> ^b	–	–	–	+	A, P, IB, B, IB, V, IC	Lipasa positivas
<i>C. subterminale</i>	–	–	–	+	A, IB, B, IV, (P)	Asacarolíticas; gelatina positivas
<i>C. tetani</i>	–	–	+	+	A, (P), B	Pueden aparecer gramnegativas
<i>C. tertium</i>	+	–	+	+	A, B	Sin esporas en condiciones anaerobias

^a Para más información sobre la identificación definitiva de estas especies y otros clostridios que pueden encontrarse en muestras clínicas. 7,53,107,122,125

^b Prueba de neutralización de toxina requerida para la identificación definitiva.

+, reacción positiva para el 90-100% de las cepas probadas; –, reacción negativa para el 90-100% de las cepas probadas, V, reacción variable; paréntesis, variable; A, ácido acético; P, ácido propiónico; IB, ácido isobutírico; IV, ácido isovalérico; V, ácido valérico; IC, ácido isocaproico.

Cuadro 16-22 Reacciones de especies de *Clostridium* en medios diferenciales de agar de los CDC

ESPECIE	Nº DE CEPAS EXAMINADAS	PLACA PRESUMPTO 1								PLACA PRESUMPTO 2				PLACA PRESUMPTO 3			
		Indol	Derivado del indol	Hidrólisis de esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitinasa	Lipasa	Crecimiento en agar bilis	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de almidón	Proteólisis de leche	DNasa	Hidrólisis de gelatina	Fermentación de manitol	Fermentación de lactosa	Fermentación de ramosa
<i>C. baratii</i>	8	-	-	+	-	-	+	-	E	+	V	V	-	-	-	+/-	-
<i>C. bifermentans</i>	16	+	-	+	-	-	+	-	E	+	-	+/-	-	+	-	-	-
<i>C. butyricum</i>	31	-	-	+	-	-	-	-	I	+	+/-	-	-	-	-	+	-
<i>C. cadaveris</i>	6	+/-	-/+	-	V	-	-	-	E ^{NC}	+	+/-	-	+	-/+	-	-	-
<i>C. clostridioforme</i>	18	-/+	-	V	-	-	-	-	V	+/-	-	-	-/+	-	-	+/-	V
<i>C. difficile</i>	490	-	-	+	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. histolyticum</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	+	+	+/-	-	-	-
<i>C. innocuum</i>	18	-	-	+	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>C. limosum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	SC	V	V	V	V	-	-	-	-
<i>C. malenominatum</i>	7	+	-	-	V	-	-	-	I ^E	-	-	-	-/+	-	-	-	-
<i>C. paraputrificum</i>	13	-	-	+	-	-	-	-	E	+	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>C. perfringens</i>	79	-	-	V	-/+	-	+	-	E	+	+/-	V	+	+	-	+	-
<i>C. ramosum</i>	16	-	-	+	-	-	-	-	E	+	-	-	-	-	V	+	V
<i>C. septicum</i>	56	-	-	+/-	-	-	-	-	E	+	-	-	+	+/-	-	+/-	-
<i>C. sordellii</i>	32	+	-	-	V	-	+/-	-	E	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>C. sphenoides</i>	8	+/-	-	V	-	-	-	-	V	+	-	-	V	-	V	V	V
<i>C. sporogenes</i>	52	-	+	+	-	-	-/+	+	E	+	-	+	-/+	+	-	-	-
<i>C. subterminale</i>	7	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-/+	V	-/+	+/-	-	-	-
<i>C. symbiosium</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	V	V	-	-	-	-	V	-	-
<i>C. tertium</i>	44	-	-	+	-	-	-	-	E	+	V	-	+/-	-	+	+	-
<i>C. tetani</i>	27	+/-	-	-	V	-	-	-/+	E ^I	-	-	-	V	+	-	-	-

+, reacción positiva en más del 90% de las cepas; -, reacción negativa en más del 90% de las cepas; +/-, la mayoría de las cepas positivas, cepa negativa ocasional; -/+, la mayoría de las cepas negativas, cepa positiva ocasional; V, variable; I, crecimiento inhibido; E, crecimiento igual (equivalente) al control sin bilis; E^I, crecimiento igual al control con cepa inhibida ocasional; E^{NC}, crecimiento igual con cepas ocasionales que no crecen; SC, sin crecimiento; I^E, la mayoría de las cepas inhibidas con cepas ocasionales que crecen igual.

Adaptado de la referencia 259 de Whaley DN, Wiggs LS, Wiggs LS, Miller PH, Srivastava PU, Miller JM. Use of Presumptive plates to identify anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 1995;33:1196-1202 y ediciones previas de este libro.

Cuadro 16-23 Características útiles para la identificación de algunas especies de *Clostridium*

CARACTERÍSTICA	ESPECIES
Aerotolerante	<i>C. carnis</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. tertium</i>
No móvil	<i>C. innocuum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. ramosum</i>
Esporas terminales	<i>C. baratti</i> , <i>C. cadaveris</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. tertium</i> , <i>C. tetani</i>
Produce lecitinasa en agar yema de huevo	<i>C. bifermentans</i> , <i>C. limosum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. subterminale</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. haemolyticum</i>
Produce lipasa en agar yema de huevo	<i>C. botulinum</i> , <i>C. novyi</i> tipo A, <i>C. sporogenes</i>
Asacarolítico y proteolítico (es decir, gelatina positivo)	<i>C. histolyticum</i> , <i>C. limosum</i> , <i>C. subterminale</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. malenominatum</i> (débil a gelatina negativo)
Ureasa positivo	<i>C. sordellii</i> (<i>C. bifermentans</i> , al que se asemeja, es ureasa negativo)
No hidroliza gelatina	<i>C. butyricum</i> , <i>C. clostridioforme</i> , <i>C. malenominatum</i> , <i>C. paraputrificum</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. ramosum</i>
Fermenta manitol	<i>C. difficile</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. symbiosum</i> , <i>C. tertium</i>
Fermenta ramnosa	<i>C. clostridioforme</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. sporogenes</i>
Sacarolítico y proteolítico	<i>C. bifermentans</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. cadaveris</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. haemolyticum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. putrificum</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. sporogenes</i>
Sacarolítico y no proteolítico	<i>C. baratii</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. clostridioforme</i> , <i>C. glycolicum</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. paraputrificum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. tertium</i>

cum (20%), seguidos en ocasiones de *C. histolyticum* y *C. sordellii*.²²² La mionecrosis por clostridios (gangrena gaseosa) es una entidad clínica invasiva de instalación rápida con necrosis por licuefacción de los músculos y formación de gas, con signos clínicos de toxicidad. No obstante, la cooperación entre el laboratorio microbiológico y el equipo médico es una necesidad urgente para la confirmación del diagnóstico clínico. Los frotis teñidos con Gram del material aspirado de la mionecrosis revelan un fondo necrótico con falta de células inflamatorias y presencia de formas morfológicas que se asemejan a *C. perfringens* o a otro clostridio. En otras condiciones, como la infección de una herida simple o la celulitis anaerobia (en la que también puede haber gas en el tejido), la presencia de contornos de células musculares o de granulocitos y bacterias con morfología mixta en frotis teñidos con Gram de tejidos afectados serían una evidencia en contra de la mionecrosis por clostridios.

Las referencias que siguen dan más detalles sobre los clostridios histotóxicos.^{7,70,154,222}

Enfermedad intestinal desencadenada por *C. perfringens*. *C. perfringens*, posicionado detrás de las especies de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, ha sido el tercer agente etiológico más común de enfermedad transmitida por alimentos en los Estados Unidos durante muchos años.³⁸ La mayoría de los brotes de intoxicación alimenticia por *C. perfringens* en ese país han sido producidos por las cepas de toxina tipo A.^{7,38} La intoxicación se produce por la ingesta de carne de vaca, pollo, cerdo, pavo, extractos de carne y otros alimentos contaminados con gran cantidad de microorganismos. Por lo general, dentro de las 7 a 15 horas después de ingerir los alimentos sospechosos se presenta con dolor abdominal de tipo cólico. En la mayoría de los casos, hay diarrea, heces espumosas con olor fétido y pocos vómitos o fiebre. La enfermedad aparece después de que casi 10⁸ células de *C. perfringens* vegetativas viables llegan al intestino delgado y sufren esporulación. La diarrea es consecuencia de una potente enterotoxina (una proteína de cerca de 34 kDa) que se produce en el intestino mientras forma las esporas. La enfermedad tiende a ser leve y a autolimitarse, y los pacientes suelen recuperarse a los 2 a 3 días de su aparición. Para confirmar el diagnóstico durante la investigación de un brote se han

hecho cultivos anaerobios cuantitativos en medios selectivos en placa, que demostraron al menos 10⁵ microorganismos en los alimentos implicados en la epidemiología, y recuentos que mostraron 10⁶ o más esporas de *C. perfringens* por gramo de heces recolectadas dentro de las 24 horas del comienzo de los síntomas. Además, se realizó la serotipificación de los aislamientos para demostrar que el mismo serotipo de *C. perfringens* estaba presente en los alimentos implicados y en las heces de las personas enfermas, pero no en los controles. La tipificación serológica debe efectuarse en laboratorios establecidos muy bien equipados para este servicio (como el de los CDC).^{7,53}

Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra) comercializa un equipo para la detección de enterotoxina de *C. perfringens*. El sobrenadante de un homogenato salino de heces se prueba para la endotoxina usando un procedimiento de aglutinación del látex pasiva inversa, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Faltan datos con respecto a la sensibilidad, la especificidad y la exactitud de la prueba.

La enfermedad intestinal necrosante causada por *Clostridium perfringens* es bastante más grave que la enfermedad transmitida por alimentos descrita con anterioridad. Se caracteriza por la rápida aparición de dolores cólicos y distensión abdominales, vómitos, diarrea sanguinolenta y shock relacionado con problemas con los líquidos y los electrolitos, e inflamación aguda y necrosis local o diseminada de la mucosa intestinal. Conocida en la posguerra alemana como "Darmbrand" ("intestinos de fuego") fue una forma grave de enterocolitis necrosante con una mortalidad aproximada del 40%. Una forma de enteritis necrosante observada principalmente en los niños de la zona montañosa de Papua-Nueva Guinea denominada *pig bel* (vientre de cerdo) se asocia con una mortalidad del 30-60%.^{174,249} Los casos esporádicos de enfermedad intestinal necrosante por *C. perfringens* han sido informados en muchas partes del mundo, incluidos Europa y los Estados Unidos.⁴ Entre los factores que se creen importantes como condiciones predisponentes para la enfermedad intestinal necrosante está el consumo de cantidades excesivas de alimentos ricos en inhibidores de la tripsina (p. ej., boniato, cacahuete) por individuos desnutridos. *C. perfringens* tipo C ha sido invo-

lucrado en los síndromes de Darmbrand, de *pig bel* y de enfermedad intestinal necrosante en los países de Occidente durante los últimos años.⁴ Se ha sugerido que *C. perfringens* tipo A también desempeña un papel en algunos casos de enfermedad intestinal necrosante, en particular en los países occidentales.²⁴¹ En los nativos de las montañas de Papua-Nueva Guinea, la enfermedad típica se desarrolla después del consumo de grandes cantidades de carne mal cocida en la fiesta del cerdo. Un inóculo cargado de *C. perfringens* tipo C se ingiere con la comida y el microorganismo prolifera en el intestino delgado donde produce β -toxina. Los niveles bajos de enzimas proteolíticas pancreáticas, asociados con la dieta usual baja en proteínas de los montañeses y con el consumo abundante de boniato, pueden permitir que la β -toxina de *C. perfringens* actúe en el intestino delgado sin que sea destruida por la tripsina pancreática u otras proteasas. Existe un espectro clínico y patológico en cuanto a la gravedad de la enfermedad intestinal necrosante. Algunos pacientes pueden sobrevivir con cuidados de mantenimiento y descompresión del intestino; otros pueden requerir la resección del segmento intestinal afectado; otros son inoperables y mueren con necrosis gangrenosa extensa de los intestinos delgado y grueso. El diagnóstico diferencial incluye colitis pseudomembranosa (de un modo u otro asociada con *Clostridium difficile*), shigelosis aguda, enfermedad transmitida por alimentos por varios agentes causales (como *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni* entre otros), colitis ulcerosa aguda y obstrucción intestinal (debida a adherencias, vólvulo, etc.). En los casos sospechosos, se debe procurar el cultivo de *C. perfringens* tipo A y tipo C (p. ej., hemocultivos, cultivos peritoneales si existe peritonitis y del contenido intestinal de muestras de necropsia o quirúrgicas). Se debe consultar a un laboratorio de referencia (como el de los CDC), donde se pueda cumplimentar la tipificación de las cepas. Se deben obtener muestras pareadas de suero para los estudios de serotipificación (p. ej., para determinar un aumento en el título de anticuerpos séricos para β -toxina). Una elevación del título de anticuerpos sería compatible con enfermedad por *C. perfringens* tipo B o tipo C.²⁴⁹

OTROS CLOSTRIDIOS EN DIVERSOS CUADROS CLÍNICOS

***Clostridium ramosum*.** *Clostridium ramosum* fue llamado en el pasado *Eubacterium filamentosus*, *Catenabacterium filamentosum*, *Actinomyces ramosus*, *Fusiformis ramosus*, *Ramibacterium ramosus* y con otros nombres.²²² En 1971, como ya se mencionó, se encontró que producía esporas terminales y fue colocado en el género *Clostridium*.¹³⁵ Es un miembro destacado de la flora del intestino grueso y es el segundo *Clostridium* aislado con más frecuencia en muestras clínicas recolectadas en forma apropiada. Es común, en particular, en infecciones abdominales posteriores a traumatismos. *Clostridium ramosum* es importante desde el punto de vista clínico a causa de su resistencia a la penicilina G, a la clindamicina y a otros antibióticos. Aunque se ha encontrado en infecciones graves de todos los sitios corporales, puede ser mal identificado o pasado por alto, porque por lo general se tiñe como bacilo gramnegativo y sus esporas terminales son difíciles de demostrar.

Las células de *C. ramosum* suelen ser menores de 0,6 μ m de diámetro $\times$ 2-5 μ m de largo, pero son muy pleomorfas y a veces producen cadenas cortas o filamentos largos. En agar sangre, las colonias a menudo son de 1 a 2 mm de diámetro, no hemolíticas, circulares o levemente irregulares, de bordes lisos, poco convexas y translúcidas. Las cepas de *C. ramosum* son resistentes a la rifampicina por el método de disco de 15 μ g tra-

tado con anterioridad, pero inhibidas por el disco de penicilina de 2 U y el de kanamicina del 1 mg (de modo similar a *F. mortiferum* y *F. varium*). *C. ramosum* es indol negativa (*F. mortiferum* y *F. varium* son indol positivas); muestra un desarrollo potenciado en agar bilis; hidroliza la esculina, y es negativo para catalasa, lipasa y lecitinasa. Está entre los pocos clostridios que fermentan el manitol (cuadro 16-23). Los ácidos acético, láctico y succínico son los principales productos metabólicos.

***Clostridium septicum*.** Aunque *Clostridium septicum* no es tan común como *C. perfringens* y *C. ramosum*, es importante reconocerlo en el laboratorio clínico. Se lo suele aislar en infecciones graves, a menudo mortales. La bacteriemia por *C. septicum*, por razones desconocidas, se asocia con cáncer subyacente, en particular carcinoma de colon, carcinoma de mama y neoplasias hematológicas (p. ej., leucemia-linfoma).¹³⁹ Las células son de 0,6 μ m de ancho y 3 a 6 μ m de longitud. Tiende a ser pleomorfo, a veces produce filamentos delgados y largos. La formación en cadena es común, como unidades en forma de limón intensamente coloreadas. Las esporas son ovales y subterminales y distienden el microorganismo. Después de 48 horas de incubación en agar sangre, las colonias tienen 2 a 5 mm de diámetro, están rodeadas por una zona de 1 a 4 mm de hemólisis completa; son chatas, levemente elevadas, grises, brillosas y semitranslúcidas, y los bordes de irregulares a rizoides, a menudo rodeados por una zona de aglomeración. Las cepas muy móviles pueden aglomerarse en una área amplia de la placa. A veces, para evitar la aglomeración en la placa se usa agar sangre condensado, que contiene 4-6% de agar en lugar del usual de 1,5%. Algunas características claves de *C. septicum* son que hidroliza gelatina; no produce indol, lipasa o lecitinasa, y fermenta lactosa pero no manitol, ramnosa o sacarosa. Los ácidos acético y butírico son los principales productos metabólicos.

CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASOCIADO CON ENFERMEDAD INTestinal

Se creyó que *S. difficile*, aislado por primera vez en 1935, no era patógeno para los seres humanos hasta los últimos años de la década de 1970, cuando estuvo implicado como agente causal en diarrea asociada con antibióticos (DAA) y colitis pseudomembranosa (CSM).^{7,21} La diarrea benigna, autolimitante, con frecuencia aparece en pacientes hospitalizados que están siendo tratados con antibióticos. La diarrea leve suele apaciguarse al interrumpir el tratamiento y su causa no está determinada. En otros pacientes, los síntomas intestinales pueden ser más graves, y la diarrea puede persistir. Estos enfermos pueden tener colitis asociada con antibióticos (CAA) o colitis pseudomembranosa potencialmente mortal.^{7,20,21} Es probable que *C. difficile* cause la mayoría de los casos de CSM; sin embargo, es infrecuente que sea causada por *Staphylococcus aureus* o por *C. perfringens*.⁷ Como se verá en otra parte, Borriello y cols. observaron una relación entre *C. perfringens* enterotoxigénico y diarrea asociada con antibióticos en el Reino Unido.^{28,29} Además de CSM, se ha estimado que *C. difficile* causa el 60-75% de los casos de colitis asociadas con los antibióticos y el 11-33% de los casos de DAA.¹⁷³ Todavía no ha sido establecido si *C. perfringens* causa o no DAA, con alguna frecuencia, en los Estados Unidos. La gravedad de la enfermedad, así como los hallazgos patológicos, son muy variables y dependen de si el paciente tiene CSM, CAA, DAA sin evidencia anatómica de colitis o está simplemente colonizado por *C. difficile* (o si es un portador asintomático). Los hallazgos patológicos en la CSM y la CAA se han detallado en otro sitio.²⁷

Los factores involucrados en la enfermedad asociada con *C. difficile* son: 1) toxina A, una enterotoxina que puede producir acumulación de líquido en el intestino, según se observó en experimentos realizados en segmentos de asas ileales de conejos, 2) toxina B, una citotoxina potente capaz de producir efectos citopatogénicos en varias líneas celulares en cultivos de tejidos, y 3) "un factor alterador de la movilidad", que estimula las contracciones del músculo liso del intestino y es distinto de las toxinas A y B.⁷ La toxina A también es citotóxica en ciertas líneas celulares, pero no lo es tanto como la toxina B en las líneas celulares que se han usado durante largo tiempo para la investigación de la toxina B.^{160,162} Las siguientes referencias se recomiendan para más información sobre *C. difficile* y sus toxinas.^{3,7,20,21,81,161}

C. difficile es ubicuo en la naturaleza y ha sido aislado en el suelo, el agua, los contenidos intestinales de varios animales, la vagina y la uretra humanas y las heces de muchos lactantes sanos, pero sólo en las heces del 3% de voluntarios adultos sanos. Sin embargo, el microorganismo es más prevalente en las heces de algunos adultos hospitalizados que no tienen diarrea ni colitis. Se lo encontró en las heces del 13-30% de los adultos hospitalizados que estaban colonizados pero no tenían evidencia de enfermedad causada por *C. difficile* o antecedentes de tratamiento antibiótico. Sin embargo, también está implicado con frecuencia como agente causal de diarrea o colitis adquiridas en el hospital.^{81,173} Aunque se lo suele encontrar en las heces de muchos lactantes sanos, algunos lactantes con diarrea prolongada y grave, asociada con antecedente de terapia antibiótica, habían tenido colitis pseudomembranosa y al mismo tiempo, la citotoxina de *C. difficile* estaba presente en sus heces sin otro agente etiológico presuntivo. Estos pacientes respondieron clínicamente bien al tratamiento oral con vancomicina (Schaeffer J: comunicación personal, 1986).

Entre los antibióticos implicados en la enfermedad gastrointestinal asociada con *C. difficile* están numerosos aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, compuestos β -lactámicos de segunda y tercera generación, clindamicina, eritromicina, lincomicina, metronidazol, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol, anfotericina B y fluoroquinolonas.^{80,81}

Además, *C. difficile* ha sido involucrado en los siguientes cuadros clínicos sin asociación con tratamientos antibióticos: 1) colitis pseudomembranosa; 2) diarrea asociada con tratamiento con metotrexato y otros agentes quimioterapéuticos anticancerosos; 3) recidivas de enfermedad intestinal inflamatoria no específica (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa); 4) obstrucción o estrangulación intestinal y en 5) algunos pocos casos de síndrome de muerte súbita del lactante.⁷⁰ Sin embargo, el papel de *C. difficile* en esas afecciones, si existe, no ha sido aclarado. Para más información acerca de los hallazgos y el diagnóstico clínico de DAA, CAA, y CSM, el lector debe remitirse a las referencias que se indican.^{20,21,78,79,81}

Recolección y transporte de muestras que contienen *C. difficile*. Por lo común, para el diagnóstico de laboratorio se prefieren muestras fecales amorfas, semisólidas o líquidas (alrededor de 5-50 g o 5-50 mL). Son inadecuadas las muestras tomadas con hisopos a causa del pequeño volumen obtenido. Las muestras de heces sólidas son inapropiadas a menos que se esté llevando a cabo un estudio epidemiológico de portación fecal. Otras muestras convenientes son material de biopsia o contenido de la luz intestinal obtenidos por colonoscopia o del intestino afectado (obtenidos por resección quirúrgica o autopsia). Sin embargo, los procedimientos colonoscópicos pueden diluir en exceso la muestra, o la cantidad obtenida por biopsia puede ser insuficiente para el trabajo del laboratorio. Para el transporte de

la muestra se deben usar envases plásticos herméticos. Si las muestras son procesadas en el mismo día por el laboratorio, el transporte a temperatura ambiente será suficiente. Si la muestra llega tarde y no puede ser procesada hasta el día siguiente, se puede mantener en el refrigerador sin pérdida demostrable de actividad citotóxica. Las muestras no deben permanecer a temperatura ambiente más de 2 horas antes de ser procesadas o refrigeradas. Sin embargo, para remitir las muestras a laboratorios de referencia para un ensayo de toxina, es recomendable enviarlas en hielo seco. Por otro lado, se debe usar un envase anaerobio (transportado a 25 °C) para muestras que se procesen para aislamiento e identificación de *C. difficile*. Las muestras que se procesan para la prueba de aglutinación del látex para *C. difficile* (prueba Culturette Brand CDT® *C. difficile*; Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) no se deben congelar porque el antígeno detectado es inestable en la congelación.

Diagnóstico de laboratorio de *C. difficile*. Como se trató en la sección "Examen directo" de este capítulo, las pruebas diagnósticas en los casos de sospecha de enfermedad asociada con *C. difficile* deben realizarse en el laboratorio mediante la demostración de la citotoxina, por el aislamiento y la identificación de toxinas producidas por *C. difficile* a partir de heces, por realización de una prueba de aglutinación del látex o un ensayo inmunoanálisis (EIA) para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*, por una prueba EIA para la enterotoxina o citotoxina producidas por el microorganismo en las heces o por una combinación de métodos. En el recuadro 16-14 se describe en forma breve un procedimiento práctico para la detección de la citotoxina de *C. difficile*.

C. difficile puede ser aislado mediante una técnica de selección de esporas (procedimientos de selección de esporas

Recuadro 16-14 Ensayo para toxina en heces mediante el procedimiento de citotoxicidad en cultivo de tejido^a

1. Centrifugar heces líquidas o extractos de heces formadas (2 000 g por 20 minutos o 10 000 g por 10 minutos).
2. Filtrar a través de una membrana filtrante de 0,45 μ m.
3. Agregar 0,1 mL de sobrenadante libre de células más 0,1 mL de diluyente gelatina tamponada (con buffer) (pH 7 a 7,2) o de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un tubo de cultivo de tejido. Es conveniente usar fibroblastos pulmonares diploides humanos (células WI-38) disponibles en el comercio.
4. Observar las células del cultivo de tejido para citotoxicidad a las 4, 24 y 48 horas (la mayoría son positivas a las 24 horas).
5. Para la prueba de neutralización de antitoxina, agregar 0,1 mL de antitoxina de *C. difficile* (TechLab, Blacksburg, VA) a 0,1 mL de sobrenadante libre de células y llevar a cabo los pasos del 1 al 4. La curvatura de las células WI-38 (llamada cambio actinomorfo) u otros efectos citopáticos no deben verse si la toxina que está presente en las heces está neutralizada.
6. El título de la toxina se determina usando diluciones seriadas de la muestra fecal filtrada en diluyente de gelatina buferada (pH 7 a 7,2) o en PBS. La correlación entre los títulos de toxina y la gravedad de la enfermedad es muy escasa.

^a Los equipos comerciales para la realización de los ensayos de neutralización de citotoxina de *C. difficile* son fabricados por Bartels Diagnostics y Bio-Whittaker/Wampole. Se pueden adquirir completos con fibroblastos de prepucio humanos en cubetas de dilución en microcaldo y proveen la antitoxina necesaria y otros reactivos para realizar el ensayo de neutralización de citotoxina.

mediante la aplicación de alcohol o choque térmico) y por medios selectivos en placa, como agar sangre feniletíl alcohol (PEA) (Remel®, Lenexa, KS, o BD Microbiology Systems®) o agar fructosa, yema de huevo, cicloserina-cefoxitina (CCFA) más un medio no selectivo de agar sangre para anaerobios de los CDC.^{7,167} Las descripciones detalladas de los procedimientos de selección de esporas con alcohol y tratamiento térmico se presentan en otro sitio.⁷ Si se usa cualquiera de estos procedimientos, el tratamiento térmico o el alcohol, la muestra se inocula en agar sangre para anaerobios de los CDC (o en agar yema de huevo) después del tratamiento. Pasadas 48 horas de incubación anaerobia, las colonias de *C. difficile* en agar sangre anaerobio son no hemolíticas, de 2 a 4 mm de diámetro, grisáceas translúcidas, levemente elevadas, planas y extendidas, con bordes rizoides. Como se observa en el microscopio de disección, las colonias muestran un aspecto iridiscente, "opalescente-jaspeado". *C. difficile* es negativo para lipasa y lecitinasa en agar yema de huevo.

Además del procedimiento de selección de esporas, se puede inocular una placa del medio PEA y una placa de CCFA con heces sin ser tratadas (o una suspensión de heces preparada en diluyente de gelatina amortiguada). Después de 48 horas de incubación, las colonias de *C. difficile* en medio PEA serán idénticas a las desarrolladas en agar sangre para anaerobios (descritas antes). La apariencia de las colonias de *C. difficile* en el medio CCFA se describe en el cuadro 16-6. Marler y cols. hallaron diferencias importantes en el rendimiento del medio CCFA preparado por tres fabricantes diferentes.¹⁶⁷ Bartley y Dowell evaluaron las formulaciones de los medios selectivos adicionales para el aislamiento primario de *C. difficile*.²²

Varios autores describen la identificación de *C. difficile*.^{7,125,189,190} Además de las características de las colonias recién descritas, tienen un olor distintivo. Los bacilos grampositivos a gramvariables tienen esporas subterminales y, en cultivos jóvenes en caldo, son móviles. El análisis de los productos metabólicos revela la producción de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e isocaproico (cuadro 16-21). Hidrolizan esculina y gelatina. Son indol, nitrato y ureasa negativos. La mayoría de las cepas fermentan glucosa, manitol y manosa. Salicina y xilosa son variables (cuadros 16-22 y 16-23).

BOTULISMO

El botulismo es una enfermedad neuromuscular potencialmente mortal causada por toxinas proteicas, termolábiles, antígenicamente distintas de *C. botulinum*.^{52,221} Aunque se producen siete tipos de toxinas (A, B, C, D, E, F, G) por diferentes cepas de *C. botulinum*, la mayoría de los casos de botulismo humano son causados por los tipos A, B, E y F. Entre ellas, el tipo F es el menos común. Los tipos C y D se asocian con botulismo en aves y mamíferos, pero no en seres humanos. El tipo C puede ser subdividido en dos tipos: C₁ y C₂.⁹⁵ Aunque los microorganismos del tipo G, ahora llamados *Clostridium argentinense*, como lo menciona Hatheway,⁹⁶ han sido aislados en muestras de autopsia de unos pocos individuos que murieron súbitamente, no está claro si causan botulismo en los seres humanos. Sin hacer caso del tipo antigénico (A, B, C o E), la toxina botulínica actúa en principio uniéndose a las vesículas sinápticas de los nervios colinérgicos, con lo que impide la liberación de acetilcolina a las terminaciones nerviosas periféricas (incluidas las conexiones neuromusculares) y desarrolla parálisis descendente, flácida y aguda.⁵² La parálisis comienza con el deterioro bilateral de los nervios craneales y deriva en

parálisis de los músculos de la cara (incluidos los de los párpados), la cabeza y la faringe. Luego descendiendo en forma simétrica para comprometer los músculos del tórax, el diafragma y los miembros. Los pacientes pueden morir de parálisis respiratoria a menos que reciban cuidado intensivo respiratorio adecuado, como ventilación mecánica; la muerte también puede resultar de neumonía secundaria (causada por microorganismos no botulínicos).^{68,221}

Los CDC reconocen cuatro categorías diferentes de botulismo. La primera es el botulismo clásico de origen alimentario, típico en los adultos, que resulta de la ingestión de toxina preformada en alimentos contaminados. La segunda categoría, botulismo de herida, es la forma más rara; resulta de la producción de toxina botulínica in vivo después que *C. botulinum* se ha multiplicado en una herida infectada. La tercera categoría, el botulismo infantil, es la más común y proviene de la multiplicación in vivo de *C. botulinum* con producción de la neurotoxina dentro del intestino del lactante. La cuarta categoría, "clasificación indeterminada", es para los casos de botulismo en individuos mayores de 12 meses en los que no se puede reconocer un origen alimentario o de herida de *C. botulinum*.⁵² Los brotes de botulismo de origen alimentario se han debido a alimentos de procesamiento casero más que a los comerciales. Los alimentos más implicados han sido vegetales (p. ej., tomates enlatados caseros, jugo de tomates, guisantes, pimientos verdes, maíz, remolachas, espinaca), pescado (p. ej., atún procesado casero, salmón ahumado, huevos de pescado, atún procesado comercialmente, etc.), frutas (puré de manzanas enlatado casero, moras, etc.) y otros alimentos (p. ej., carne estofada, pimientos, salsa de espárragos, conservas de carnes, etc.).

El botulismo del lactante fue reconocido como una entidad clínica distinta en 1976.^{12,13} Desde entonces hasta 1988, se diagnosticaron 760 casos en los Estados Unidos¹³⁵ y ha sido informado en muchos estados diferentes, con el mayor número de casos en California.⁹⁵ La mayoría de los casos provenientes del oeste del río Misisipi han sido del tipo A; la mayoría de los casos al este del río han sido del tipo B. Los lactantes afectados tenían de 6 días a 11,7 meses de edad y estuvieron afectados ambos sexos por igual.⁹⁵ Casi todos los grupos raciales y étnicos han sido afectados. Los lactantes ingieren esporas, pero no toxina preformada (la toxina preformada se ingiere en el botulismo de origen alimentario), del suelo, polvo ambiental, miel y otras fuentes. Dentro del intestino, *C. botulinum* se multiplica y elabora la toxina. Las características clínicas incluyen estreñimiento (por lo general el primer signo), desgano, dificultad para succionar y deglutir, llanto alterado, hipotonía y debilidad muscular. Por último el bebé se ve hipotónico, pierde el control de la cabeza y pueden aparecer ptosis, oftalmoplejía, expresión facial flácida, disfagia y otros signos neurológicos. Ocurren paro o insuficiencia respiratorias que requieren asistencia respiratoria. En un escaso número de lactantes muertos el botulismo fue confirmado por el laboratorio. El botulismo infantil da cuenta de un pequeño número de casos de síndrome de muerte súbita del lactante.¹²

El diagnóstico de botulismo clásico de origen alimentario se confirma en laboratorios de referencia, como el de los CDC por demostración de la toxina botulínica en suero, heces, contenido gástrico, o vómito. También, el microorganismo puede ser aislado en las heces del paciente.⁵² La detección de toxina botulínica en los alimentos con compromiso epidemiológico, con aislamiento del microorganismo o no, es útil para averiguar el alimento involucrado en el brote. Se deben recolectar alrededor de 15 a 20 mL de suero y 25-50 g de heces para el envío al laboratorio de referencia apropiado (cuando se envía al estado

adecuado o al oficial de salud pública federal capaz de proveer ayuda de laboratorio y epidemiológica en la investigación). En el caso de botulismo sospechoso de herida, se debe recolectar suero, exudado o muestras de hisopado de la herida, junto con tejidos (p. ej., en la autopsia) y heces.

Cuando se sospecha botulismo del lactante, se debe recolectar suero (2 a 3 mL) y tantas heces como sea posible (lo ideal, 25-50 g) en un envase plástico hermético y refrigerado o colocado en hielo seco para el transporte. Sin embargo, todos, si no la mayoría de estos lactantes están estreñidos en la primera etapa de la enfermedad y las heces no están disponibles. Por lo tanto, el médico debe decidir si el riesgo de obtener una muestra de hisopado anorrectal está clínicamente justificado para que el laboratorio aisle *C. botulinum* a partir de esa fuente.

Algunos laboratorios del Departamento de Salud Pública de los Estados Unidos proveen servicios de diagnóstico para botulismo. Con la aprobación previa de los CDC (Tel. 770-488-7100 o 770-488-4819; sitio web www.cdc.gov/ncidod/hip o www.bt.cdc.gov) y del laboratorio del Departamento de Salud del estado local, se pueden remitir las muestras a los CDC para el diagnóstico de laboratorio. La confirmación del diagnóstico clínico de botulismo requiere la demostración de la toxina botulínica (prueba de neutralización en ratón) en suero o heces o *C. botulinum* en heces.^{7,52,97} El aislamiento y la identificación del microorganismo se realizan mediante procedimientos bioquímicos en cultivos convencionales y prueba de neutralización de la toxina. Rara vez se ha detectado la toxina en suero de lactantes afectados. Se recomienda que el cultivo y la prueba de la toxina para *C. botulinum* sean efectuados por laboratorios de referencia bien equipados para estas pruebas especializadas. Para más detalles, el lector interesado puede remitirse a las siguientes referencias.^{7,52,97}

TÉTANOS

El tétanos es una enfermedad infecciosa causada por *C. tetani* que afecta en gran parte a personas no inmunizadas en los Estados Unidos, sobre todo en las zonas rurales del sur del país.^{7,52} Es una enfermedad alarmante caracterizada por contracciones espásticas de los músculos voluntarios e hiperreflexia, causada por una toxina (tetanospasmina) proteica, termolábil, protoplasmática elaborada por *C. tetani*.^{7,52,68} El tétanos comparte algunas similitudes con la difteria, en que la infección (y el microorganismo) permanecen localizados (por lo general en una herida penetrante menor) y la toxina se absorbe y causa los principales efectos sistémicos. Las esporas de *C. tetani*, como las de *C. botulinum*, se distribuyen ampliamente en el suelo, así como en los medios acuáticos. El tétanos suele ser el resultado de la contaminación con esporas de heridas punzantes, laceraciones o incluso lesiones por aplastamiento.^{7,52,68} La contaminación fecal del cordón umbilical ha sido el origen de *C. tetani* en algunos casos de tétanos neonatal. Después de una lesión penetrante localizada, puede haber una infección mixta de ubicación profunda que involucra tanto a anaerobios como aerobios en tejidos sin vitalidad, lo cual deriva en una baja tensión de oxígeno y en un bajo potencial de oxidorreducción. Se producen así las condiciones favorables para que germinen las esporas de *C. tetani* y para que las células vegetativas se multipliquen y liberen la tetanospasmina en la autólisis de las células bacterianas.⁵² La tetanospasmina se adhiere a las terminaciones de los nervios motores periféricos y viaja a lo largo de los nervios hacia el sistema nervioso central (SNC). La toxina se une a los gangliósidos en el SNC y bloquea los impulsos inhibitorios hacia las neuronas motoras.

Los pacientes tienen espasmos musculares prolongados de los músculos flexores y extensores. La tetanospasmina se adhiere a los sitios de unión en las conexiones mioneurales, e inhibe la liberación de acetilcolina. Esto es similar a la adhesión de la toxina botulínica a las conexiones mioneurales, excepto en que los sitios de unión para tetanospasmina y para toxina botulínica son diferentes.⁵² Como ya se indicó, los pacientes con tétanos tienen contracciones musculares espásticas, dificultad para abrir la mandíbula (llamada tétanos, "trismo"), una sonrisa característica llamada "risa sardónica" y contracciones de los músculos de la espalda que provocan una curvatura hacia atrás. Los pacientes son muy irritables y sufren accesos tetánicos, que consisten en contracciones musculares dolorosas y violentas posteriores a algunos estímulos menores, como un ruido. El diagnóstico de tétanos se basa en gran parte en los hallazgos clínicos, no en los estudios de laboratorio. A menudo el antecedente de lesión herida es menor o trivial. Los frotis directos teñidos con Gram y los cultivos anaerobios del sitio de la herida suelen ser negativos. *C. tetani* forma esporas terminales redondas, produce desarrollo extenso en agar sangre para anaerobios y cantidades importantes de acetato y butirato, con sólo una cantidad menor de propionato, es lipasa y lecitinasa negativo en agar yema de huevo y es asacarolítico. Para más información acerca de *C. tetani*, se recomiendan los libros de Finnegold y George⁷⁰ y de Smith y Williams²²² y los artículos de revisión de Dowell⁵² y de Hatheway.⁹⁶

Pruebas de sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antibióticos

El manejo exitoso de enfermedades producidas por bacterias anaerobias requiere la selección y el tratamiento con antibióticos apropiados, a menudo junto con la eliminación de las bacterias por drenajes de abscesos, eliminación de cuerpos extraños y desbridamiento del tejido necrótico y otras medidas quirúrgicas. Alguna vez se creyó que la mayoría de los anaerobios tenían patrones predecibles de sensibilidad a los antibióticos y que la identificación exacta de las cepas era todo lo necesario para predecir la sensibilidad de los aislamientos individuales para varios antibióticos. Sin duda, esto es una sobresimplificación. Mientras algunos antibióticos son activos contra casi todas (> 95%) las bacterias anaerobias (p. ej., imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam y cloranfenicol), otros antibióticos que se pueden seleccionar para usar en el tratamiento no son tan predecibles en sus actividades contra los géneros y especies seleccionados de anaerobios. Por ejemplo, el metronidazol es muy activo contra la mayoría de las bacterias anaerobias gramnegativas probadas en los Estados Unidos, pero ha surgido resistencia al metronidazol en cepas de *B. fragilis* en otros países.⁹⁸ Además, la resistencia al metronidazol suele encontrarse en especies de *Actinomyces*, de *Propionibacterium* y de *Lactobacillus*, en cocos anaerobios y en otros anaerobios grampositivos.⁶ Aunque algunas de las fluoroquinolonas mostraron buena actividad contra anaerobios en un principio, la resistencia a esos antibióticos se ha desarrollado con rapidez.⁹⁸ Las penicilinas y las ureidopenicilinas, las cefalosporinas de segunda y tercera generación y la clindamicina pueden o no ser activas contra ciertas especies de bacilos gramnegativos anaerobios y clostridios.² La resistencia a estos antibióticos es variable.^{98,240,257} No obstante, a menudo el médico se encuentra ante la necesidad de iniciar el tratamiento antibiótico en forma empírica antes de que estén disponibles los resultados de la identificación y de las pruebas de sensibilidad. Por lo tanto, la sen-

sibilidad tabulada y los resultados del tratamiento informados en la literatura o en el hospital local, y la experiencia clínica de los médicos pueden ser la base para la elección inicial de los antibióticos. Se ha publicado hace poco una información excelente respecto de la selección de antibióticos con objetivos de tratamiento.^{98,155,240} Sin embargo, la variabilidad en los patrones de sensibilidad de los anaerobios de importancia clínica es suficiente para que a veces se soliciten pruebas de sensibilidad in vitro de aislamientos individuales con el objetivo de ayudar a los médicos en el manejo de infecciones graves y de aquellas que requieren tratamientos prolongados, como abscesos cerebrales, endocarditis, abscesos pulmonares, infecciones articulares, osteomielitis, infecciones relacionadas con dispositivos protésicos, injertos vasculares, bacteriemia refractaria o recurrente, o cuando la infección no responde al tratamiento empírico.¹⁸⁵

Otra indicación para las pruebas de sensibilidad es la situación en la cual no se cuenta con datos clínicos evidentes sobre los cuales basar las decisiones de tratamiento. Además, los microbiólogos clínicos experimentados en el trabajo con anaerobios están autorizados a investigar la actividad de los nuevos antibióticos comercializados o en etapa de investigación sobre los aislamientos anaerobios en sus laboratorios hospitalarios. También existe una necesidad de controlar los patrones de sensibilidad de anaerobios en la comunidad local y en niveles hospitalarios y en múltiples centros médicos en los Estados Unidos y en otros diversos países.¹³⁵

Entre los microorganismos considerados para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, debido a su virulencia o a que suelen ser resistentes a ciertos antibióticos se incluyen especies del grupo *Bacteroides fragilis*, especies del grupo *Prevotella*-*Porphyromonas* pigmentado, otras *Prevotella*, *Fusobacterium mortiferum*, *F. varium* y *F. necrophorum*, *Bilophila*, *Sutterella* y algunas especies de *Clostridium*.

Métodos de evaluación de la sensibilidad de los anaerobios a los antibióticos

En la actualidad, se recomiendan los procedimientos no automatizados para probar la sensibilidad de los anaerobios a los antibióticos. Se pueden obtener resultados reproducibles por uno de tres métodos.^{98,185} El método de dilución en agar es útil, sobre todo para probar 30 o más cepas de algún anaerobio. El medio usado es agar sangre *Brucella* suplementado con hemina, vitamina K₁ y sangre hemolizada de carnero. El uso de paneles de microdilución en caldo es una alternativa menos laboriosa que el procedimiento de dilución en agar y se considera equivalente al procedimiento de dilución en agar para las cepas pruebas de sensibilidad para cepas del grupo *Bacteroides fragilis*.^{98,185} El medio recomendado para el procedimiento de microdilución en caldo es el caldo *Brucella* suplementado con hemina, vitamina K₁ y sangre de caballo lisada. En él crecen la mayoría de los anaerobios. Sin embargo, el Clinical Laboratory Standards Institute (antes el National Committee for Clinical Standards) en la actualidad no recomienda el procedimiento de dilución en caldo para la investigación en anaerobios no bacteroides. La tercera forma recomendada para probar anaerobios (que también es fácil de usar) es la prueba de la tira con gradiente Etest® (AB Biodisk North America, Piscataway, NJ). Tanto el procedimiento Etest como el de microdilución en caldo son formas prácticas para probar aislamientos individuales contra un número limitado de antibióticos.^{98,185}

Las técnicas de difusión con disco en agar y las de elusión con disco en caldo se usaron en el pasado, pero no deben utilizarse para probar anaerobios a pesar de su conveniencia. La mayoría

de los anaerobios además de las especies de *Bacteroides* crecen de modo muy lento para trabajar con el procedimiento de difusión con disco; los protocolos de interpretación de Bauer-Kirby no fueron diseñados para anaerobios y están faltando protocolos de interpretación basados en medios estandarizados y métodos para examinar a los anaerobios con pruebas de difusión con discos; también hubo muy poca relación entre las medidas del tamaño de la zona y los resultados de las pruebas de dilución de la concentración inhibitoria mínima. Para los detalles de los procedimientos recomendados, el lector se debe remitir al documento más reciente del Clinical Laboratory Standards Institute.^{98,185}

REFERENCIAS

1. al-Barrak A, Embil J, Dyck B, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can Commun Dis Rep* 1999;25:65-69.
2. Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K, et al. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1238-1243.
3. Alfa MJ, Kabani A, Lysterly D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2000;38:2706-2714.
4. Alfa MJ, Robson D, Davi M, et al. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with a novel *Clostridium* species in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2002;35:S101-105.
5. Allen SD. Pig-bel and other necrotizing disorders of the gut involving *Clostridium perfringens*. En: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA et al., eds. *Pathology of Infectious Diseases*. Norwalk, CT, Appleton & Lange, 1997;717-724.
6. Allen SD, Blue-Hnidy DE, Tibbs ME, et al. Anaerobic bacteremia: three decades of experience at a university medical center with projections for the 21st century. Paper presented at the Anaerobe Olympiad 2002: The 6th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, 2002.
7. Allen SD, Duerden BI. Infections due to non-sporing anaerobic bacilli and cocci. En: Hausler WJJ, Sussman M, eds. *Bacterial Infections*. Vol 3. 9ª ed. London: Edward Arnold, 1998;743-776.
8. Allen SD, Emery CL, Lysterly DM. *Clostridium*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 1. 8ª ed. Washington, ASM Press, 2003;835-856.
9. Allen SD, Emery CL, Siders JA. Anaerobic Bacteriology. En: Truant AL, ed. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Washington, D. C., ASM Press, 2002;50-81.
10. Allen SD, Lombard GL, Armfield AY, et al. Development and evaluation of an improved anaerobic holding jar procedure. *Abstr Ann Meet Am Soc Microbiol Abstr* C142, 1977;59.
11. Allen SD, Siders JA, Marler LM. Current issues and problems in dealing with anaerobes in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 1995;15:333-364.
12. Aranki A, Freter R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* 1972;25:1329-1334.
13. Aron SS. Infant botulism. En: Finegold SM, George WL, eds. *Anaerobic infections in humans*. New York, NY, Academic Press, 1989;601-609.
14. Aron SS. Human tetanus and human botulism. En: Rood JI, McClane BA, Songer JG et al., eds. *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. New York, NY, Academic Press, 1997;95-115.
15. Barenfanger J, Drake C, Lawhorn J, et al. Comparison of chlorhexidine and tincture of iodine for skin antisepsis in preparation for blood sample collection. *J Clin Microbiol* 2004;42:2216-2217.
16. Baron EJ, Allen SD. Should clinical laboratories adopt new taxonomic changes? If so, when? *Clin Infect Dis* 1993;16:S449-S450.
17. Baron EJ, Curren M, Henderson G, et al. *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1992;30:1882-1884.
18. Baron EJ, Summanen P, Downes J, et al. *Bilophila wadsworthia* gen. nov. and sp. nov., a unique gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces. *J Gen Microbiol* 1989;135(Pt 12):3405-3411.
19. Bartlett GL. *Pocket Book of Infectious Disease Therapy*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
20. Bartlett JG. Anaerobic bacteria. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases*. 2ª ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1998; 1888-1901.
21. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334-339.
22. Bartlett JG. *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Curr Infect Dis Rep* 2002;4:477-483.
23. Bartlett SL, Dowell VR Jr. Comparison of media for the isolation of *Clostridium difficile* from fecal specimens. *Lab Med* 1991;22:335-338.
24. Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol* 1984;38:27-48.

24. Belanger SD, Boissinot M, Clairoux N, et al. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:730-734.
25. Benthall JR, Pollard AJ, Milford CA, et al. Cerebral infarct and meningitis secondary to Lemierre's syndrome. *Pediatr Neurol* 2004;30:281-283.
26. Boo TW, Cryan B, O'Donnell A, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Veillonella parvula*. *J Infect* 2005;50:81-83.
27. Borriello SP. Clostridia in gastrointestinal disease. Boca Raton, CRC Press, 1985:1-239.
28. Borriello SP. Clostridial disease of the gut. *Clin Infect Dis* 1995;20:Suppl 2:S242-S250.
29. Borriello SP, Barclay FE, Welch AR, et al. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *J Med Microbiol* 1985;20:363-372.
30. Bourgault AM, Lamothe F, Dolce P, et al. *Fusobacterium* bacteremia: clinical experience with 40 cases. *Clin Infect Dis* 1997;25:Suppl 2:S181-S183.
31. Bourgault AM, Rosenblatt JE, Fitzgerald RH. *Peptococcus magnus*: a significant human pathogen. *Ann Intern Med* 1980;93:244-248.
32. Brazier JS, Smith SA. Evaluation of the Anoxomat: a new technique for anaerobic and microaerophilic clinical bacteriology. *J Clin Pathol* 1989;42:640-644.
33. Brock DW, Georg LK, Brown JM, et al. Actinomycosis caused by *Arachnia propionica*: report of 11 cases. *Am J Clin Pathol* 1973;59:66-77.
34. Brook I, Frazier EH. Significant recovery of nonsporulating anaerobic rods from clinical specimens. *Clin Infect Dis* 1993;16:476-480.
35. Buchanan AG. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* 1982;16:761-762.
36. Candoni A, Fili C, Trevisan R, et al. *Fusobacterium nucleatum*: a rare cause of bacteremia in neutropenic patients with leukemia and lymphoma. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1112-1115.
37. Carlier JP, Marchandin H, Jumas-Bilak E, et al. *Anaeroglobus geminatus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Veillonellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:983-986.
38. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne disease outbreaks, annual summary, 1982. *CDC Surveill Summ* 1986;35:7SS-16SS.
39. Charfreitag O, Collins MD, Stackbrandt E. Reclassification of *Arachnia propionica* as *Propionibacterium propionicus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:354-357.
40. Chirinos J, Lichtstein DM, Garcia J, et al. The evolution of Lemierre syndrome: report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:458-465.
41. Citron DM. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. *Clin Infect Dis* 2002;35:S22-27.
42. Clarridge JE III, Zhang Q. Genotypic diversity of clinical *Actinomyces* species: phenotype, source, and disease correlation among genospecies. *J Clin Microbiol* 2002;40:3442-3448.
43. Collin MD, Hoyle L, Kalfas S, et al. Characterization of *Actinomyces* isolates from infected root canals of teeth: description of *Actinomyces radidentis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2000;38:3399-3403.
44. Collins MD, Lawson PA, Willems A, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:812-826.
45. Collins MD, Love DN, Karjalainen J, et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Porphyromonas* and description of *Porphyromonas gingivalis* sp. nov. and *Porphyromonas canisuli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:674-679.
46. Collins MD, Wallbanks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;74:235-240.
47. Cregan P, Fiss EH, Sullivan A, et al. Comparison of two BACTEC anaerobic culture media for recovery of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:239-242.
48. Dalmau D, Cayouene M, Lamothe F, et al. Clindamycin resistance in the *Bacteroides fragilis* group: association with hospital-acquired infections. *Clin Infect Dis* 1997;24:874-877.
49. Delaney ML, Onderdonk AB. Evaluation of the AnaeroPack system for growth of clinically significant anaerobes. *J Clin Microbiol* 1997;35:558-562.
50. Dellinger CA, Moore LV. Use of the RapID-ANA System to screen for enzyme activities that differ among species of bile-inhibited *Bacteroides*. *J Clin Microbiol* 1986;23:289-293.
51. Dorsher CW, Rosenblatt JE, Wilson WR, et al. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over a 15-year period. *Rev Infect Dis* 1991;13:633-636.
52. Dowell VR Jr. Botulism and tetanus: selected epidemiologic and microbiologic aspects. *Reviews of Infectious Diseases* 1984;6:S202-S207.
53. Dowell VR Jr, Hawkins TM. Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology. CDC Laboratory Manual. Washington, DC: Government Printing Office, 1981. DHHS publication no. (CDC) 81-8272.
54. Dowell VR Jr, Lombard GL. Presumptive identification of anaerobic non-spore-forming gram-negative bacilli. Atlanta: Centers for Disease Control, 1977.
55. Dowell VR Jr, Lombard GL. Differential agar media for identification of anaerobic bacteria. En: Tilton RC, ed. Rapid methods and automation in microbiology. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1982:258-262.
56. Dowell VR Jr, Lombard GL, Thompson FS, et al. Media for isolation, characterization, and identification of obligately anaerobic bacteria. Atlanta: Centers for Disease Control, 1977.
57. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:74-78.
58. Edwards R. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *J Med Microbiol* 1997;46:979-986.
59. Eley A, Clarry T, Bennett KW. Selective and differential medium for isolation of *Bacteroides ureolyticus* from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:83-85.
60. Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J, Dowell VR Jr. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology. Belmont, CA: Star, 1992.
61. Ezaki T, Kawamura Y, Li N, et al. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1521-1528.
62. Ezaki T, Li N, Hashimoto Y, et al. 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal of *Ruminococcus hanseni* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:130-136.
63. Ezaki T, Yamamoto N, Ninomiya K, et al. Transfer of *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus prevotii* and *Peptococcus magnus* to the genus *Peptostreptococcus* and proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1983;33:683-698.
64. Falagas ME, Siakavellas E. *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2000;15:1-9.
65. Fanourgiakis P, Vekemans M, Georgala A, et al. Febrile neutropenia and *Fusobacterium* bacteremia: clinical experience with 13 cases. *Support Care Cancer* 2003;11:332-335.
66. Felner JM, Dowell VR Jr. "*Bacteroides*" bacteremia. *Am J Med* 1971;50:787-796.
67. Finegold S. Changes in taxonomy, anaerobes associated with humans. 2001-2004. *Anaerobe* 2004;10:309-312.
68. Finegold SM. Anaerobic bacteria in human disease. New York, Academic Press, 1977.
69. Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2. 5th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000:2519-2537.
70. Finegold SM, George WL. Anaerobic infections in humans. San Diego, CA: Academic Press, 1989.
71. Finegold SM, Song Y, Liu C. Taxonomy: general comments and update on taxonomy of Clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe* 2002;8:283-285.
72. Finegold SM, Sutter VL, Sugihara PT, et al. Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. *Am J Clin Nutr* 1977;30:1781-1792.
73. Fisher RG, Denison MR. *Veillonella parvula* bacteremia without an underlying source. *J Clin Microbiol* 1996;34:3235-3236.
74. Funke C, Alvarez N, Pascual C, et al. *Actinomyces europaeus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:687-692.
75. Funke G, Stubbs S, von Graevenitz A, et al. Assignment of human-derived CDC group I coryneform bacteria and CDC group I-like coryneform bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces neuii* subsp. *neuii* sp. nov., subsp. nov., and *Actinomyces neuii* subsp. *anitratus* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:167-171.
76. Funke G, von Graevenitz A. Infections due to *Actinomyces neuii* (former "CDC coryneform group I" bacteria). *Infection* 1995;23:73-75.
77. George WL, Sutter VL, Citron D, et al. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1979;9:214-219.
78. Gerding DN. Diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease: patient selection and test perfection. *Am J Med* 1996;100:485-486.
79. Gerding DN. Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;250:127-139.
80. Gerding DN. Clindamycin, cephalosporins, norquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. *Clin Infect Dis* 2004;38:646-648.
81. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:459-477.
82. Gharbia SE, Shah HN. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:296-298.
83. Glupczynski Y, Labbe M, Crokaert F, et al. Isolation of *Mobiluncus* in four cases of extragenital infections in adult women. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:433-45.
84. Golan Y, McDermott LA, Jacobus NV, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance among *Bacteroides* species. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:208-213.
85. Goldstein EJ, Citron DM, Peraio VA, et al. Desulfobivrio disulfuricans bacteremia and review of human Desulfobivrio infections. *J Clin Microbiol* 2003;41:2752-2754.
86. Gorbach SL, Mayhew JW, Bartlett JG, et al. Rapid diagnosis of anaerobic infections by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens. *J Clin Invest* 1976;57:478-484.
87. Gregory EM, Moore WE, Holdeman LV. Superoxide dismutase in anaerobes: survey. *Appl Environ Microbiol* 1978;35:988-991.
88. Guibault C, Labbe AC, Poirier L, et al. Development and evaluation of a PCR method for detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:2288-2290.
89. Hagelskjaer Kristensen L, Prag J. Human necrobacillosis, with emphasis on Lemierre's syndrome. *Clin Infect Dis* 2000;31:524-532.
90. Hall V, Collin MD, Hutson R, et al. *Actinomyces cardiffensis* sp. nov. from human clinical sources. *J Clin Microbiol* 2002;40:3427-3431.
91. Hall V, Collins MD, Hutson RA, et al. *Actinobaculum urinale* sp. nov., from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:679-682.
92. Hall V, Collins MD, Hutson RA, et al. *Actinomyces oricola* sp. nov., from a human dental abscess. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1515-1518.

93. Hall V, Collins MD, Lawson PA, et al. *Actinomyces nasicola* sp. nov., isolated from a human nose. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1445-1448.
94. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Stactia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium sapenum* from pulpal and periradicular samples using the polymerase chain reaction (PCR) method. *Int Endod J* 2001;34:463-470.
95. Hatheway CL. Botulism. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Obashi M, et al., eds. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice*. Vol. I New York: Springer, 1988:111-133.
96. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:66-98.
97. Hatheway CL. Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;195:55-75.
98. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004;39:92-97.
99. Henry S, DeMaria A Jr, McCabe WR. Bacteremia due to *Fusobacterium* species. *Am J Med* 1983;75:225-231.
100. Hentges DJ. The anaerobic microflora of the human body. *Clin Infect Dis* 16:Suppl 1993;4:S175-S180.
101. Hentges DJ, Maier BR. Theoretical basis for anaerobic methodology. *Am J Clin Nutr* 1972;25:1299-1305.
102. Hill DA, Seaton RA, Cameron FM, et al. Severe sepsis caused by *Mobiluncus curtisi* subsp. *curtisi* in a previously healthy female: case report and review. *J Infect* 1998;37:194-196.
103. Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:450-454.
104. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:455-459.
105. Hirasawa M, Takada K. *Porphyromonas crevioricanis* sp. nov. and *Porphyromonas crevioricanis* sp. nov., isolated from beagles. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:637-640.
106. Holdeman LV, Cato EP, Moore WE. Taxonomy of anaerobes: present state of the art. *Rev Infect Dis* 1984;6:Suppl 1:S3-S10.
107. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe laboratory manual*. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
108. Holdeman LV, Johnson JL. *Bacteroides disiens* sp. nov. and *Bacteroides bivius* sp. nov. from human clinical infections. *Int J Syst Bacteriol* 1977;27:337-345.
109. Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC. Anaerobic gram-negative straight, curved, and helical rods. Family I. *Bacteroidaceae* Pribram 1933,10^{AL}. En: Krieg NR, Holt JC, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:602-662.
110. Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC. *Bacteroidaceae*. En: Krieg NR, Holt JC, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984:602-662.
111. Holdeman LV, Moore WEC. New genus *Coprococcus*: Twelve new species and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human species. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:260-277.
112. Holdeman LV, Moore WEC. *Anaerobe laboratory manual*. 4th ed. (Supplement). Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1987.
113. Holdeman LV, Moore WEC, Chum PJ, et al. *Bacteroides oris* and *Bacteroides buccae*: new species from human periodontitis and other human infections. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:125-131.
114. Hoyle L, Inganas E, Falsen E, et al. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:995-999.
115. Jiu W, Dong X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Sardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:809-812.
116. Johnson CC, Reinhardt JF, Edelstein MA, et al. *Bacteroides gracilis*, an important anaerobic bacterial pathogen. *J Clin Microbiol* 1985;22:799-802.
117. Johnson JL, Moore LV, Kaneko B, et al. *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:273-286.
118. Johnson JL, Moore WEC, Moore LVH. *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov., and *Bacteroides stercoris* sp. nov. isolated from human feces. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:499-501.
119. Johnnoll LL, McFuland LV, Dearing P, et al. Identification of *Clostridium difficile* in stool specimens by culture-enhanced gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1989;27:2218-2221.
120. Johnon S, Kent SA, O'Leary KJ, et al. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant *Clostridium difficile* strain not detected by toxin A immunoassay. *Ann Intern Med* 2001;135:434-438.
121. Jousimies-Somer H, Summanen P. Microbiology terminology update: clinically significant anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria (excluding spirochetes). *Clin Infect Dis* 1997;25:11-14.
122. Jousimies-Somer H, Summanen P. Microbiology terminology update: clinically significant anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria (excluding spirochetes). *Clin Infect Dis* 1999;29:724-727.
123. Jousimies-Somer H, Summanen P. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). *Clin Infect Dis* 2002;35:S17-S21.
124. Jousimies-Somer H, Summanen PH, Wexler H, et al. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and other anaerobic gram-negative bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, ASM Press, 2003:880-901.
125. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, et al. *Wadsworth-KTL*, anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. Belmont, CA: Star, 2002.
126. Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, et al. *Veillonella montpellierensis* sp. nov., a novel, anaerobic, gram-negative coccus isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1311-1316.
127. Kageyama A, Benno Y, Naicase T. Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfer of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:Pt 2:557-565.
128. Kalfa S, Figdor D, Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radicidentis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:208-214.
129. Kelly MT, Fojtasck MF, Abbott TM, et al. Clinical evaluation of a lysis-centrifugation technique for the detection of septicemia. *JAMA* 1983;250:2185-2188.
130. Killgore GE, Starr SE, Del Bene VE, et al. Comparison of three anaerobic systems for the isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 1973;59:552-559.
131. Kilpper-Bak R, Schleifer KH. Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* 1981; 2:324-331.
132. Kilpper-Bal R, Schleifer KH. Transfer of *Streptococcus morbillorum* to the genus *Gemella* as *Gemella morbillorum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:442-443.
133. Kirby BD, George WL, Sutter VL, et al. Gram-negative anaerobic bacilli: their role in infection and patterns of susceptibility to antimicrobial agents. I. Little-known *Bacteroides* species. *Rev Infect Dis* 1980;2:914-951.
134. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, 1992.
135. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
136. Kononen E, Eerola E, Frandsen EV, et al. Phylogenetic characterization and proposal of a new pigmented species to the genus *Prevotella*: *Prevotella pullens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:Pt 1:47-51.
137. Kooz FP, Flint KK, Reynolds JK, et al. Multicenter comparison of the high volume (10 ml) NR BACTEC PLUS system and the standard (5 ml) NR BACTEC system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991;14:111-118.
138. Koransky JR, Allen SD, Dowell VR Jr. Use of ethanol for selective isolation of spore-forming microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1978;35:762-765.
139. Koransky JR, Stargel MD, Dowell VR Jr. *Clostridium septicum* bacteremia: its clinical significance. *Am J Med* 1979;66:63-66.
140. Kornowski R, Schwartz D, Averbuch M, et al. Anaerobic bacteremia: a retrospective four-year analysis in general medicine and cancer patients. *Infection* 1993;21:241-244.
141. En: Krieg NR, Holt JC, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
142. Kronvall G, Myhre E. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol* 1977;85:249-254.
143. Landsaal PM, van der Lelie H, Bongaerts G, et al. *Fusobacterium nucleatum*, a new invasive pathogen in neutropenic patients? *Scand J Infect Dis* 1995;27:83-84.
144. Lark RL, McNeil SA, VanderHyde K, et al. Risk factors for anaerobic blood-stream infections in bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001;33:338-343.
145. Lawson PA, Falsen E, Akervall E, et al. Characterization of some *Actinomyces* like isolates from human clinical specimens. reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Sprattling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:899-903.
146. Lawson PA, Nikolaitchouk N, Faisen E, et al. *Actinomyces funkei* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:853-855.
147. Lee K, Baron EJ, Summanen P, et al. Selective medium for isolation of *Bacteroides gracilis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1747-1750.
148. Leme L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5710-5714.
149. Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, et al. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1696-1697.
150. Liu JW, Wu JJ, Wang LR, et al. Two fatal cases of *Veillonella* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:62-64.
151. Loesche WJ. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl Microbiol* 1969;18:723-727.
152. Lombard GL, Dowell VR Jr. Gas liquid chromatography: analysis of acid products of bacteria. Atlanta: Centers for Disease Control, 1982.
153. Lombardi DP, Engleberg NC. Anaerobic bacteremia: incidence, patient characteristics, and clinical significance. *Am J Med* 1992;92:53-60.
154. Lorber B. Gas gangrene and other clostridium-associated diseases. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bensen's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2549-2561.
155. Lorber B. *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* species (and other medically important anaerobic gram-negative bacilli). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone 2005:2838-2846.
156. Love DN. *Porphyromonas macacae* comb. nov., a consequence of *Bacteroides macacae* being a senior synonym of *Porphyromonas salivosa*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:90-92.
157. Love DN, Bailey GD, Collings S, et al. Description of *Porphyromonas circumdentaria* sp. nov. and reassignment of *Bacteroides salivosa* (Love, Johnson, Jones, and Calverley 1987) as *Porphyromonas* (Shah and Collins 1988) *salivosa* comb. nov.

- [published errata appear in Int J Syst Bacteriol 1992;42(4):660 and 1993; 43(3):630]. Int J Syst Bacteriol 1992;42:434-438.
158. Love DN, Johnson JL, Jones RF, et al. *Bacteroides salivovorus* sp. nov., an asaccharolytic, black-pigmented species from cats. IM J Syst Bacteriol 1987;37:307-309.
 159. Love DN, Karjalainen J, Kanervo A, et al. *Porphyromonas canoris* sp. nov., an asaccharolytic, black-pigmented species from the gingival sulcus of dogs. Int J Syst Bacteriol 1994;44:204-208.
 160. Lierly DM. *Clostridium difficile* testing. Clin Microbiol Newslett 1995;17:17.
 161. Lierly DM, Allen SD. The Clostridia. En: Emmerson AM, Hawkey P, Gillespie S, eds. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. New York: Wiley, 1997:559-623.
 162. Lierly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.
 163. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1997.
 164. Malnick H, Williams K, Phil-Ebosie J, et al. Description of a medium for isolating *Anaerobiospirillum* spp., a possible cause of zoonotic disease, from diarrheal feces and blood of humans and use of the medium in a survey of human, canine, and feline feces. J Clin Microbiol 1990;28:1380-1384.
 165. Mann C, Deninger S, Hanmann G, et al. *Actinomyces neuii* and neonatal sepsis. Infectio 2002;30:178-180.
 166. Marler LM, Siders JA, Allen SD. Direct Smear Atlas: A Monograph of Gram-Stained Preparations of Clinical Specimen. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
 167. Marler LM, Siders JA, Wolers LC, et al. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. J Clin Microbiol 1992;30:514-516.
 168. Martin WJ. Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. Appl Microbiol 1971;22.
 169. Mascini EM, Verhoef J. Anaerobic cocci. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2. Philadelphia, Elsevier, Churchill, Livingstone, 2005:2847-2849.
 170. Mascini EM, Verhoef J. Anaerobic gram-positive nonsporulating bacilli. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 2. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone, 2005:2849-2852.
 171. Mays TD, Holdeman LV, Moore WEC. Taxonomy of the genus *Veillonella* Prevot. Int J Syst Bacteriol 1982;32:28-36.
 172. McCord JM, Keele BB Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:1024-1027.
 173. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 1989;320:204-210.
 174. Millar JS. Enteritis necroticans: a review. Trop gastroenterol 1989;10:3-8.
 175. Mimo O, Karim A, Mercat A, et al. Chlorhexidine compared with povidoneiodine as skin preparation before blood culture: a randomized, controlled trial. Ann Intern Med 1999;131:834-837.
 176. Monciardini P, Sosio M. Reclassification as a *Nonomuraea* sp. of the strain ATCC 39727, producing the glycopeptide antibiotic A40926. J Antibiot (Tokyo) 2004;57:68-70.
 177. Moncla BJ, Hillier SL. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., eds. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:857-879.
 178. Moore LV, Johnson JL, Moore WE. Descriptions of *Prevotella tannerae* sp. nov. and *Prevotella enoea* sp. nov. from the human gingival crevice and emendation of the description of *Prevotella zoogloformans*. Int J Syst Bacteriol 1994;44:599-602.
 179. Moore LVH, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe laboratory manual update: supplements to the VPI anaerobe laboratory manual. 4th ed. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1987.
 180. Moore WEC. Chromatography for the clinical laboratory: all you wanted to know (and possibly more). API Species 1980;4:21-28.
 181. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Rev 1998;11:81-120.
 182. Murdoch DA. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. Anaerobe 1999;5:555-559.
 183. Murdoch DA, Shah HN, Gharbia SE, et al. Proposal to restrict the genus *Peptostreptococcus* (Kluyver & van Niel 1936) to *Peptostreptococcus anaerobius*. Anaerobe 2000;6:257-260.
 184. Murray PR, Traynor P, Hopson D. Critical assessment of blood culture techniques: analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles. J Clin Microbiol 1992;30:1462-1468.
 185. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard. 6th ed. Villanova, PA: NCCLS, 2004.
 186. Nguyen[P2] MH, Yu VL, Morris AJ, et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis 2000;30:870-876.
 187. Nikolaitchouk N, Hoyle L, Falsen E, et al. Characterization of *Actinomyces* isolates from samples from the human urogenital tract: description of *Actinomyces urogenitalis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50 Pt 4:1649-1654.
 188. Oteo J, Aracil B, Alos JL, et al. High prevalence of resistance to clindamycin in *Bacteroides fragilis* group isolates. J Antimicrob Chemother 2000;45:691-693.
 189. Peterson LR, Kelly PJ. The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Infect Dis Clin North Am 1993;7:277-291.
 190. Peterson LR, Kelly PJ, Nordhock HA. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:330-336.
 191. Pienaar C, Kruger AJ, Venter EC, et al. *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteremia. J Clin Pathol 2003;56:316-318.
 192. Prpic-Mehicic G, Maran T, Miletic I, et al. Infective endocarditis caused by *Veillonella* of dental origin. Coll Antropol 1998;22:Suppl:39-43.
 193. Pulverer G, Schutt-Gerowitt H, Schaul KP. Human cervicofacial actinomycosis: microbiological data for 1997 case. Clin Infect Dis 2003;37:490-497.
 194. Ramire S, Hikel TG, Rudolph CN, et al. Increased diagnosis of Lemierre syndrome and other *Fusobacterium necrophorum* infections at a Children's Hospital. Pediatrics 2003;112:e380.
 195. Ramos CP, Pulsen E, Alvarez N, et al. *Actinomyces graevenitzi* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1997;47:885-888.
 196. Rallo CP, Foster G, Collin MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1997;47:46-53.
 197. Reller LB, Murray PR, MacLowry JD, Cumitech IA. Blood Cultures II. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1982.
 198. Riordan T, Wilson M. Lemierre's syndrome: more than a historical curiosa. Postgrad Med J 2004;80:328-334.
 199. Rogosa M, Family I. *Veillonellaceae* Rogosa 1971. En: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984:680-685.
 200. Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, et al. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. Appl Environ Microbiol 1978;36:306-313.
 201. Rosenblatt JE, Fallon A, Finegold SM. Comparison of methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. Appl Microbiol 1973;25:77-85.
 202. Russo TA. Agent of actinomycosis. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease. Vol. 2. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000:2645-654.
 203. Sabbe LJ, Van De Merwe D, Schold L, et al. Clinical spectrum of infections due to the newly described *Actinomyces* species *A. turicensis*, *A. radingae*, and *A. europaeus*. J Clin Microbiol 1999;37:8-13.
 204. Sakamoto M, Suzuki M, Huang Y, et al. *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:877-883.
 205. Sarkonen N, Kononen E, Summanen P, et al. Phenotypic identification of *Actinomyces* and related species isolated from human sources. J Clin Microbiol 2001;39:3955-3961.
 206. Schaal KP. Actinomycosis, actinobacillosis and related diseases. En: Hausler WJJ, ed. Bacterial Infections. Vol. 3. 9th ed. London: Arnold, 1998:777-798.
 207. Schilman RB, Strand CL, Meier FA, et al. Blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Probes study involving 640 institutions and 497134 specimens from adult patient. Arch Pathol Lab Med 1998;122:216-221.
 208. Seip WF, Evans GL. Atmospheric analysis and redox potentials of culture media in the GasPak System. J Clin Microbiol 1980;11:226-233.
 209. Shah HN, Collin DM. Proposal for re-classification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. Int J System Bacteriol 1988;38:128-131.
 210. Shah HN, Collins DM. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. Int J Syst Bacteriol 1989;39:85-87.
 211. Shah HN, Collins DM. *Prevotella* a new genus to include *Bacteroides melanogonicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol 1990;40:205-208.
 212. Shah HN, Collins MD, Olsen I, et al. Reclassification of *Bacteroides levii* (Holdeman, Cato, and Moore) in the genus *Porphyromonas*, as *Porphyromonas levii* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1995;45:586-588.
 213. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1992;42:542-546.
 214. Shah HN, Gharbia SE. Proposal of a new species *Prevotella nigrescens* sp. nov. among strains previously classified as *Pr. intermedia*. FEMS Immunol Med Microbiol 1993;6:97.
 215. Shahin M, Jamal W, Verghese T, et al. Comparative evaluation of anoxomat and conventional anaerobic GasPak jar systems for the isolation of anaerobic bacteria. Med Princ Pract 2003;12:81-86.
 216. Shinjo T, Hiraawa K, Miyazato S. Recognition of biovar C of *Fusobacterium necrophorum* (Flügge) Moore and Holdeman as *Fusobacterium pseudonecrophorum* sp. nov., nom. rev. (ex Prevot 1940). Int J Syst Bacteriol 1910;40:71-73.
 217. Siders JA. Gas-liquid chromatography. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Clinical Microbiology, 1992:2-6.
 218. Siqueira JF Jr, Roca IN. Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infection associated with different forms of periradicular diseases. Oral Microbiol Immunol 2003;18:263-265.
 219. Siqueira JF Jr, Roca IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont 2003;96:215-222.

220. Smith HJ, Moore HB. Isolation of *Mobiluncus* species from clinical specimen by using cold enrichment and selective media. *J Clin Microbiol* 1988;26:1134-1137.
221. Smith LDS. Botulism: the Organism Its Toxins. The Disease. Springfield IL: Charles C Thomas, 1977.
222. Smith LDS, Williams BL. The pathogenic anaerobic bacteria. 3^d ed. Springfield IL: Charles C Thomas, 1984.
223. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.
224. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group: report and analysis of trends for 1997-2000. *Clin Infect Dis* 2002;35:S126-S134.
225. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000;51:349-356.
226. Song Y, Liu C, McTeague M, et al. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol* 2003;41:1363-1369.
227. Song Y, Liu C, Molitoris D, et al. Use of 16S-23S rRNA spacer-region (SR)-PCR for identification of intestinal clostridia. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:528-535.
228. Song Y, Liu C, Molitoris DR et al. *Clostridium bolteae* sp. nov. isolated from human sources. *Syst Appl Microbiol* 2003;26:84-89.
229. Song YL, Liu CX, McTeague M, et al. *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe* 2004;10:179-184.
230. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:485-502.
231. Spiegel CA, Robens M. *Mobiluncus* gen. nov., *Mobiluncus curtisii* subsp. *curtisii* sp. nov., and *Mobiluncus mulieris* sp. nov., curved rods from the human vagina. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:177-184.
232. Stanek JL, Weckbach LS, Allen SD, et al. Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture and latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1996;34:2718-2721.
233. Sargel MD, Lombard GL, Dowell VR Jr. Alternative procedures for identification of anaerobic bacteria. *Am J Med Technol* 1978;44:709-722.
234. Steer T, Collins MD, Gibson GR, et al. *Clostridium hathewayi* sp. nov., from human faeces. *Syst Appl Microbiol* 2001;24:353-357.
235. Tally FP, Goldin BR, Jacobus NV, et al. Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. *Infect Immun* 1977;16:20-25.
236. Taras D, Simmering R, Collins MD, et al. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 a *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:423-428.
237. Thatcher P. Hepatic abscesses caused by *Fusobacterium necrophorum* as part of the Lemierre syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:196-197.
238. Tiveljung A, Forsum U, Monsein HJ. Classification of the genus *Mobiluncus* based on comparative partial 16S rRNA gene analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:332-336.
239. Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, et al. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:667-670.
240. Tzianabos AO, Kasper DL. Anaerobic infections: general concepts. En: Mandell GL, Benne JE, Dolin R. eds. *Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:2810-2816.
241. Van Kessel LJ, Verbrugh HA, Stringer MF, et al. Necrotizing enteritis associated with toxigenic type A *Clostridium perfringens*. *J Infect Dis* 1985;151:974-975.
242. van Winkelhoff AJ, Clemen M de Graaff J. Rapid characterization of oral and non-oral pigmented *Bacteroides* species with the ATB Anaerobes ID system. *J Clin Microbiol* 1988;26:1063-1065.
243. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, Kippuw N, et al. Further characterization of *Bacteroides endodontalis* an asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species from the oral S cavity. *J Clin Microbiol* 1985;22:75-79.
244. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, Kippuw N, et al. Enzymatic characterization of oral and non-oral black-pigmented *Bacteroides* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1986;52:163-171.
245. Vandamme P, Danevar MI, Dewhirst FF, et al. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Compylobacter gracilis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:145-152.
246. Vandamme P, Falsen E, Vancanneyt M, et al. Characterization of *Actinomyces turicensis* and *Actinomyces radingae* strains from human clinical samples. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48 Pt 2:503-510.
247. Wade WG, Downes J, Dymock D, et al. The family *Coriobacteriaceae*: reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco et al. 1996) and *Peptostreptococcus heliotrinireducens* (Lanigan 1976) as *Slackia exigua* gen. nov., comb. nov. and *Slackia heliotrinireducens* gen. nov., comb. nov., and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49 Pt 2:595-600.
248. Walden WC, Hentges DJ. Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl Microbiol* 1975;30:781-785.
249. Walker PD, Pig-Bel. En: Borriello SP, ed. *Clostridia in Gastrointestinal Disease*. Boca Raton: CRC Press, 1985:94-115.
250. Washington JA. Evolving concepts on the laboratory diagnosis of septicemia. *Infect Dis Clin Pract* 1993;2:65.
251. Washington JA. Collection, transport, and processing of blood cultures. *Clin Lab Med* 1994;14:59-68.
252. Washington JA II, Ilstrup DM. Blood cultures: issues and controversies. *Rev Infect Dis* 1986;8:792-802.
253. Watson DA, Andrew JH, Banting S, et al. Pig-bel but no pig: enteritis necroticans acquired in Australia. *Med J Aust* 1991;155:47-50.
254. Weinstein MP, Reller LB, Mirrett S, et al. Controlled evaluation of Trypticase soy broth in agar slide and conventional blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1985;21:626-629.
255. Weinstein MP, Relier LB, Murphy JR, et al. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis* 1983;5:35-53.
256. Westh H, Christensen JJ, Blom J, et al. Fatal septicaemia with *Selenomonas sputigena* and *Acinetobacter calcoaceticus* a case report. *APMIS* 1991;99:75-77.
257. Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: the state of the art. *Clin Infect Dis* 1993;16:S328-333.
258. Whaley DN, Gorman GW. An inexpensive device for evacuating and gassing anaerobic systems with in-house vacuum. *J Clin Microbiol* 1977;5:668-669.
259. Whaley DN, Wiggs LS, Miller PH, et al. Use of Presumptive Plates to identify anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:1196-1202.
260. Wilcox MH, Fawley WN. Virulence of *Clostridium difficile* toxin A negative strains. *J Hosp Infect* 2001;48:81.
261. Willems A, Collins MD. 16S rRNA gene similarities indicate that *Hallella seregens* (Moore and Moore) and *Mitsuokella dentalis* (Haapsalo et al.) are genealogically highly related and are members of the genus *Prevotella*: emended description of the genus *Prevotella* (Shah and Collins) and description of *Prevotella dentalis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:832-836.
262. Willems A, Collins MD. Reclassification of *Oribaculum catoniae* (Moore and Moore 1994) as *Porphyromonas catoniae* comb. nov. and emendation of the genus *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:578-581.
263. Willems A, Collins MD. Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:1083-1087.
264. Wilson ML, Harrell LJ, Mirrett S, et al. Controlled evaluation of BACTEC PLUS 27 and Roche Septi-Chek anaerobic blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1992;30:63-66.
265. Woo PC, Fung AM, Lau SK, et al. *Actinomyces hongkongensis* sp. nov. a novel *Actinomyces* species isolated from a patient with pelvic actinomycosis. *Syst Appl Microbiol* 2003;26:518-522.
266. Wust J, Stubbs S, Weiss N, et al. Assignment of *Actinomyces pyogenes*-like (CDC coryneform group E) bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces radingae* sp. nov. and *Actinomyces turicensis* sp. nov. *Leti Appl Microbiol* 1995;20:76-81.

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

<http://booksmedicos.org>

Reseña histórica

Resistencia bacteriana a los antibióticos

Variables que intervienen

Mecanismos de resistencia

Transporte de antibióticos a través de la pared
y las membranas celulares

Antibióticos que interfieren en la formación
de las paredes de las células bacterianas:
 β -lactámicos y glucopéptidos

Antibióticos que no actúan sobre la pared
celular

Interacciones entre los mecanismos
de resistencia

El laboratorio como guía del tratamiento antibiótico

Pruebas para determinar la actividad inhibitoria de los antibióticos

Indicaciones

Elección de la prueba

Selección de antibióticos

Estandarización

Medio de cultivo

pH

Suero

Concentración de cationes

Atmósfera

Temperatura

Inóculo

Antibióticos

Control de calidad

Garantía de calidad

Interpretación de los resultados

Selección de los antibióticos
para el informe

Antibiograma por macrodilución
en caldo

Antibiograma por dilución en agar

Antibiograma por difusión con discos

Desarrollo de un procedimiento estandarizado
para pruebas de difusión con discos

Interpretación de los resultados

Control de calidad

Limitaciones

Antibiograma por microdilución
en caldo

Sistemas comerciales

Vitek y MicroScan

Prueba del epsilómetro

Problemas especiales con las pruebas de sensibilidad

β -lactamasas

Especies de *Staphylococcus*

Especies de *Haemophilus*

Neisseria gonorrhoeae

Moraxella (Branhamella) catarrhalis

Especies de *Enterococcus*

β -lactamasas de espectro ampliado

Especies de *Staphylococcus*

Antibióticos β -lactámicos (especies de
Staphylococcus resistentes a la oxacilina)

Vancomicina

Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Fluoroquinolonas

Especies de *Haemophilus*

Penicilinas
Cloranfenicol
Cefalosporinas
Trimetoprim-sulfametoxazol

Streptococcus pneumoniae

Penicilina y otros antibióticos β -lactámicos
Resistencia múltiple
Macrólidos y lincosamidas

Neisseria gonorrhoeae***Neisseria meningitidis*****Especies de *Enterococcus***

Antibióticos aminoglucósidos
Antibióticos β -lactámicos
Vancomicina

Listeria monocytogenes***Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β -hemolítico grupo A)**

Penicilina
Eritromicina
Fluoroquinolonas

Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* β -hemolítico grupo B)**Streptococcus viridans*****Otras bacterias grampositivas**

Pseudomonas aeruginosa, *Burkholderia cepacia*
y *Stenotrophomonas maltophilia* en pacientes
con fibrosis quística

Pruebas de sensibilidad directa

Reseña histórica

La función básica de quienes trabajan en el laboratorio de microbiología clínica es proporcionar información con la cual los médicos puedan diagnosticar y tratar enfermedades infecciosas. Ante una enfermedad transmisible, la identificación de un patógeno específico es de suma importancia para el epidemiólogo de un hospital o el trabajador de salud pública. La identificación de un microorganismo que ha sido aislado en una muestra clínica a menudo beneficia al paciente al identificar en forma precisa una enfermedad hasta entonces incierta y ayudar a la elección inicial de la antibioticoterapia. Sin embargo, los dos elementos de información más importantes para un médico son: 1) si se presenta un agente infeccioso y 2) cuál es el antibiótico que proporcionaría un tratamiento adecuado.

Estas prioridades se establecieron en estrecha vinculación con uno de los grandes adelantos médicos del siglo xx: el descubrimiento de la penicilina.⁸⁸ En 1928, Alexander Fleming observó el crecimiento de un hongo contaminante en una placa de cultivo que había quedado abierta al aire por descuido. Además, las colonias de bacterias que crecían en las adyacencias del hongo estaban sufriendo lisis (fig. 17-1). Fleming arribó a la conclusión correcta de que el hongo, identificado más tarde como una cepa de *Penicillium notatum*, estaba produciendo una sustancia bacteriolítica difusible capaz de destruir bacterias. El antibiótico desconocido de Fleming, más tarde denominado penicilina, fue el precursor del advenimiento de la era antibiótica moderna. La aplicación práctica del descubrimiento de Fleming no comenzó hasta 1939, cuando Florey y Chain crearon una técnica práctica por medio de la cual se podía obtener el extracto antibiótico de *Penicillium* con la pureza y en la cantidad suficiente para usarlo en los seres humanos.

La necesidad de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos se hizo evidente poco después de la comercialización de los antibióticos. Antes de la Segunda Guerra Mundial, la producción de penicilina era limitada y extremadamente costosa. Durante ese conflicto armado, se descubrieron otros antibióticos y se establecieron patrones de sensibilidad contra distintos

microorganismos. En relación con un arraigado interés por los microbios del suelo, Waksman descubrió la estreptomicina en 1943 y Dubos, la gramicidina y la tirocidina poco después. La investigación de Duggar condujo al descubrimiento de la clortetraciclina (aureomicina) por los laboratorios Lederle (Pearl River, NY) en 1944. Si bien estos nuevos antibióticos eran realmente “fármacos maravillosos” en el momento de su introducción, no pasó mucho tiempo antes de que aparecieran cepas bacterianas resistentes. Las pruebas de sensibilidad (antibiogramas) se convirtieron en una necesidad práctica.

El optimismo inicial acerca de que los antibióticos puedan poner fin a la infección bacteriana ha dado lugar a una aceptación reticente de que los recursos farmacológicos deben ser manejados con prudencia para controlar la enfermedad.²²¹ Algunas bacterias, como *Streptococcus pyogenes* (estreptococos β -hemolíticos del grupo A), han mantenido su sensibilidad predecible a la penicilina. Lamentablemente, esta sensibilidad persistente es la excepción en lugar de la regla. Las bacterias han sido tan inventivas que se han aislado cepas que necesitan la presencia de un antibiótico terapéutico para su crecimiento.^{92,166} La ingenuidad de los químicos de la industria farmacéutica ha sido grande y se refleja en la gran cantidad de antibióticos con que cuentan los médicos (cuadro 17-1).

Resistencia bacteriana a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia bacteriana son complejos, variados y no se conocen por completo. Los lectores interesados pueden consultar una explicación excelente en *Enfermedades Infecciosas, Principio y Práctica* de Mandell²³⁵ y varias revisiones amplias de los principales mecanismos de resistencia hallados en los patógenos humanos más importantes.^{89,104,248} Las herramientas de la biología molecular han mejorado mucho nuestro conocimiento sobre los mecanismos de resistencia. Para el microbiólogo clínico, el resultado a veces puede ser intimidante: terminología poco amigable e ideas extremadamente complejas. Sin embargo, vale la pena tomarse tiempo para comprender al menos los principios básicos debido a la

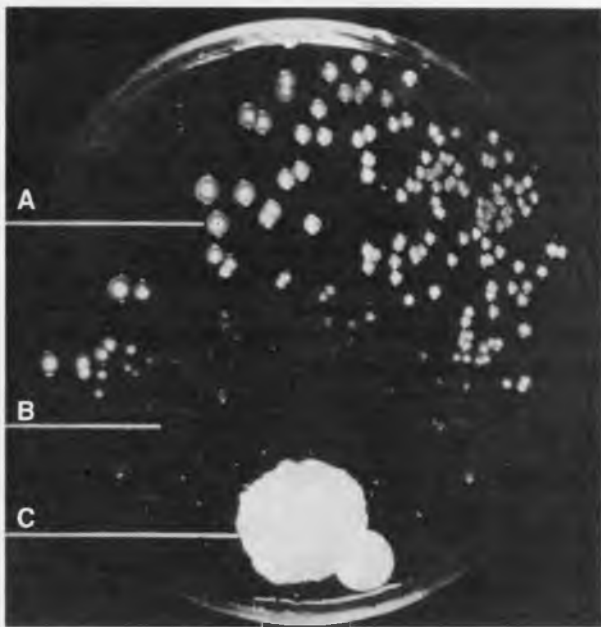


Figura 17-1 Reconstrucción del descubrimiento de Fleming de la acción antibiótica de *Penicillium*. En el laboratorio de Fleming, las colonias de *Bacillus* (*Haemophilus*) *influenzae* fueron inhibidas por el hongo "contaminante". En esta reconstrucción, se observan colonias de estafilococos que crecen en A; una colonia contaminante de *Penicillium* está creciendo en C. Las colonias de *Staphylococcus* que rodean a la colonia del hongo en el área B están poco desarrolladas y sufren lisis causada por una sustancia antibiótica producida por el hongo. Esta sustancia desconocida fue denominada más tarde penicilina.

singularidad de los sistemas biológicos y también por la mayor sofisticación con la cual se pueden tomar las decisiones clínicas cotidianas. Explicaremos a continuación los mecanismos y los microorganismos individuales.

Variables que intervienen

Para comprender los mecanismos de resistencia bacteriana es necesario conocer la fisiología bacteriana, la farmacología de los antibióticos y la biología molecular de los agentes infecciosos. Algunas de las variables importantes necesarias para comprender los mecanismos de resistencia se mencionan en el cuadro 17-2.

Los genes para el mecanismo de resistencia pueden estar localizados sobre el cromosoma o sobre un elemento extracromosómico denominado plásmido. Los plásmidos son piezas circulares de DNA que actúan en forma independiente del cromosoma. La importancia práctica de la diferencia es que el DNA cromosómico es relativamente estable, mientras que el DNA del plásmido se moviliza con facilidad de una cepa a otra, una especie a otra o incluso un género a otro. Además, la conexión de los genes de resistencia para múltiples antibióticos sobre un plásmido permite la transferencia masiva de resistencia que caracteriza a muchos microorganismos con resistencia reciente.²⁷⁴

El mecanismo más frecuente por medio del cual se transfieren los genes de resistencia es la conjugación. Es necesario otro factor de transferencia genética antes de que un plásmido que transporta un gen de resistencia pueda pasar de un microorganismo a otro. El mecanismo de transferencia delineado más

recientemente es el transposón (elemento genético transponible).²⁸³ Los transposones pueden transportar porciones de plásmidos. Lo más importante es que también pueden transportar un trozo del cromosoma de una bacteria a otra por transferencia de conjugación (transposón conjugativo o "gen saltador"). El resultado puede ser un mosaico de material genético de las bacterias donante y receptora.¹⁸⁹ Se ha documentado la transferencia de resistencia a los antibióticos a través de las barreras existentes entre bacterias grampositivas y gramnegativas.⁵¹ No debe desestimarse la importancia que la transferencia horizontal de resistencia a los antibióticos tiene y tendrá en las enfermedades infecciosas.

Un mecanismo de resistencia puede ser expresado en forma permanente ya sea que se presente o no una exposición desencadenante. Este estado se denomina expresión constitutiva. Por el contrario, algunos genes deben ser "inducidos" por la exposición a una sustancia incitadora antes de que se produzca el producto genético inducido. La β -lactamasa estafilocócica (penicilinas) es un ejemplo de una enzima inducible. Está presente sobre un plásmido y no es producida a menos que las bacterias estén expuestas a un antibiótico β -lactámico, como la penicilina, después de lo cual se activa la producción de la enzima. Muchas β -lactamasas de las bacterias gramnegativas están presentes en el cromosoma y son producidas constitutivamente, pero pueden ser inducidas a producir incluso concentraciones mayores de la enzima.

Algunas enzimas son secretadas activamente en el medio ambiente extracelular, donde pueden ejercer su acción antibacteriana. Las β -lactamasas estafilocócicas son secretadas. Por el contrario, la mayoría de las enzimas de las bacterias gramnegativas están unidas a la célula de modo que ejercen sus efectos sólo si el antibiótico entra en la pared de la célula bacteriana.

Por último, algunos mecanismos de resistencia se expresan en forma homogénea, mientras que otros lo hacen en forma heterogénea. La expresión homogénea o uniforme de un factor facilita la detección de dicho factor en el laboratorio. Si sólo una pequeña fracción de las bacterias expresa el mecanismo de resistencia (expresión heterogénea o heterorresistencia), el error de muestreo puede comprometer la detección de la resistencia en el laboratorio.

Un hallazgo fascinante pero perturbador es la documentación de que algunos antibióticos producen un aumento transitorio de las mutaciones de las bacterias.²⁰ Por lo tanto, es posible que los antibióticos no sólo sirvan como selectores de clones resistentes a los antibióticos, sino también como promotores primarios de resistencia.

Mecanismos de resistencia

Los mecanismos por medio de los cuales se expresa la resistencia en las bacterias se resumen en el cuadro 17-3 y la figura 17-2.

Se considerará primero el transporte de los antibióticos hasta el sitio de acción en la célula bacteriana, porque es importante para todos los compuestos y todas las bacterias. Otros mecanismos de resistencia se considerarán en forma separada para los antibióticos que son activos contra las paredes celulares (los antibióticos β -lactámicos, el grupo único más importante de antibióticos, y los glucopéptidos) y para los que actúan mediante otros mecanismos. Se debe señalar desde el principio que se puede hallar en la mayoría de las bacterias casi cualquier mecanismo de resistencia y que a menudo se encuentran diversos mecanismos en un solo microorganismo (cuadro 17-4).

Cuadro 17-1 Clasificación de los antibióticos

CLASE	GRUPO	EJEMPLOS
β -lactámicos	Penicilinas naturales	Penicilina G, penicilina V
	Penicilinas resistentes a la penicilinas	Meticilina, nafcilina
	Penicilinas resistentes a la penicilinas: penicilinas isoxazólicas	Cloxacilina, dicloxacilina, ofloxacina
	Aminopenicilinas	Amoxicilina, ampicilina
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina, ticarcilina
	Ureidopenicilinas	Azlocilina, mezlocilina, piperacilina
	Cefalosporinas de primera generación	Cefazolina, cefalotina, cefapirina, cefradina
	Cefalosporinas de segunda generación	Cefamandol, cefonicida, cefuroxima
	Cefamicinas	Cefmetazol, cefotetán, cefoxitina
	Cefalosporinas de tercera generación	Cefoperaxona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona
	Cefalosporinas de cuarta generación	Cefipima
	Cefalosporinas disponibles para uso oral	Cefaclor, cefadroxilo, cefdinir, cefditorel, ceftamet, cefixima, cefpodoxima, cefprozilo, cefibuteno, cefuroxima (axetilo), cefalexina, cefradina
	Carbacefem	Loracarbef
	Monobactámicos	Aztreonam
	Carbapenémicos	Ertapenem, imipenem, meropenem
	Combinaciones β -lactamas-inhibidor de la β -lactamasa	Amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulánico
Aminociclitolos		Espectinomina, trospectinomina
Aminoglucósidos		Amikacina, gentamicina, kanamicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina
Ansamicinas		Rifampicina
Macrólidos		Azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina
Lincosamidas		Clindamicina
Glucopéptidos	Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina
	Lipopéptidos	Daptomicina
Quinolonas	Quinolonas	Cinoxacina, garenoxacina, ácido nalidixico
	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, clinafloxacina, enoxacina, fleroxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina
Oxazolidinonas		Linezolida
Estreptograminas		Quinupristina-dalfopristina
Inhibidores de las vías del folato		Sulfamidas, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol
Fosfomicinas		Fosfomicina
Cetólidos		Telitromicina
Lipopéptidos		Daptomicina
Nitrofuranos		Nitrofurantoina
Nitroimidazoles		Metronidazol
Fenicoles		Cloranfenicol
Tetraciclinas		Doxiciclina, minociclina, tetraciclina

Adaptado de Glossary I, MIC testing, Supplementary Tables, NCCLS.²¹⁸

Cuadro 17-2 Variables en la expresión y la transferencia de la resistencia bacteriana

CARACTERÍSTICA	VARIABLE	COMENTARIOS
Localización	Cromosómica	Estabilidad genética; expresión a menudo constitutiva
	Extracromosómica	Plásmidos fácilmente movilizados para la transferencia entre células bacterianas
	Transposón	Puede transferir material genético entre el cromosoma y el plásmido o entre células bacterianas
Transferencia	Conjugación	Plásmidos (factor R) o transposones
	Transducción	Transferencia por bacteriófagos
	Transformación	Transferencia directa de DNA entre especies compatibles
Expresión	Constitutiva	Producida con la exposición a un estímulo o sin ella
	Inducible	Producida sólo después de la exposición al estímulo
	Constitutiva-inducible	Producida a bajo nivel sin estímulo; producción muy aumentada después de la estimulación

No debe desestimarse la importancia de múltiples mecanismos de resistencia, a menudo complementarios, en las especies bacterianas. Cuando un representante farmacéutico se jacta de que debe utilizarse el antibiótico de su compañía debido a su eficacia contra las cepas resistentes prevalentes, debe asegurarse que sólo es cuestión de tiempo antes de que las bacterias desarrollen resistencia también a ese producto.

TRANSPORTE DE ANTIBIÓTICOS A TRAVÉS DE LA PARED Y LAS MEMBRANAS CELULARES

La acumulación de antibióticos en su sitio de acción en la célula bacteriana es la suma del transporte en la célula, la inactivación durante el proceso de transporte y la depuración del antibiótico desde la célula. Consideraremos primero el proceso de movimiento anterógrado a través de la/s membrana/s. Para comprender el transporte de moléculas hacia el sitio activo es necesario considerar las diferencias estructurales entre las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias son microorganismos procariontes y tanto las especies grampositivas como gramnegativas contienen una mezcla de ácidos nucleicos, ribosomas y otra maquinaria celular en su citoplasma (fig.

17-3). Las bacterias grampositivas tienen una única membrana celular con una capa externa generosa de peptidoglucano (figs. 17-3A y 17-4). Para los antibióticos glucopéptidos y β -lactámicos que probablemente no tienen que atravesar la membrana plasmática para ejercer su actividad antibiótica, el transporte a través de las membranas de las bacterias grampositivas no constituye un problema.

Las bacterias gramnegativas tienen una membrana plasmática interna y una membrana celular externa, entre la cual hay una capa delgada de peptidoglucano (figs. 17-3B y 17-5). La permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el transporte de las moléculas a través de las barreras son muy importantes para las bacterias gramnegativas, que tienen dos membranas que obstaculizan la llegada de los antibióticos a sus dianas intracelulares.

Se considerará primero la membrana celular externa, que es una barrera fundamental para todos los antibióticos. Se han publicado varias revisiones excelentes sobre el tema.^{180,226,229} El método más sencillo para el ingreso de los fármacos en la célula es la difusión directa a través de la membrana lipídica, pero incluso las sustancias muy hidrófobas no atraviesan la bicapa lipídica con eficacia. La razón para este bloqueo de la difusión

Cuadro 17-3 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

MECANISMO	GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	EJEMPLOS
Inactivación enzimática	β -lactámicos	β -lactamasas: penicilinasas; cefalosporinasas; carbapenemasas
	Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de los aminoglucósidos de las bacterias gramnegativas y grampositivas
Alteración de los receptores	β -lactámicos	Proteínas de unión a penicilina alteradas de las bacterias gramnegativas y grampositivas
	Alteraciones ribosómicas	Tetraciclina; eritromicina; aminoglucósidos
	Alteraciones de la DNA girasa	Quinolonas
	Enzimas bacterianas alteradas	Sulfametoxazol; trimetoprim
Alteración del transporte de antibióticos	Alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas)	Bacterias gramnegativas; ingreso reducido
	Reducción de la fuerza impulsora proteica	Aminoglucósidos y bacterias gramnegativas; ingreso reducido
	Transporte activo desde las células bacterianas	Tetraciclina; eritromicina; salida activa

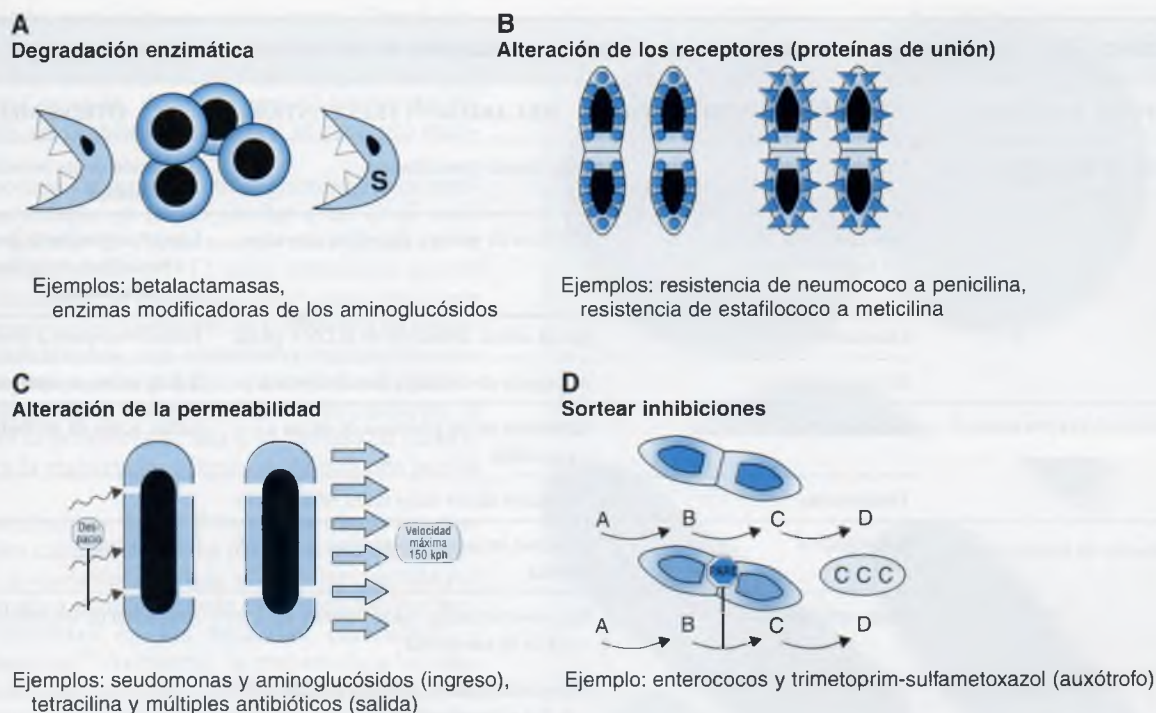


Figura 17-2 Se muestran las cuatro clases más importantes de resistencia microbiana a los antibióticos. **(A)** La inactivación enzimática de los antibióticos por las β -lactamasas (S) producidas por las células estafilocócicas está representada por las caricaturas de tiburones. Otras clases de antibióticos son degradados por otras enzimas, como las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos o la cloranfenicol acetiltransferasa. **(B)** El segundo mecanismo en importancia es el cambio en los receptores para la fijación del antibiótico a estructuras críticas, representadas aquí por la alteración de las proteínas de unión normales (círculos) sobre las membranas celulares de las bacterias grampositivas a las proteínas de unión con una afinidad reducida por los antibióticos (triángulos). También son importantes los cambios en la afinidad de los receptores por otros antibióticos, como la DNA girasa y las quinolonas o los ribosomas y los aminoglucósidos. **(C)** Una tercera clase de mecanismo está representada por el efecto de la permeabilidad de la membrana sobre la resistencia a varias clases de antibióticos en las bacterias gramnegativas. El bacilo gramnegativo de la izquierda limita la entrada de los antibióticos mediante cambios en las proteínas transportadoras, como las porinas. El bacilo de la derecha bombea antibióticos hacia el exterior de la célula tan rápidamente que no pueden acumularse en el citoplasma. **(D)** Por último, un microorganismo puede sortear un bloqueo metabólico impuesto por un antibiótico, como el que se ilustra entre trimetoprim-sulfametoxazol y los enterococos. El bloqueo metabólico producido por los antibióticos entre los pasos B y C es obviado cuando las bacterias obtienen el compuesto C preformado in vivo.

es en parte la naturaleza polarizada y asimétrica de la membrana celular externa bacteriana, que tiene lipopolisacáridos con el lípido A y un oligosacárido unido a la cara externa de la membrana solamente.

Proteínas porinas y difusión a través de la membrana externa. Para muchos antibióticos, incluido el grupo β -lactámico, el medio primario de transporte a través de la membrana externa de las bacterias entéricas es un grupo notable de proteínas de membrana, denominadas porinas (fig. 17-5).^{228,229,346} Se han identificado dos proteínas porinas mayores en *E. coli*, la especie más estudiada: un gran canal de porina designado Omp F (outer-membrane-protein F, proteína F de la membrana externa) y una pequeña porina de canal denominada Omp C.³⁴⁶ Se produce un tercer canal denominado PhoE en los mutantes que carecen tanto de Omp F como de Omp C, pero este canal no parece ser sustancial para el movimiento de los antibióticos.²²⁸ Factores como la carga sobre la molécula y la hidrofobicidad del compuesto desempeñan un papel importante (fig. 17-6). Las moléculas con carga negativa se mueven más lentamente a través de la membrana que las moléculas con carga más positiva o que los iones dipolares (zwiteriones, compuestos con cargas positivas y negativas equilibradas). Se presume que las cargas negativas hacen que el antibiótico “se cuelgue” cuando atraviesa el canal porina de carga negativa. La exclusión de los compuestos

hidrófobos del medioambiente acuoso de la porina puede explicar la falta de eficacia del compuesto hidrófobo meticilina contra las bacterias gramnegativas. Asimismo, los β -lactámicos con cadenas laterales grandes y voluminosas, como mezlocilina, piperacilina y cefoperazona, también atraviesan poco la membrana. En un estudio, el “mejor rendimiento” entre los β -lactámicos fue el del imipenem, un compuesto hidrófilo dipolar con una estructura muy compacta.³⁴⁶ Se ha propuesto que la explicación de la sensibilidad de *Enterobacter cloacae* al imipenem en presencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación es la mayor accesibilidad del imipenem a las moléculas diana, mediada por el rápido tránsito probablemente a través de varios canales de porina.²⁴⁶

La influencia de la porina sobre la sensibilidad está bien ilustrada por un interesante caso comunicado por Medeiros y cols. (fig. 17-7).²⁰¹ Estos investigadores aislaron una cepa de *Salmonella typhimurium* que contenía dos proteínas porinas, OmpF y OmpC (aislamiento 1). Una cepa variante aislada en el mismo paciente produjo sólo la proteína OmpF (aislamiento 2). Las dos cepas produjeron una β -lactamasa similar. En medios de baja osmolalidad, la cepa 1 produjo las proteínas F y C, mientras que la cepa 2 produjo sólo la proteína F, la porina de canal grande. En condiciones de alta osmolalidad, como las que podrían ocurrir en los tejidos del paciente, la síntesis de la

Cuadro 17-4 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en las bacterias de más relevancia clínica

TIPO DE BACTERIA	GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	MECANISMO/S FRECUENTE/S	OTRO/S MECANISMO/S
<i>Especies de Staphylococcus</i>	Penicilinas	β -lactamasa (penicilinas)	Alteración de las proteínas de unión a penicilina
	Penicilinas resistentes a la penicilinas	Proteínas de unión a penicilina alteradas	Límite: alteración de las proteínas de unión a penicilina; metilinas; hiperproducción de β -lactamas
	Quinolonas	Salida activa; alteración de la DNA girasa	Escaso transporte a través de la membrana
	Eritromicina	Alteración de los sitios diana ribosómicos	Salida activa de antibióticos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β -lactámicos	Alteración de las proteínas de unión a penicilina	Salida activa de antibióticos
	Eritromicina	Alteración de los sitios diana ribosómicos	
<i>Especies de Enterococcus</i>	β -lactámicos	Proteínas de unión a penicilina de baja afinidad	β -lactamasa
	Aminoglucósidos	Baja concentración: escaso transporte a través de la membrana Alta concentración: enzimas modificadoras de los aminoglucósidos	Alteración de los sitios de unión ribosómicos
	Glucopéptidos	Alteración de las proteínas de unión	
<i>Haemophilus influenzae</i>	Penicilinas	β -lactamasa (penicilinas)	Alteración de las proteínas de unión a penicilina
	Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferasa	Alteración del transporte de la membrana
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Penicilinas	β -lactamasa (penicilinas)	Alteración de las proteínas de unión a penicilina
<i>Neisseria meningitidis</i>	Penicilinas		β -lactamasa (penicilinas); alteración de las proteínas de unión a penicilina
	β -lactámicos	Escasa difusión o alteración de las porinas; β -lactamasas	Alteración de las proteínas de unión a penicilina; baja fuerza impulsora proteica; β -lactamasas de espectro ampliado
	Aminoglucósidos	Escasa difusión o alteración de las porinas; enzimas modificadoras de los aminoglucósidos	
	Quinolonas	Alteración de la DNA girasa	Alteración del transporte a través de la membrana externa
	Tetraciclinas	Salida activa	
	Trimetoprim-sulfametoxazol	Alteración de los sitios diana enzimáticos	
<i>Pseudomonadales</i>	β -lactámicos	Escasa difusión o alteración de las porinas; β -lactamasas	Alteración de las proteínas de unión a penicilina; baja fuerza impulsora proteica; β -lactamasas de espectro ampliado
	Aminoglucósidos	Escasa difusión o alteración de las porinas; enzimas modificadoras de los aminoglucósidos	
	Quinolonas	Alteración de la DNA girasa	Alteración del transporte a través de la membrana externa

proteína *OmpF* estaba reprimida en ambas cepas. Con el cierre de la porina *OmpF*, continuó la expresión de *OmpC* en la cepa 1, mientras que en la cepa 2 no hubo ningún canal de transporte (porinas) restante, de modo que el transporte del antibiótico a través de la membrana cesó y se presentó resistencia bacteriana.

Las proteínas porinas de otras bacterias gramnegativas entéricas parecen comportarse en forma similar a las de *E. coli*. Sin embargo, las porinas de *Pseudomonas aeruginosa* no se comportan de la misma manera.¹⁸⁴ El único antibiótico para el cual se explica claramente la resistencia en *P. aeruginosa* por medio de una alteración del transporte de membrana es imipenem. En algunas situaciones, este antibiótico ingresa no a través de la proteína porina principal sino a través de una proteína de transporte específica, designada D2.²⁶¹ Sin embargo, al parecer se requiere la presencia de una β -lactamasa de clase C cromosómica para la resistencia, además de la proteína porina alterada.¹⁸¹

Los antibióticos distintos de los β -lactámicos también pueden depender de los canales de porina para el acceso a la célula. La resistencia al cloranfenicol, que suele estar causada por degradación enzimática, también puede estar mediada por proteínas porinas alteradas en las bacterias entéricas³²⁴ y *Haemophilus influenzae*.³⁰ Asimismo, la resistencia a los aminoglucósidos puede estar mediada por alteraciones en las proteínas porinas, aunque el mecanismo primario para la resistencia es la degradación enzimática.¹⁰⁶ La resistencia a las quinolonas, que está mediada principalmente por los cambios en la estructura de la enzima diana, también puede ser causada por alteraciones en las proteínas de membrana.²⁷⁸

En las bacterias se han desarrollado proteínas de transporte específicas para el transporte de grandes moléculas, como vitaminas, a través de la membrana celular. Si se pudieran diseñar antibióticos que aprovecharan esta "autopista" que existe en la célula bacteriana, tendrían una ventaja competitiva importante. Lamentablemente, ha sido difícil desarrollar este tipo de compuestos que también tengan utilidad clínica.

Para algunas bacterias que deben entrar en el citoplasma bacteriano, puede existir una segunda barrera en la membrana plasmática interna. El cruce de la segunda membrana se logra por medio de un proceso que requiere gasto de energía y una carga negativa mínima en el citoplasma, la fuerza motora de protones, para "llevar" los antibióticos aminoglucósidos hacia el citoplasma. Este mecanismo de transporte ha sido demostrado tanto en bacterias grampositivas¹⁹⁶ como en bacterias gramnegativas.²⁹ Se describieron *Enterobacteriaceae* mutantes que son resistentes a los antibióticos *in vitro* debido a deficiencias en este mecanismo de transporte, pero su importancia clínica no está clara.²⁷⁵ Estas variantes aparecen como colonias pequeñas en medios de agar, pero pueden revertir a una morfología normal de las colonias.

Transporte activo de los antibióticos fuera de la célula bacteriana. En algunas bacterias, un importante mecanismo de resistencia es la extracción activa de los antibióticos desde la célula bacteriana, de modo que las concentraciones intracelulares de éstos nunca alcanzan un nivel suficientemente alto como para ejercer una actividad antibiótica eficaz.

Los mecanismos de transporte activo son teleológicamente útiles para eliminar distintas sustancias potencialmente tóxicas, de las cuales es posible que los antibióticos incluso no sean los principales. El mecanismo de salida dependiente de energía es una defensa importante para las bacterias contra las tetraciclinas¹⁹⁹ y los macrólidos.¹⁰⁵ dos grupos de antibióticos que interfieren en la síntesis proteica a nivel ribosómico. Asimismo, la

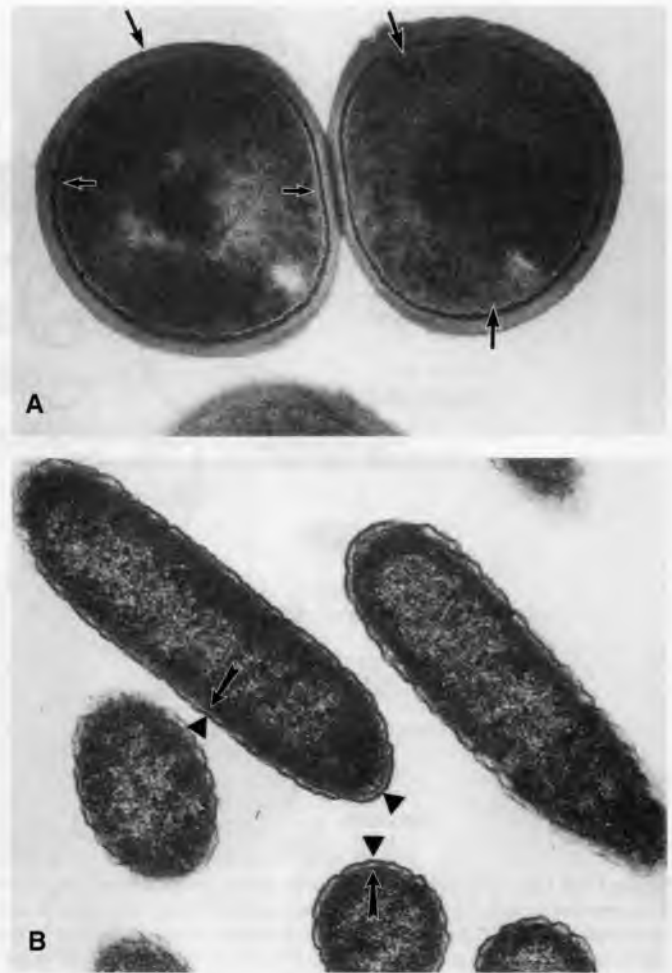


Figura 17-3 Estructura de las bacterias vista con el microscopio electrónico. (A) *Staphylococcus aureus*. Dos cocos grampositivos se encuentran en las etapas finales de la división. La membrana celular (flechas) está rodeada por una gruesa capa de peptidoglucanos que es libremente accesible a los antibióticos (30 000 $\times$). (B) *Pseudomonas aeruginosa*. Estos bacilos gramnegativos tienen una membrana citoplasmática interna (flechas) y una membrana celular externa (puntas de flecha). Entre ambas membranas se ubica el espacio periplásmico que contiene el peptidoglucano. Los antibióticos β -lactámicos deben atravesar la membrana celular antes de alcanzar el peptidoglucano (35 000 $\times$).

extracción del antibiótico es un mecanismo de resistencia de los estafilococos contra las quinolonas, que interfieren en la DNA girasa.²²³ El transportador puede extraer con eficacia diversos tipos de antibióticos, como en el caso de una proteína de la membrana externa (*OprK*) que participa en la secreción de sideróforos en *Pseudomonas aeruginosa*.²⁵⁷ Las cepas mutantes con hiperproducción de la proteína demostraron resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos ciprofloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina y cloranfenicol. Las cepas que habían perdido la capacidad para producir la proteína transportadora mostraron una mayor sensibilidad a los antibióticos.²²⁷

Entre las bacterias grampositivas existen dos clases de bombas de salida para múltiples fármacos dentro del grupo facilitador mayor de transportadores, que dependen de la fuerza motora proteica para energía: 1) el transportador *Bmr/NorA*, que bombea hacia afuera colorantes catiónicos, cationes permeables

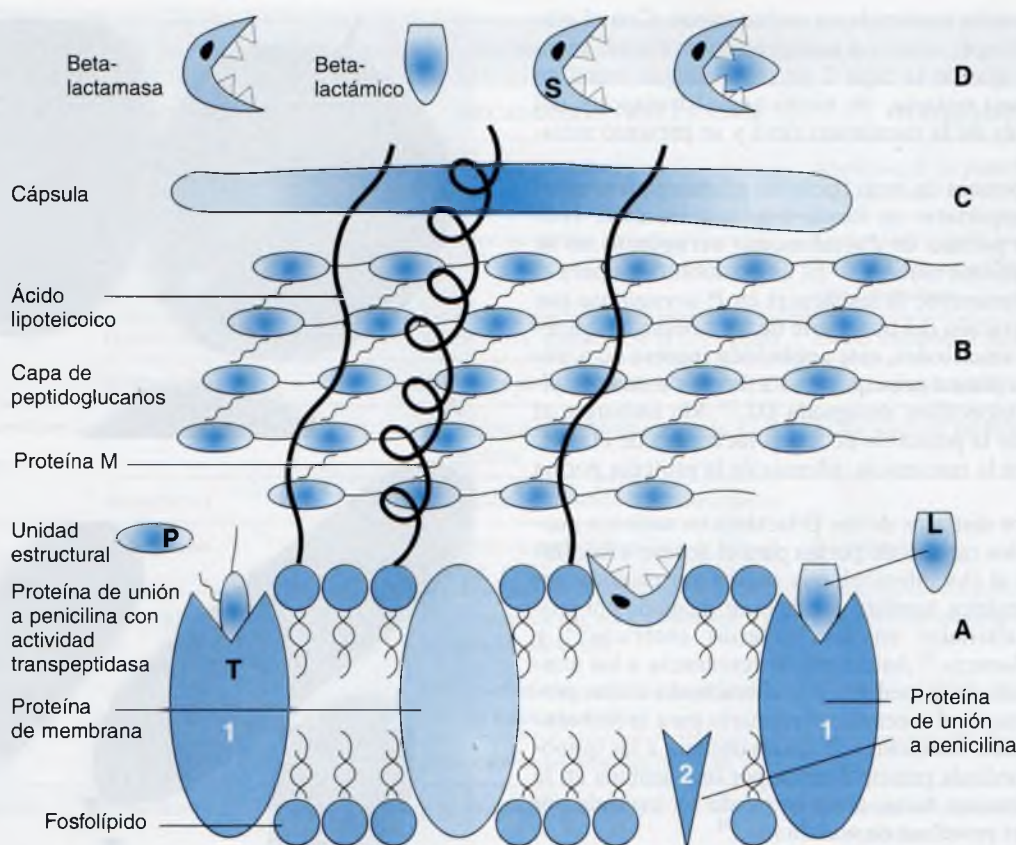


Figura 17-4 La pared celular de las bacterias grampositivas se compone, desde dentro hacia afuera, de (A) una membrana celular lipoproteica, (B) una pared celular de peptidoglucano, (C) una cápsula de polisacárido (en algunas cepas de ciertas especies, como *Streptococcus pneumoniae*) y (D) el medioambiente extracelular. La membrana celular A contiene fosfolípido, proteínas de membrana (que incluyen la proteína M en *Streptococcus pyogenes*), ácido lipoteicoico en los estafilococos y distintas proteínas de unión a penicilina, entre ellas β -lactamasas, ilustrada por las caricaturas de tiburones (S). En las bacterias grampositivas las β -lactamasas son secretadas en el medioambiente extracelular (D), donde pueden activar a los antibióticos β -lactámicos. Los bloques de construcción del peptidoglucano (P) en la pared celular (B) son integrados en el peptidoglucano por una transpeptidasa de unión a penicilina en la membrana (A). Los antibióticos β -lactámicos (L) también interactúan con estas proteínas en la membrana (A) e interfieren en el proceso.

a la membrana y quinolonas y 2) el grupo de compuestos de amonio cuaternario, que eliminan de las células los desinfectantes y los colorantes catiónicos. A diferencia del transportador mef hallado en muchas bacterias grampositivas (incluidos los estafilococos), el transportador msr hallado sólo en los estafilococos también confiere resistencia a las estreptograminas B.²⁷¹

Existen también dos clases de bombas para múltiples fármacos entre las bacterias gramnegativas. La primera, que está relacionada con la familia Smr, puede conferir un ligero aumento de la resistencia a algunos antibióticos, pero no se la considera clínicamente importante; al parecer, los compuestos son exportados al espacio periplasmático. El segundo grupo, que es más complicado, es muy importante desde el punto de vista clínico y tiene un amplio espectro de especificidad; contiene transportadores de la familia MF o de la familia de resistencia-nodulación-división (RND). En este grupo el transportador está compuesto por tres componentes: 1) una proteína transportadora en la membrana citoplasmática, 2) un poro de membrana y 3) una proteína “conectora” periplasmática que conecta a los otros dos componentes.

La resistencia de los bacilos gramnegativos a muchos antibióticos se atribuyó en un principio a una escasa entrada de éstos en la célula bacteriana debido a tamaño, hidrofobicidad o carga. Ahora se piensa que la salida activa de estos antibióticos

de la célula bacteriana es al menos igualmente importante, porque las bombas pueden excretar compuestos químicos, incluidos los antibióticos, en forma directa en el medio extracelular, donde su reentrada está restringida.²²⁷

ANTIBIÓTICOS QUE INTERFIEREN EN LA FORMACIÓN DE LAS PAREDES DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS: β -LACTÁMICOS Y GLUCOPÉPTIDOS

La superfamilia de las enzimas que reconocen penicilina y antibióticos activos en las membranas celulares. Antes de intentar comprender los mecanismos individuales de resistencia es importante considerar el concepto en evolución de una superfamilia de enzimas que reconocen a la penicilina y su relación con la estructura de las células bacterianas. Estas consideraciones son necesarias para comprender el grupo más importante de antibióticos: la familia de los β -lactámicos. Como sucede a menudo en biología, la complejidad de los procesos y las interacciones se vuelven más evidentes a medida que más se aprende sobre ellos. Lo que a primera vista parece ser un proceso aislado finalmente puede verse como parte de un sistema biológico mucho más grande y complejo, de manera muy similar a como un único punto en una pintura de Seurat puede apreciarse como parte de una obra de arte al retroceder y observar la totalidad del lienzo.

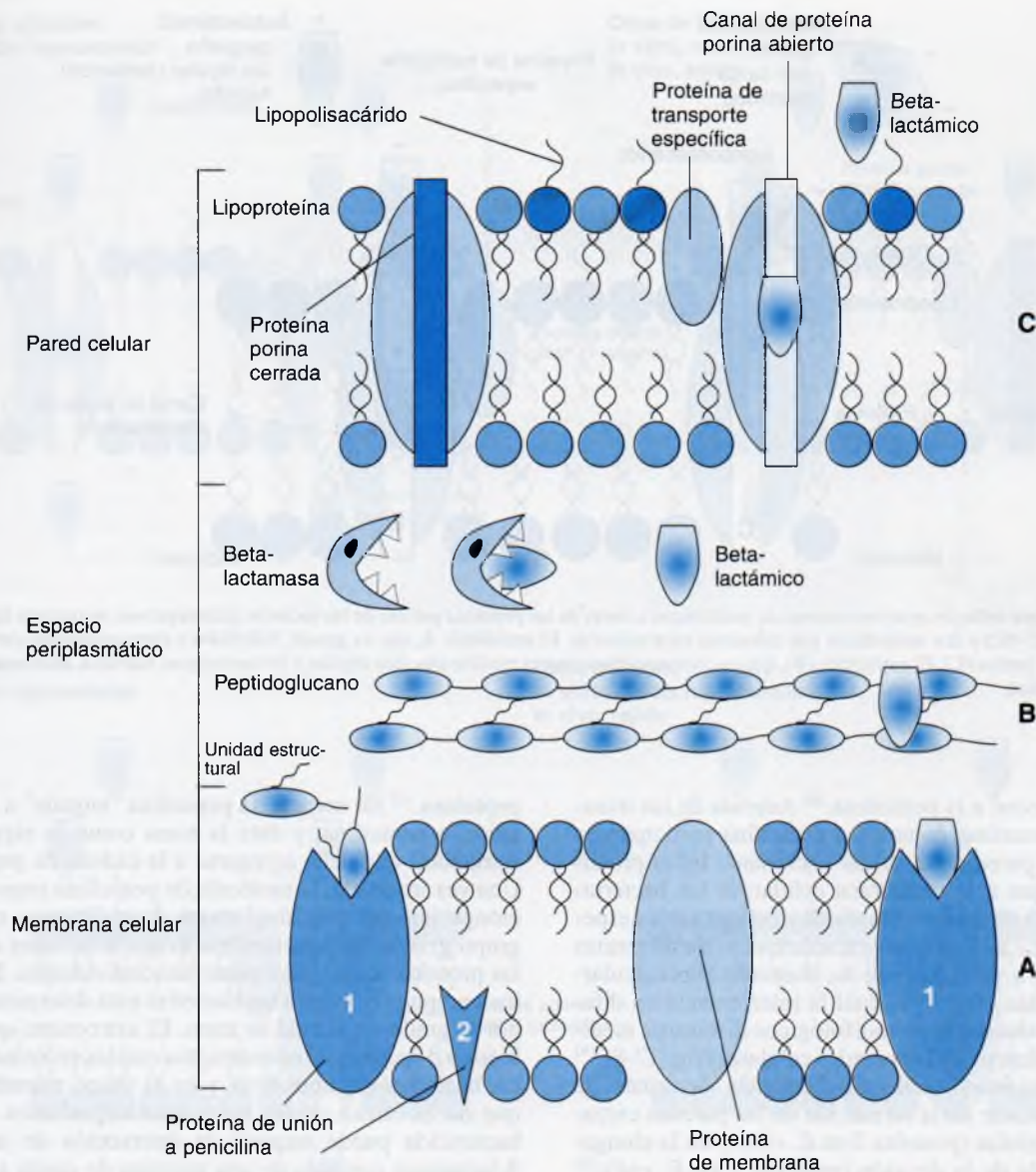


Figura 17-5 Las bacterias grampositivas consisten en una membrana plasmática interna (A), un espacio periplasmático con una disposición laxa de peptidoglucano (B) y una membrana celular externa (C). Las dos membranas celulares consisten en bicapas lipoproteicas asimétricas con fosfolípidos y porciones proteicas. La membrana plasmática (A) contiene distintas proteínas de unión a penicilina, que participan en el proceso de formación de los peptidoglucanos y son inhibidas por los antibióticos β -lactámicos. La membrana celular externa (C) incluye lipopolisacárido, que consiste en lípido A (endotoxina), un centro con uniones covalentes y una cadena polisacárida que determina el antígeno somático O utilizado en muchos esquemas de tipificación serológica. La membrana externa también incluye importantes proteínas de transporte, que incluyen transportadores específicos y las importantes proteínas porinas de varios tamaños y tipos. La β -lactamasa en las bacterias gramnegativas está limitada al espacio periplasmático, donde puede inactivar a los antibióticos a medida que atraviesan; la β -lactamasa no es excretada en el medioambiente externo.

La penicilina y las proteínas de unión a vancomicina. El peptidoglucano, que proporciona rigidez y estabilidad funcional a la célula bacteriana, consiste en bandas intercaladas de aminoazúcares, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico entrelazadas mediante péptidos. Como ya se explicó, la capa de peptidoglucanos de las bacterias grampositivas es una capa gruesa externa a la membrana de la célula única (figs. 17-3A y 17-4), mientras que la capa de peptidoglucanos de las bacterias gramnegativas, que está adelgazada, se localiza entre la membrana plasmática y la membrana celular externa (figs. 17-3B y 17-5). La biosíntesis de peptidoglucano consiste en

muchos pasos que comienzan en el citoplasma y terminan fuera de la membrana celular. La etapa final en este proceso es la transpeptidación de la molécula de peptidoglucano en desarrollo, en la cual un residuo de glicina terminal sobre la cadena lateral de pentaglicina está ligado a *D*-alanina sobre una banda adyacente, lo que libera una segunda molécula de *D*-alanina en el proceso en el cual también parecen participar una glucosilasa y una carboxilasa, pero cuyos papeles son menos claros.¹⁹¹ La transpeptidasa, que está unida a la membrana celular, es una de una familia de enzimas conocidas como proteínas de unión a penicilina, que a su vez forman parte de la superfamilia de

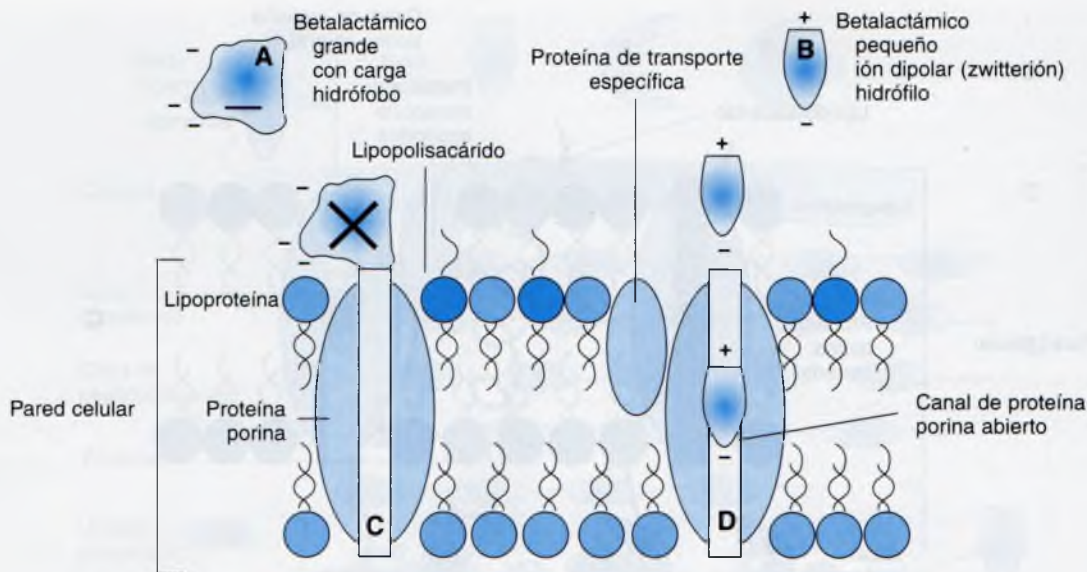


Figura 17-6 Factores que influyen en el movimiento de antibióticos a través de las proteínas porinas de las bacterias gramnegativas: se muestra la membrana celular externa (véase fig. 17-5C) y dos antibióticos con diferentes características. El antibiótico A, que es grande, hidrófobo y tiene numerosas cargas negativas, es excluido por el canal de porina (C). El antibiótico (B), que es compacto, tiene cargas equilibradas (ión dipolar o zwitterión) y es hidrófilo, atraviesa el canal de porina D sin ninguna dificultad.

enzimas que reconocen a la penicilina.²⁰⁰ Además de las transpeptidasas, otras proteínas de unión a penicilina participan en la formación de la pared de la célula bacteriana. Estas proteínas de unión se fijan a la membrana celular de las bacterias grampositivas y a la membrana plasmática interna en las especies gramnegativas. Las funciones características de diferentes proteínas de unión a penicilina se ha ilustrado espectacularmente en *Escherichia coli*, en la cual la interferencia en diferentes proteínas produce efectos morfológicos distintos a medida que se altera la síntesis de las paredes celulares (fig. 17-8).²⁹¹ En los microorganismos bacilares, diferentes proteínas de unión parecen funcionar en la formación de las paredes cruzadas en la división celular (proteína 2 en *E. coli*) y en la elongación celular después de la división (proteína 3 en *E. coli*).²⁹¹ Las proteínas de unión a penicilina se numeran según su peso molecular y la proteína 1 tiene el peso molecular más alto. El sistema de numeración es específico para cada especie, de modo que la proteína de unión a penicilina 1 en *Escherichia coli* no es la misma proteína que la proteína 1 en *Klebsiella pneumoniae* o *Streptococcus pneumoniae*. Los compuestos de alto peso molecular funcionan como las transpeptidasas que son esenciales para la formación de peptidoglucano.^{96,293} Los compuestos de bajo peso molecular parecen funcionar como D-alanina carboxipeptidasas y su importancia biológica no está clara.

Los β -lactámicos ejercen sus efectos al interferir en la formación de peptidoglucano, un mecanismo que es compartido con los glucopéptidos, como la vancomicina.^{321,335} Hace muchos años se reconoció que una similitud estructural entre la molécula de penicilina y el término D-alanina-D-alanina de la cadena de peptidoglucano era fundamental para la acción antibacteriana del compuesto.³²⁰ Kelly y cols. han dilucidado la estructura tridimensional de la proteína de unión a penicilina con actividad transpeptidasa y observaron directamente su interacción con penicilinas y cefalosporinas, lo que estableció en forma definitiva la identidad del sitio fijador de penicilina y la enzima trans-

peptidasa.¹⁶² En esencia, la penicilina “engaña” a la proteína de unión a penicilina, y ésta la toma como la siguiente unidad estructural que debe agregarse a la cadena de peptidoglucano. Una vez insertada, la molécula de penicilina impide una mayor elongación del peptidoglucano. Los distintos miembros del grupo grande de β -lactámicos tienen afinidades diferentes por las proteínas de unión a penicilina individuales. La eficacia de los compuestos contra las bacterias está determinada, en parte, por el grado en el cual se unen. El aztreonam, que es un antibiótico β -lactámico, no interactúa con las proteínas de unión de las bacterias grampositivas y es el único miembro del grupo que no es eficaz contra estos microorganismos. La actividad bactericida puede requerir la interacción de un antibiótico β -lactámico con más de una proteína de unión a penicilina.¹¹² Satta y cols. observaron que la resistencia de *E. coli* aumentaba a medida que se saturaban más proteínas de unión no esenciales. La saturación de proteínas de unión no esenciales no tuvo ningún efecto sobre la sensibilidad a los antibióticos.²⁷⁹ La acción de las enzimas autolíticas también puede ser importante para la actividad bactericida de los β -lactámicos.⁹⁰

La otra clase de antibióticos que interfiere activamente en la síntesis de las paredes de las células bacterianas es el grupo de glucopéptidos, representado por vancomicina y teicoplanina. A diferencia de los β -lactámicos, que bloquean la actividad de las peptidasas unidas a la membrana celular, los glucopéptidos se unen en forma no covalente al término D-alanil-D-alanil de un precursor peptidoglucano pentapéptido.²¹⁵ El antibiótico tiene similitudes estructurales y funcionales con una D-alanil-D-alanil peptidasa que participa en la elongación de la cadena de peptidoglucano.¹⁶⁹ La unión del antibiótico con la proteína precursora puede impedir el acceso de la unidad estructural esencial a la peptidasa por interferencia estérica.

Modificación de las enzimas diana: proteínas de unión y resistencia a los antibióticos. Un mecanismo importante de resistencia de las bacterias a los β -lactámicos es la alteración de las proteínas de unión a penicilina de modo que el antibiótico ya

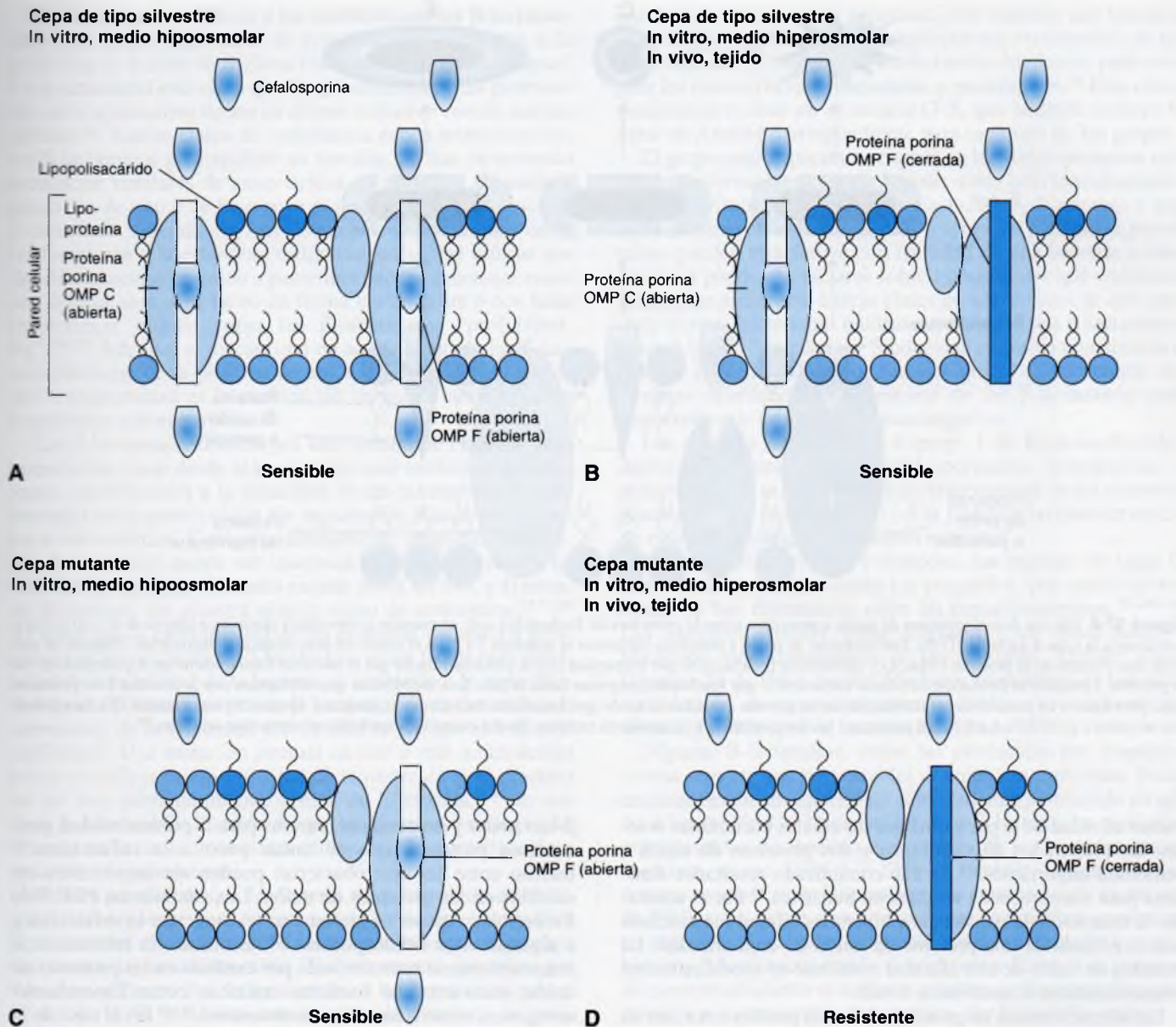


Figura 17-7 Importancia crítica de las proteínas porinas en la resistencia a los antibióticos según lo demuestra una cepa mutante de *Salmonella typhimurium*.²⁰¹ se muestra la membrana celular externa para cuatro combinaciones de bacteria y medioambiente. (A) La cepa de tipo silvestre que crece en un medio hipoosmolar en el laboratorio tiene una porina de canal pequeño (OmpC) y una porina de canal grande (OmpF). La cefalosporina tiene libre acceso a sus sitios de unión sobre la membrana plasmática interna (no se muestra) y la cepa es sensible. (B) La cepa de tipo silvestre ha crecido en el medio hiperosmolar en el laboratorio, lo que imita las condiciones in vivo. La porina de canal grande (OmpF) se ha cerrado, pero la porina de canal pequeño sigue aún disponible para la cefalosporina y la cepa sigue siendo sensible. (C) Una cepa mutante ha perdido su porina de canal pequeño (OmpC), pero aún tiene la porina OmpF cuando crece en un medio hipoosmolar en el laboratorio. La cefalosporina puede atravesar la membrana a través de OmpF y la cepa mutante es sensible in vitro. (D) La cepa mutante en medios hiperosmolares o in vivo. La proteína OmpF se cierra, como lo hizo en la cepa de tipo silvestre en condiciones similares, pero ahora no existe ninguna porina OmpC disponible para el antibiótico. Sin ningún medio para entrar en la célula la cefalosporina es ineficaz y la cepa mutante ahora es resistente.

no tiene acceso a la cadena de peptidoglucanos en crecimiento. Las proteínas alteradas se indican mediante el agregado de un sufijo, que puede ser una letra o una designación principal, al esquema de numeración. Por ejemplo, el mecanismo de resistencia de alto nivel de *Staphylococcus aureus* a las penicilinas resistentes a la penicilinas es la producción de una variante de proteína de unión a penicilina 2 (PBP 2), designada PBP 2a. Como alternativa, puede haber una pérdida de proteínas de unión que tienen la máxima afinidad por el antibiótico.

La evidencia que apoya el papel de las proteínas de unión alteradas proviene de dos fuentes. Primero, la presencia de proteínas alteradas se asocia con la aparición de resistencia. La exposición de los estafilococos a la meticilina indujo una alteración en la proteína de unión a penicilina 2 (PBP2) que la transformó en una forma variante (PBP 2a)^{119,236} Las variantes que perdieron la resistencia no contenían la proteína de unión variante.^{119,326} Asimismo, los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* que eran resistentes a la penicilina mostraron

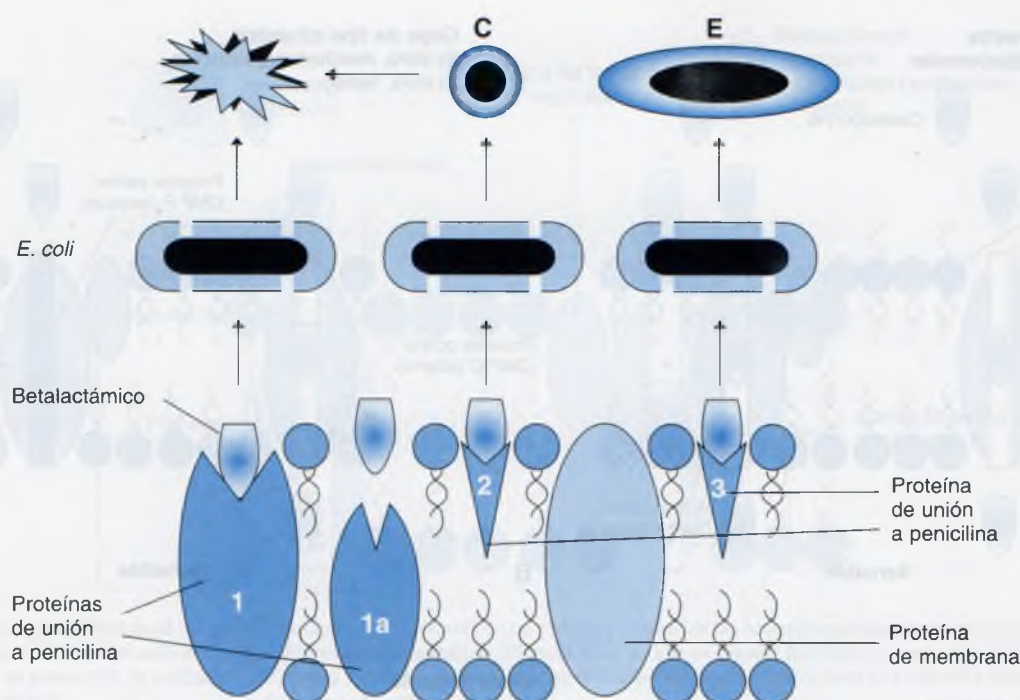


Figura 17-8 Efectos de tres proteínas de unión a penicilina sobre la estructura de *Escherichia coli*: se muestra la membrana plasmática interna de *E. coli* (correspondiente a la capa A en la fig. 17-5). Tres proteínas de unión a penicilina diferentes se numeran 1 a 3, en el orden del peso molecular decreciente. También se presenta una variante de la proteína 1 (1a). Los antibióticos β-lactámicos que interactúan con la proteína 1 hacen que el bacilo se lise rápidamente. La interacción con la proteína 2 produce la formación de células cócicas (C), que finalmente progresan hasta la lisis. Los antibióticos que interactúan con la proteína 3 no producen lisis, pero causan un defecto en la información de las paredes cruzadas de modo que las células bacterianas se alargan y adoptan formas extrañas (E). Las proteínas de unión a penicilina 4 a 6 (no se muestran) no son esenciales y no producen cambios obvios cuando los antibióticos interactúan con ellas.²⁹¹

menor afinidad de la penicilina por las células bacterianas enteras, los preparados de membrana y dos proteínas de unión a penicilina importantes.¹¹⁵ Se han comunicado resultados similares para estreptococos viridans en Sudáfrica.⁸⁰ Por el contrario, la transición de resistencia a hipersensibilidad fue asociada con la pérdida de una proteína de unión de baja afinidad. La proteína de unión de alta afinidad resultante se asoció entonces con sensibilidad al antibiótico unido.

Las alteraciones en las proteínas de unión pueden constituir un proceso de un solo paso, controlado por un gen único, como el gen *MecA*, que codifica una PBP 2a variante en *Staphylococcus aureus*.³²⁶ Sin embargo, en el caso de *Streptococcus pneumoniae*, las alteraciones de múltiples proteínas de unión conducen a un proceso de resistencia creciente en múltiples pasos.¹³⁷

Las alteraciones en las proteínas de unión son más importantes para la resistencia de las bacterias grampositivas a los β-lactámicos que para las bacterias gramnegativas entericas y las especies de *Pseudomonas*. Sin embargo, los cambios en las proteínas de unión tienen efectos considerables sobre algunas bacterias gramnegativas y algunos β-lactámicos. El mecanismo por medio del cual *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* que no producen β-lactamasa son resistentes a los β-lactámicos es la alteración de las proteínas de unión.^{72,239} Incluso *N. meningitidis*, que durante tantos años siguió siendo uniformemente sensible a la penicilina, ha desarrollado proteínas de unión alteradas que han producido resistencia a ese antibiótico.³⁴⁹ La importancia clínica de estas proteínas de unión está bien ilustrada por el caso de un paciente en el cual *H. influenzae* no tipificable produjo meningitis. El paciente fue tratado con éxito con cefuroxima. La cepa aislada no producía

β-lactamasa y no contenía barreras para la permeabilidad, pero contenía proteínas que se unían poco a la cefuroxima.²⁰² Incluso entre las enterobacterias pueden ser importantes los cambios en las proteínas de unión. Los cambios en PBP 3 de *Escherichia coli* se asociaron con resistencia a la cefalexina y a algunas otras cefalosporinas.¹²³ Asimismo, la resistencia al imipenem puede estar mediada por cambios en las proteínas de unión, tanto entre las bacterias entericas, como *Enterobacter aerogenes*, como *Acinetobacter baumannii*.^{45,100} En el caso de la cepa de *Enterobacter*, la proteína de unión estaba en la membrana externa, más que en la membrana citoplasmática y puede haber sido importante en el transporte de antibióticos a través de la membrana.

La segunda línea de evidencia que apoya el papel de las proteínas de unión proviene de la observación de que la pérdida de la proteína variante conduce al restablecimiento de la sensibilidad o incluso a un estado de hipersensibilidad.^{80,91,119,326}

Se producen acontecimientos similares durante el desarrollo de resistencia a la vancomicina. El gen *vanA* de los enterococos codifica las proteínas precursoras depsipeptídicas para peptidoglucano que saltan la interacción de vancomicina con el término D-alanil-D-alanil de los péptidos.^{169,174} La resistencia de *Staphylococcus aureus* a los glucopéptidos fue anticipada por el desarrollo de mutantes con menor sensibilidad en el laboratorio. La disminución de la sensibilidad se asoció con la aparición de una nueva proteína de 39 kDa en el citoplasma y en algunas fracciones de la membrana junto con una desorganización considerable de la capa de peptidoglucanos.⁵³

Existen varias revisiones útiles de las proteínas de unión a penicilina como mecanismos de resistencia.^{42,190,292}

Enzimas que modifican a los antibióticos: las β -lactamasas. Otro grupo importante de proteínas que reconocen a la penicilina es la clase de enzimas conocidas como β -lactamasas. En la actualidad está claro que las β -lactamasas y las proteínas de unión a penicilina tienen un origen evolutivo común aunque distante.²⁹³ Ambas clases de compuestos deben interactuar con los β -lactámicos para realizar su función. Se han demostrado secuencias similares de aminoácidos en proteínas de unión a penicilina de alto y de bajo peso molecular y algunos tipos de β -lactamasa. Además, se han documentado similitudes en la conformación y la estructura tridimensional. Cabe señalar que algunas proteínas de unión a penicilina pueden funcionar como una β -lactamasa, aunque no en forma tan eficiente o con tanta importancia clínica como las β -lactamasas "profesionales".^{200,225} Además, el mecanismo de acción tanto de las β -lactamasas como de la proteína de unión a penicilina con actividad transpeptidasa es la escisión de un enlace amino por un mecanismo acil-enzimático.¹⁹

Las β -lactamasas constituyen una familia de enzimas cuya importancia varía desde el mecanismo casi exclusivo de resistencia estafilocócica a la penicilina en un extremo hasta componentes de la pared celular sin importancia clínica en algunas bacterias entéricas. Cualquier antibiótico o grupo de antibióticos β -lactámicos puede ser inactivado por estas enzimas. La cantidad de enzimas diferentes excede ahora las 340, y el intenso incremento no muestra ningún signo de aminorarse.^{25,35,200} Al igual que la especificidad de las proteínas de unión a penicilina por los antibióticos β -lactámicos es un factor para determinar la sensibilidad de la bacteria al antibiótico; la especificidad de una β -lactamasa por un β -lactámico es un determinante importante de la eficiencia con la cual la enzima hidroliza el antibiótico. Una mutación puntual en uno o más aminoácidos puede modificar la especificidad de la molécula si se presenta en un área estructuralmente crítica de la enzima,^{21,36} lo que lleva a la lamentable situación de que las bacterias puedan inutilizar en un instante inversiones millonarias en investigación y desarrollo farmacéuticos.

Existen pruebas de que las fuentes microbianas de antibióticos (como las especies de *Streptomyces*) producen el antibiótico y también las enzimas modificadoras que protegen al productor contra la autodestrucción. Es interesante recordar que Abraham y Chain, dos de los científicos fundamentales para el desarrollo de la penicilina, comunicaron la presencia de penicilinas en una cepa de *Bacillus (Escherichia) coli* antes de la introducción del uso clínico del antibiótico.³ Existen ejemplos de enzimas β -lactamasas documentadas antes de la introducción local del sustrato antibiótico relevante.²⁵ Sin duda, la naturaleza no creó las β -lactamasas sólo para ocasionar problemas a los médicos infectólogos y a las compañías farmacéuticas. Dos grupos de investigadores han presentado pruebas que apoyan el concepto de que el papel fisiológico de las β -lactamasas es reestructurar el peptidoglucano durante el crecimiento de las células bacterianas.^{19,325} Observaron que la síntesis de β -lactamasas era inducida tanto por la presencia de antibióticos β -lactámicos como por los precursores del medioambiente extracelular, lo que recuerda la similitud estructural de la penicilina y el término dipeptídico de la D-alanina-D-alanina de las cadenas de peptidoglucano.

Se han diseñado distintos esquemas de clasificación, lo que conduce a cierta confusión en la nomenclatura. Un primer esquema de clasificación útil fue provisto por Richmond y Sykes,²⁶⁸ pero ha proliferado la cantidad y la variedad de enzimas más allá de los límites de ese esquema. Un esquema más moderno, sobre la base de la estructura molecular propuesta

por Ambler⁶ incluye, por necesidad, sólo enzimas que han sido caracterizadas. Más tarde, se estableció una clasificación de las β -lactamasas, el esquema de Bush-Jacoby-Medeiros, para integrar las características funcionales y moleculares.³⁶ Esta clasificación se resume en el cuadro 17-5, que también incluye la clase de Ambler correspondiente para cada uno de los grupos.

El grupo más importante consiste en las serina proteasas que tienen preferencia por las penicilinas o una actividad de amplio espectro (Ambler A; Grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros) y que se encuentran en los cromosomas o sobre los plásmidos; por lo tanto, pueden transferirse con facilidad de una bacteria a otra. También pueden localizarse sobre transposones que contienen genes para resistencia a otras clases de antibióticos, lo que conduce a cepas bacterianas multirresistentes.³⁵ Estas β -lactamasas clase A/grupo 2 pueden ser producidas en forma constitutiva o pueden requerir inducción. En este grupo se encuentran las enzimas estafilocócicas y muchas de las β -lactamasas más importantes de las bacterias gramnegativas.

Las enzimas Ambler clase C/grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros son primariamente cefalosporinasas, constitutivas o inducibles, que se hallan sobre los cromosomas de las bacterias gramnegativas. En el cuadro 17-6 se resumen las características de estas " β -lactamasas de amplio espectro".

En forma más reciente y ominosa, las enzimas de clase C han hallado su camino hacia los plásmidos, por medio de los cuales se han diseminado entre las cepas bacterianas.^{233,262,316} Las enzimas Ambler clase B/grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros (metaloenzimas) y las enzimas Ambler clase D/grupo 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (oxacilinasas) han sido consideradas de menor importancia clínica, pero cada vez se destaca más el papel de las metaloenzimas.^{34,183}

Algunas β -lactamasas, como las producidas por *Staphylococcus aureus*, han sido estables durante varias décadas. Estas enzimas tienen un espectro de actividad algo restringido dirigido a las moléculas de penicilina. Las β -lactamasas mediadas por plásmidos de espectro más amplio de las bacterias gramnegativas, como TEM-1 y SHV-1, también fueron estables durante muchos años. Sin embargo, a comienzos de la década de 1980, aparecieron diversas variantes enzimáticas que tenían un espectro de actividad ampliado contra muchos de los antibióticos β -lactámicos recién descubiertos. Estas β -lactamasas de espectro ampliado se hallaron primero en Europa, principalmente en aislamientos de especies de *Klebsiella*, menos a menudo en *Escherichia coli*.²⁵² Estas enzimas han sido ahora demostradas en muchas especies dentro de las enterobacterias (que incluyen especies de *Enterobacter*, especies de *Serratia* y *Proteus mirabilis*) y más recientemente en otros géneros, como *Pseudomonas aeruginosa*.³⁴⁰ Las nuevas enzimas, sus precursores, como TEM-1 y SHV-1, están localizados sobre plásmidos, pero pueden haber sido derivados originariamente de una enzima cromosómica. Muchas de las nuevas β -lactamasas difieren entre sí sólo en la sustitución de un único aminoácido, pero los cambios tienen profundas implicaciones para el manejo clínico de las enfermedades infecciosas.^{46,200} En el cuadro 17-6 se resumen las características de las enzimas de espectro ampliado. Estas enzimas han cobrado una importancia especial por varias razones: 1) se han vuelto prevalentes en algunos centros médicos de Europa y los Estados Unidos,^{345,259} 2) confieren resistencia contra casi todos los antibióticos β -lactámicos con la principal excepción de los carbapenémicos, como imipenem, 3) la resistencia a muchos antibióticos no es detectada fácilmente por muchas técnicas de laboratorio de uso frecuente¹⁶⁰ (véase luego la explicación sobre detección) y 4) en algunos casos la falla clínica ha sido el resultado del tratamiento con

Cuadro 17-5 Esquema de clasificación funcional de Bush-Jacobi-Medeiros para β -lactamasas (con relación con el esquema de clasificación molecular de Ambler)

GRUPO	TIPO ENZIMÁTICO	INHIBICIÓN POR CLAVULANATO	CLASE MOLECULAR (AMBLER)	CANTIDAD DE ENZIMAS (MÍNIMA)	LOCALIZACIÓN PREDOMINANTE DE LA ENZIMA	EXPRESIÓN PREDOMINANTE	EJEMPLOS
1	Cefalosporinasa	No	C	53	Cromosómica o plásmido	Las enzimas cromosómicas suelen ser inducibles; las enzimas de los plásmidos suelen ser constitutivas	Resistencia a todos los β -lactámicos excepto carbapenémicos (a menos que se combine con cambios en las porinas)
2a	Penicilinasas	Sí	A	23	Plásmido o transposón	Inducible en <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>S. epidermis</i> ; especies de <i>Enterococcus</i> ; predominantemente penicilinas
2b	De amplio espectro	Sí	A	16	Cromosómica o plásmido	Inducible o constitutiva	TEM-1, SHV-1; penicilinas y cefalosporinas
2be	De espectro ampliado	Sí	A	119	Plásmido	Constitutiva	TEM-3; SHV-2; <i>Klebsiella oxytoca</i> K-1; penicilinas y cefalosporinas
2br	Resistente a los inhibidores	Disminuida	A	24			Fundamentalmente derivado del tipo TEM
2c	Carbenicilinasas	Sí	A	19			PSE-1, CARB-3; BRO-1; carbenicilina
2d	Cloxacilinasas	Sí	D o A	31			OXA-1; PSE-2; <i>Streptomyces cacaoi</i> ; cloxacilina/oxacilina
2e	Cefalosporinasa	Sí		20			<i>Proteus vulgaris</i> ; <i>bacteroides fragilis</i> CepA; cefalosporinas
2f	Carbapenemasa	Sí	A	4			<i>Enterobacter cloacae</i> IM1-1; NMC-A; carbapenémicos
3	Metaloenzima	No	B	24			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1; todas las clases de β -lactámicos excepto los monobactámicos
4	Penicilinasas	No		9			<i>Burkholderia cepacia</i> ; otras enzimas no secuenciadas que no se ajustan a otros grupos

Adaptado de las referencias^{25, 35, 200, 218, 231, 316.}

Cuadro 17-6 Características de las β -lactamasas “de amplio espectro” mediadas por plásmidos más frecuentes

PARÁMETRO	β -LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO	β -LACTAMASAS AMPC
Primer año de comunicación	1983	1988
Especies bacterianas afectadas	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; especies de <i>Enterobacter</i> ; especies de <i>Salmonella</i> ; especies de <i>Proteus</i> ; especies de <i>Citrobacter</i> ; <i>Morganella morganii</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Shigella dysenteriae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> ; <i>Capnocytophaga ochracea</i> y otras	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; especies de <i>Salmonella</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>
Inhibición por inhibidores de la β -lactamasa (p. ej., clavulanato)	Sí	No
Localización de la enzima	Plásmido	Plásmido (derivado de enzima cromosómica inducible)
Expresión	Constitutiva	Constitutivo (una excepción)
Antibióticos indicadores	Aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima	Posiblemente cefoxitina o cefotetán
Mecanismo de detección (examen de detección)	Antibiótico indicador con inhibidor de la β -lactamasa o sin él	Problemático; utiliza <i>K. pneumoniae</i> (ninguna enzima AmpC cromosómica) como “pantalla institucional”
Problemas asociados	La presencia de una β -lactamasa de espectro ampliado puede estar enmascarada por la coexistencia de la enzima AmpC	Difícil de diferenciar el plásmido de las enzimas cromosómicas
Efecto del inóculo	Sí	Sí
Eficacia de β -lactámicos aparentemente sensibles a la presencia de la enzima	No	Probablemente no
Tratamiento con combinaciones de β -lactámico/inhibidor de la β -lactamasa	Controversial	No

Adaptado de las referencias^{25,35,200,218,231,316}

antibióticos β -lactámicos que parecían ser eficaces in vitro.²⁴¹ El reconocimiento de una epidemia de infección causada por una β -lactamasa de espectro ampliado se difirió porque las pruebas de sensibilidad por difusión con discos produjeron informes falsos de sensibilidad.²⁰⁴

Inhibidores de las β -lactamasas. La última pieza del rompecabezas de las proteínas que reconocen a la penicilina es la introducción de los inhibidores de las β -lactamasas.^{33,182} Estos compuestos se asemejan a los antibióticos β -lactámicos lo suficientemente bien como para que puedan unirse a las β -lactamasas, ya sea en forma reversible o irreversible, lo que protege al antibiótico de la destrucción. Cuando son más eficaces sirven como bombarderos suicidas y absorben toda la enzima disponible.¹⁸² No sorprende que estos compuestos, que deben imitar a los β -lactámicos para funcionar, también tengan una actividad antibacteriana limitada propia. De hecho, después de que el aztreonam fuera desarrollado como un antibiótico β -lactámico, se descubrió que tenía actividad adicional como inhibidor de la β -lactamasa.³³ Los tres inhibidores de la actividad de β -lactamasas que han hallado un lugar en la medicina clínica son el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Los tres son eficaces contra la penicilinas estafilocócica y tienen una eficacia variable contra las enzimas cromosómicas de las bacterias gramnegativas. El clavulanato y el tazobactam son superiores al sulbactam en la actividad contra las β -lactamasas mediadas por plásmidos de los microorganismos gramnegativos, que incluyen las β -lactamasas de espectro ampliado.²⁴⁴ No

existe ninguna diferencia importante entre las actividades inhibidoras del clavulanato y el tazobactam, aunque el espectro de su actividad es diferente. Algunas enzimas de espectro ampliado son resistentes a la actividad de los tres compuestos. El clavulanato es un inductor más eficiente de las β -lactamasas clase C/grupo 1 AmpC que el tazobactam o el sulbactam.

β -lactamasas y resistencia a los antibióticos. Las β -lactamasas de las bacterias grampositivas, representadas predominantemente por los estafilococos, son en su mayor parte enzimas de clase C inducibles que se forman en la membrana celular, pero también son excretadas de manera extracelular (fig. 17-4). Las implicaciones prácticas de estas características son dobles. En primer lugar, las bacterias deben estar expuestas al antibiótico β -lactámico antes de que la enzima se produzca en grandes cantidades. En el laboratorio es posible destruir las bacterias con grandes cantidades de antibiótico antes de que ocurra la inducción enzimática, lo que produce la falsa impresión de sensibilidad. En teoría, también se podrían matar pequeñas cantidades de estafilococos in vivo antes de la inducción de β -lactamasa, pero no se ha documentado esta eventualidad. Segundo, la producción extracelular de β -lactamasa podría proteger las bacterias coinfectantes que no producen la enzima. Se ha postulado la hipótesis de que las recaídas de la faringitis estreptocócica después del tratamiento con penicilina podrían ser causadas por este mecanismo,²⁷ pero otros investigadores no han podido documentar una relación entre la presencia de bacterias que producen β -lactamasa y el resultado del tratamiento.³⁰⁶

Las β -lactamasas de las bacterias gramnegativas son más complicadas y el nivel creciente de complejidad no muestra ningún signo de disminuir (cuadro 17-5). Las enzimas cromosómicas que eran expresadas constitutivamente en bajo nivel en muchas especies entéricas (clase C/grupo 1) fueron aumentadas primero por enzimas de amplio espectro inducibles codificadas por plásmidos o transposones (clase A/grupo 2), más tarde por mutaciones en las enzimas de espectro ampliado mediadas por plásmidos (también clase A/grupo 2) y más recientemente por la aparición de las enzimas clase C/grupo 1 sobre plásmidos. La complejidad está acentuada por varios factores, que se resumen en el recuadro 17-1.

ANTIBIÓTICOS QUE NO ACTÚAN SOBRE LA PARED CELULAR

Producción de enzimas modificadoras. Las enzimas modificadoras también son importantes para algunos antibióticos que ejercen sus efectos dentro del citoplasma de las células bacterianas. El mecanismo primario para el desarrollo de resistencia a los aminoglucósidos se realiza a través de enzimas modificadoras. Existen tres tipos generales de procesos: 1) fosforilación, 2) acetilación y 3) adenilación. Todos los antibióticos aminoglucósidos corren riesgo de inactivación por una de estas enzimas.^{197,253} Aunque los tres tipos de enzimas se encuentran en todos los tipos de bacterias, las de los microorganismos grampositivos y gramnegativos son diferentes. Las enzimas de las bacterias gramnegativas que inactivan la estreptomycin y la kanamicina se han difundido tanto que estos antibióticos han caído fuera del uso clínico frecuente. La amikacina es menos vulnerable a estas enzimas inactivadoras, pero puede volverse ineficaz por otros mecanismos, sobre todo en *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia a los aminoglucósidos ha aparecido en proporciones epidémicas en los hospitales de todo el mundo.¹⁹⁷ Miller y cols., que resumieron los resultados de numerosos estudios, observaron variaciones en el tiempo y entre las regiones geográficas.²⁰⁶ Parecía existir una relación entre la resistencia y los patrones de uso de antibióticos. Especialmente se observó la presencia de una enzima que acetila a la amikacina pero no a la gentamicina, o ejemplo de la inventiva de las bacterias.

La eritromicina y el cloranfenicol también pueden ser inactivados por vía enzimática. En el caso del cloranfenicol, la enzima acetiltransferasa es responsable de la mayor parte de la resistencia clínica.⁹⁷ Un mecanismo menor para la resistencia a las tetraciclinas es la inactivación enzimática.³⁰⁷

En las bacterias grampositivas, la resistencia a los macrólidos y las lincosamidas puede ser producida por varios métodos aislados o en combinación: inactivación enzimática, alteración de los puntos diana cromosómicos o expulsión activa.¹⁷² Se han identificado muchos genes (*erm*) de metilasa rRNA,²⁷¹ los cuales son muy importantes porque producen el fenotipo MLS_B, que confiere resistencia a todos los macrólidos (entre ellos claritromicina y azitromicina), lincosamidas (clindamicina) y estreptograminas (quinupristina-dalfopristina).

Alteración de los sitios diana. Los cambios en la afinidad de los puntos diana ribosómicos por las enzimas son importantes para la resistencia a algunos antibióticos, sobre todo tetraciclina, eritromicina, quinolonas, aminoglucósidos, trimetoprim y sulfametoxazol. Aunque el mecanismo de resistencia primario para las tetraciclinas es el mecanismo de expulsión, también se describió la protección de los ribosomas por una proteína soluble como un mecanismo secundario importante.³⁰⁷ Las alteraciones en el sitio ribosómico de acción de los macrólidos y las

Recuadro 17-1 Características seleccionadas de las β -lactamasas

1. Múltiples β -lactamasas de diferentes tipos pueden ser expresadas en la misma cepa de bacterias. Las diferentes enzimas pueden tener diferentes implicaciones clínicas y cada vez es más difícil identificar los perfiles enzimáticos en todos los laboratorios clínicos a excepción de los más sofisticados. Por ejemplo, la presencia de una β -lactamasa de espectro ampliado clase A/grupo 2 puede estar enmascarada por la presencia de una β -lactamasa clase C/grupo 1^{25,316} (véase explicación de la detección más adelante).
2. Los efectos del inóculo pueden dificultar la detección de una resistencia importante de relevancia clínica.³¹⁶ Los microorganismos que producen β -lactamasas de espectro ampliado demuestran una resistencia creciente a las cefalosporinas de tercera generación con un inóculo bacteriano creciente (efecto del inóculo),¹³⁹ fenómeno que probablemente sea causado por la incapacidad de los antibióticos para destruir a las bacterias e inhibirlas.²⁰⁴ Las cefamicinas, que a menudo parecen ser sensibles in vitro, tampoco pueden ejercer actividad bactericida²⁰⁴ y el lugar de estos antibióticos en el tratamiento es poco claro. El imipenem, que tiene actividad bacteriostática y bactericida, parece eficaz in vitro y es terapéuticamente activo contra las cepas que no tienen otros mecanismos para la resistencia. Aunque los inhibidores de la β -lactamasa inhiben a las β -lactamasas de espectro ampliado, el papel de estos agentes en el tratamiento de las infecciones humanas también es controversial. En un estudio, el uso de inhibidores de la β -lactamasa pareció disminuir la propagación de enzimas productoras de β -lactamasas de espectro ampliado, pero el uso de estos agentes generalmente no se recomienda y el lavado de las manos sigue siendo la piedra fundamental de las medidas para controlar la propagación de las infecciones intrahospitalarias.²⁵⁵ Cuando se infectaron en forma experimental ratas con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* que producía una β -lactamasa TEM-26, las combinaciones de ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam fueron eficaces para reducir los recuentos de colonias bacterianas en los abscesos intrabdominales, pero el imipenem proporcionó el tratamiento más eficaz.²⁶⁶
3. Cada enzima tiene diferentes afinidades para distintos antibióticos β -lactámicos, pero la hiperproducción de una enzima puede volver inactivo a un antibiótico que normalmente es eficaz.^{122,249}
4. Se han caracterizado enzimas que son activas contra casi todos los antibióticos β -lactámicos, aun aquellos (como los carbapenémicos) que no suelen ser afectados por las enzimas comunes.^{232,334}
5. No es raro que la misma cepa bacteriana presente mecanismos de resistencia redundantes. Por ejemplo, una β -lactamasa clase A/grupo 2 que es inhibida por ácido clavulánico (y podría ser tratada teóricamente con una combinación β -lactámico-inhibidor de la β -lactamasa) también puede contener una mutación de la porina que vuelve resistente a la bacteria a múltiples antibióticos con la presencia de inhibidores de la β -lactamasa o sin ella.²⁵ La resistencia a ceftazidima y piperacilina-tazobactam (habitualmente no inactivados in vitro por las β -lactamasas de espectro ampliado) en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* fue adjudicada a la combinación de una β -lactamasa SHV-1 (clase A: grupo 2) y una alteración en las proteínas de la membrana externa.²⁶⁵ Asimismo, el imipenem (no afectado por las β -lactamasas de espectro ampliado) fue inactivado por una combinación de una β -lactamasa AmpC mediada por plásmidos (clase C: grupo 1) y la pérdida de una proteína de la membrana externa.²⁶
6. Por último, los transposones pueden transportar genes para la resistencia de múltiples antibióticos fuera de los β -lactámicos, como fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol o aminoglucósidos.^{111,231}

lincosamidas, como eritromicina y clindamicina, son mecanismos importantes para la resistencia contra este grupo de antibióticos.^{172,238} La mutación en el sitio diana de la DNA girasa de las quinolonas es el mecanismo principal para la resistencia a este importante grupo de antibióticos, tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas,^{126,127} aunque la resistencia también puede estar mediada por barreras en la difusión a través de la pared celular. En algunos géneros (p. ej., *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*) una única mutación es suficiente para conferir resistencia; en otros (p. ej., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* o *Neisseria gonorrhoeae*) se necesitan múltiples mutaciones.¹²⁷ La resistencia a los aminoglucósidos puede estar mediada por alteraciones en los sitios diana ribosómicos y por inactivación enzimática. Cuando este mecanismo está operando, puede existir en realidad una acumulación (ineficaz) de antibiótico dentro de la célula bacteriana.⁴ Un mecanismo importante de resistencia a sulfametoxazol y a trimetoprim es la alteración de las enzimas diana secuenciales en la vía bioquímica para la formación de ácidos nucleicos, dihidropteroato sintetasa para sulfamidas y dihidrofolato reductasa para trimetoprim.¹³²

Desviación como mecanismo de resistencia. Los mutantes autotróficos que necesitan timina para su crecimiento pueden ser capaces de evitar la actividad de trimetoprim y sulfametoxazol in vitro con el uso de sustratos disponibles y vías alternativas.²⁴⁵ El ejemplo de mayor importancia clínica de un mecanismo de desviación es la capacidad de las cepas naturales de las especies de *Enterococcus* para utilizar compuestos como ácido polínico para el crecimiento in vivo en presencia de trimetoprim-sulfametoxazol.^{108,348} Las cepas pueden parecer sensibles in vitro, aunque no responden a la antibioticoterapia in vivo. El resultado in vitro puede ser transformado de sensible a resistente mediante el agregado de ácido polínico al medio de prueba. Por lo tanto, los enterococos no deben ser evaluados contra trimetoprim-sulfametoxazol.

INTERACCIONES ENTRE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

Muchas bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia que a menudo son complementarios. Ya se ha mencionado la presencia de numerosas enzimas β -lactamasas diferentes en la misma bacteria. Un caso clásico para el estudio de los problemas de resistencia es el de *Pseudomonas aeruginosa*, que combina una lista numerosa de mecanismos de resistencia con la capacidad de causar infecciones serias en pacientes con enfermedades graves.¹⁸³

El mejor ejemplo de las defensas sinérgicas es la combinación de barreras contra la difusión de los antibióticos β -lactámicos a través de la membrana celular externa de las bacterias gramnegativas y la producción de β -lactamasas en el espacio limitado de la capa de peptidoglucano entre las dos membranas (fig. 17-5). En consecuencia, aumenta mucho la eficacia con la cual las enzimas pueden degradar el antibiótico. Se puede utilizar una analogía militar para ilustrar la utilidad de la estrategia bacteriana. Las bacterias grampositivas que permiten el acceso relativamente libre a la membrana celular interna, pero pueden secretar enzimas en el medioambiente extracelular (fig. 17-4) son análogas a los combatientes que cuentan con una artillería pesada de largo alcance, pero se enfrentan a un ejército enemigo desplegado en una planicie abierta. Por el contrario, las bacterias gramnegativas tienen sólo rifles de un solo tiro, pero han ubicado a sus tiradores de primera para eliminar a los soldados enemigos a medida que marchan en una sola hilera a través del paso de montaña de los canales de porina y

la capa de peptidoglucano. El ejemplo de la estrategia combinada es bien ilustrado por *Serratia marcescens*, que suele ser sensible a las cefalosporinas de tercera generación y a los carbapenémicos.¹²² Una cepa que produjo grandes cantidades de una β -lactamasa cromosómica tenía resistencia de bajo nivel a estos antibióticos. Sin embargo, cuando se agregaron a la β -lactamasa barreras al pasaje del antibiótico a través de la membrana externa, el microorganismo aislado se volvió altamente resistente a los antibióticos.

El fenómeno de complementación también se puede ilustrar observando los efectos de un inóculo en la interacción entre distintas bacterias gramnegativas y antibióticos β -lactámicos (fig. 17-9). Una cepa de *Haemophilus influenzae* productora de β -lactamasa, que tiene barreras mínimas contra el transporte de ampicilina a través de la membrana, es destruida en forma eficaz si la relación de la bacteria con las moléculas de antibiótico es pequeña. Sin embargo, si la relación aumenta, las moléculas de antibiótico ya no pueden alcanzar a todas las bacterias, de modo que algunos microorganismos escapan al daño y son capaces de multiplicarse. Este fenómeno, conocido como efecto del inóculo, tiene importantes implicaciones potenciales para las pruebas en el laboratorio. Por el contrario, las bacterias entéricas que tienen barreras importantes contra el pasaje del antibiótico a través de la membrana son resistentes a la actividad bactericida aun cuando se presenten pocas bacterias. No existe ningún efecto de inóculo.

Por otra parte, los científicos han utilizado su conocimiento de los mecanismos de acción de los antibióticos para construir combinaciones sinérgicas que pueden derrotar los mecanismos de defensa bacterianos. La combinación de sulfametoxazol y trimetoprim es un buen ejemplo de la eficacia del uso de dos fármacos que actúan en diferentes puntos en una importante vía bioquímica bacteriana. Asimismo, la combinación de antibióticos β -lactámicos e inhibidores de la β -lactamasa tiene una lógica obvia como estrategia terapéutica. Por último, la combinación de aminoglucósidos y β -lactámicos para la infección enterocócica grave, utilizada al inicio en forma empírica,¹³¹ tiene una base racional una vez que se comprenden los mecanismos de acción de los antibióticos y la resistencia bacteriana (fig. 17-10). Los enterococos son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos, que no atraviesan la pared celular bacteriana de modo eficaz. Sin embargo, el agregado de β -lactámicos desorganiza lo suficiente el peptidoglucano de la pared celular de modo que los aminoglucósidos pueden penetrar en el citoplasma y ganar acceso a sus sitios diana ribosómicos. Por su parte, los enterococos han respondido desarrollando varios mecanismos para la resistencia a la combinación sinérgica: alteraciones de las proteínas de unión y β -lactamasa para las penicilinas y resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos por degradación enzimática o alteraciones ribosómicas.

El laboratorio como guía del tratamiento antibiótico

Un fármaco quimioterápico es un compuesto químico que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad. El compuesto puede tener un origen celular o puede haber sido sintetizado por un químico en el laboratorio. La enfermedad puede ser de cualquier tipo, incluidos los procesos infecciosos y neoplásicos. Un antibiótico es un agente antimicrobiano que es derivado de un microorganismo; un antibiótico es un fármaco que actúa fundamentalmente contra los microorganismos infecciosos.

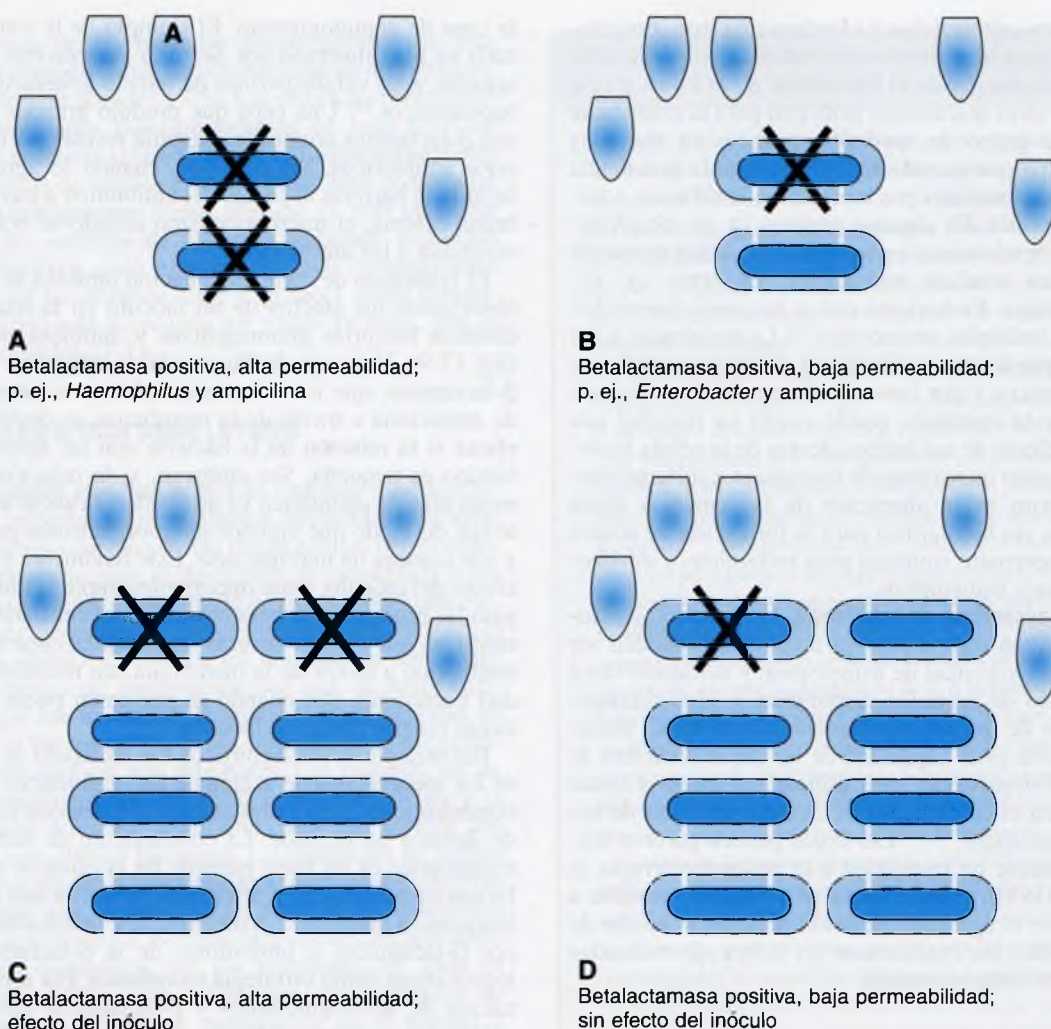


Figura 17-9 Actividad complementaria de β -lactamasa y barreras contra la difusión a través de las membranas externas, como se demuestra por los efectos del inóculo en las bacterias gramnegativas (A). Una cepa de *Haemophilus influenzae* productora de β -lactamasa permite la libre difusión de ampicilina (A) a través de la pared celular. A pesar de la presencia de la enzima, el antibiótico es capaz de destruir una pequeña cantidad de bacterias (X). (C) La presencia de gran cantidad de bacterias supera el efecto del antibiótico; una porción de la población bacteriana escapa a la lesión y es capaz de reproducirse. (B y D) Por el contrario, una cepa de *Enterobacter cloacae* también produce β -lactamasa, pero además limita la entrada del antibiótico en su sitio de acción sobre la membrana plasmática interna. En consecuencia, una porción de la población bacteriana puede escapar a la destrucción antibiótica y reproducirse, ya sea que el inóculo sea grande o pequeño. Existe un efecto de inóculo con *H. influenzae* y ampicilina, pero no con *Enterobacter* y ampicilina. La importancia de combinar dos mecanismos de resistencia: producción de enzimas inactivadoras y restricción del transporte de antibióticos a través de la membrana celular externa, es fundamental para el resultado dicotómico. En el texto, se explican otras causas de los efectos del inóculo.

Los microbiólogos pueden ser de gran ayuda para los médicos. Pueden evaluar las interacciones in vitro entre un microbio aislado y los antibióticos que serían apropiados para el tratamiento de una infección in vivo. Su investigación en el laboratorio puede proporcionar datos para ayudar al médico a decidir si las dosis seleccionadas de un antibiótico son suficientes.

Varios de los sistemas comerciales para medir la sensibilidad ofrecen resultados rápidos, lo cual permite a los microbiólogos comunicar los resultados de la identificación y la sensibilidad el mismo día que se ha aislado la cepa en el cultivo. Doren y cols. evaluaron cuidadosamente el impacto clínico de los informes “rápidos”.⁷⁰ Durante un año se evaluaron las bacterias aisladas utilizando un método comercial rápido (grupo rápido) o los métodos convencionales durante toda la noche (grupo convencional). El tiempo medio hasta el informe de los resultados

fue de 11,3 horas y de 19,6 horas en los grupos rápido y convencional, respectivamente. La duración de la hospitalización fue comparable en los dos grupos, pero ocurrieron mejorías significativas en el grupo rápido para los factores mencionados en el recuadro 17-2.

Un estudio ulterior de los aislamientos de hemocultivos demostró una correlación estadística entre el mayor tiempo desde la recolección de los hemocultivos hasta el informe inicial de los resultados con una mayor duración de la estadía hospitalaria.¹⁶ En este caso la detección más rápida de aislamientos bacteriémicos con instrumentos que evalúan continuamente el crecimiento en los frascos de hemocultivos fue responsable del efecto. Presumiblemente, la detección y el informe más rápidos de los resultados de la sensibilidad pudieron producir resultados aditivos, si no sinérgicos.

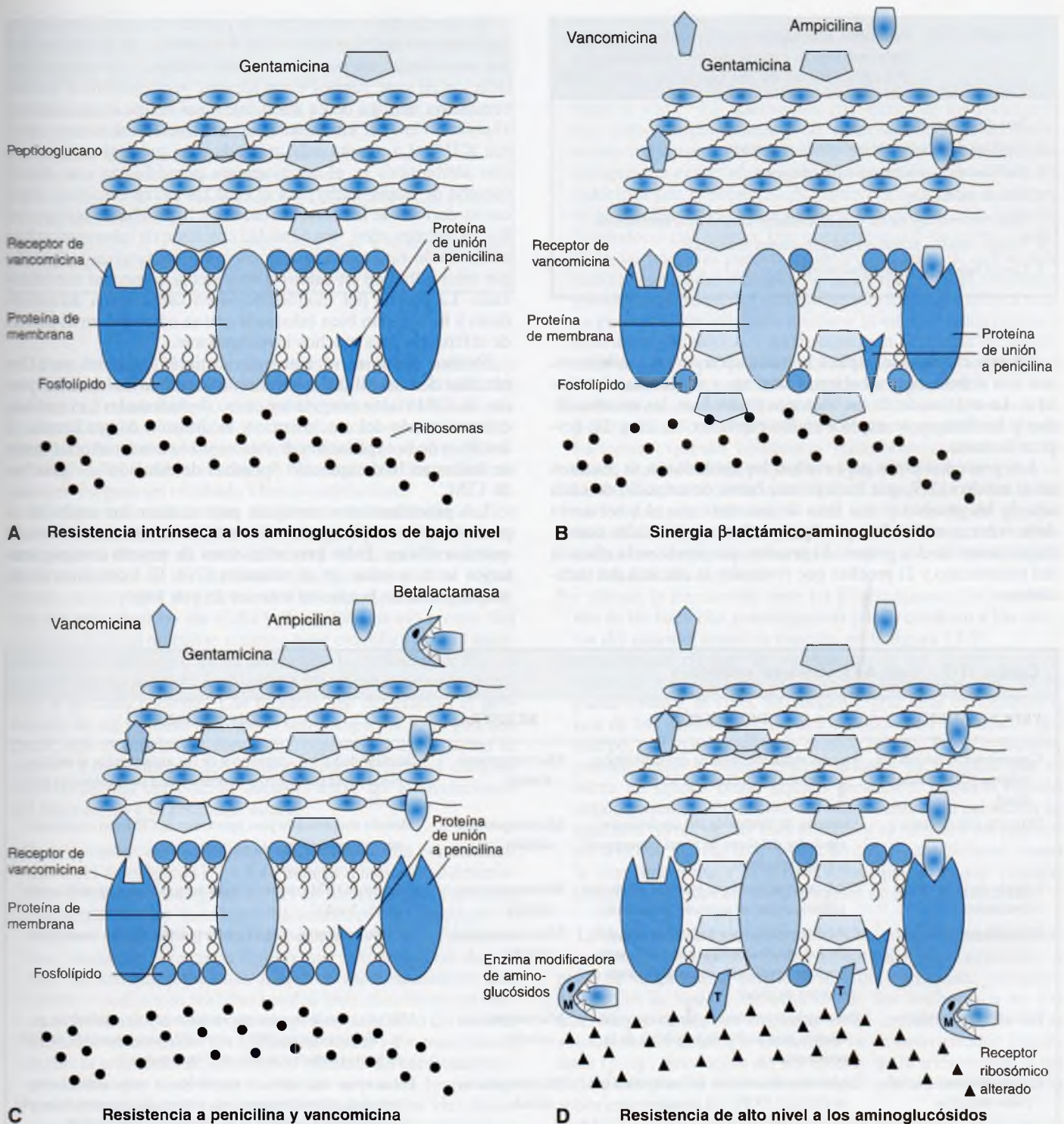


Figura 17-10 Respuesta microbiana de los enterococos a la actividad sinérgica de los antibióticos aminoglucósidos y β-lactámicos. En cada panel la membrana de una célula aislada y la pared celular de peptidoglucanos circundante (compárese con la fig. 17-4) de un enterococo rodean el citoplasma que contiene ribosomas. (A) Resistencia intrínseca de los enterococos a la gentamicina, que no atraviesa la membrana celular eficientemente y, por lo tanto, nunca alcanza el sitio diana, el ribosoma bacteriano. (B) Un antibiótico β-lactámico ha desorganizado la membrana celular al hacer "perforaciones" en la membrana, de modo que el aminoglucósido puede atravesar para alcanzar su sitio diana ribosómico. La combinación de β-lactámico y aminoglucósido, ninguno de cuales es totalmente eficaz solo, produce una acción antibiótica sinérgica. (C) El enterococo resistente ha producido β-lactamasa, lo que anula el efecto del antibiótico β-lactámico y reproduce la situación que se encuentra en A. Otra vez el aminoglucósido es incapaz de alcanzar el sitio diana ribosómico. (D) Otra estrategia microbiana: en este caso el β-lactámico sigue siendo eficaz y el aminoglucósido puede alcanzar su sitio diana ribosómico. Sin embargo, los ribosomas alterados bloquean la actividad antibacteriana del aminoglucósido (T) una vez que alcanza el sitio ribosómico. Ya no se presenta actividad sinérgica. Como alternativa, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos (M) inactivan el antibiótico antes de que alcance el ribosoma. Se pierde nuevamente la actividad sinérgica, porque las bacterias han adquirido resistencia de alto nivel al aminoglucósido. Obviamente, ambos mecanismos de resistencia bacterianos que se muestran en C y D podrían estar operando en la misma cepa, lo que produce una doble sombra.

Recuadro 17-2 Factores afectados positivamente por la determinación rápida de la sensibilidad a los antibióticos en las bacterias patógenas

1. Tasa de mortalidad.
2. Cantidad de estudios de laboratorio realizados.
3. Cantidad de procedimientos por imágenes.
4. Días de intubación.
5. Días transcurridos en un área de cuidados intensivos o intermedios.
6. Tiempo hasta la alteración del tratamiento antibiótico.
7. Costos totales de la hospitalización.

En este capítulo se explica la evaluación de los antibióticos que son activos contra bacterias aerobias y anaerobias facultativas. La evaluación de las bacterias anaerobias, las micobacterias y los hongos se explica en los capítulos 16, 19 y 21, respectivamente.

Los procedimientos para evaluar los antibióticos se resumen en el cuadro 17-7, que incluye una breve descripción de cada una de las pruebas y una lista de muestras que el laboratorio debe tener a mano. Las pruebas pueden ser divididas convenientemente en dos grupos: 1) pruebas que *predicen* la eficacia del tratamiento y 2) pruebas que *controlan* la eficacia del tratamiento.

Se han diseñado varios tipos de pruebas de sensibilidad a los antibióticos (antibiogramas). Las dos pruebas de referencia son los procedimientos por dilución macroscópica en caldo y por dilución en agar. Ambos están ideados para cuantificar la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible in vitro del microbio: la concentración inhibitoria mínima (CIM). La prueba más utilizada para guiar el tratamiento con antibióticos es el antibiograma por difusión con discos (prueba de Bauer-Kirby), en el cual las interpretaciones clínicas se derivan de las correlaciones con la prueba de referencia. En los últimos años, una cantidad creciente de laboratorios han utilizado de rutina una prueba en caldo miniaturizada (prueba por microdilución en caldo) o un sistema comercial automatizado. La prueba por microdilución en caldo se ha difundido tanto y ha sido tan bien estudiada que se convirtió en el patrón de referencia para muchos investigadores.

Existen ahora en el comercio distintas opciones para los estudios de sensibilidad a los antibióticos, que incluyen las placas de CIM (tanto congeladas como deshidratadas), el análisis computarizado del crecimiento y la difusión de gradientes. A los fines de la explicación de este capítulo estos métodos serán incluidos en la designación “pruebas de dilución” o “pruebas de CIM”.

Los procedimientos restantes para evaluar los antibióticos pocas veces se utilizan o suelen realizarse en laboratorios de química clínica. Estos procedimientos de prueba complementarios se mencionan en el recuadro 17-3. El lector interesado puede consultar la edición anterior de este libro.

Cuadro 17-7 Guía del tratamiento antibiótico			
PROCEDIMIENTO	DEFINICIÓN	MUESTRAS	INDICACIONES
Concentración inhibitoria mínima (CIM, caldo o agar)	La concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento visible	Microorganismo aislado	Sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos si se establece papel etiológico y la sensibilidad (o resistencia) no es predecible
Difusión con discos	Diámetro de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel impregnado con el antibiótico	Microorganismo aislado	Método simplificado para aproximar la CIM con correlaciones interpretativas
Cálculo de la curva de crecimiento	CIM calculada sobre la base del efecto del antibiótico en las especies particulares	Microorganismo aislado	Cálculo de CIM computarizado integrado con identificación (p. ej., Vitek)
Difusión por gradiente	CIM determinada por la intersección del crecimiento bacteriano con las concentraciones graduadas de un antibiótico en una tira de papel	Microorganismo aislado	Método comercial (Etest®) útil en determinadas situaciones
Detección molecular	Demostración molecular de gen/es o producto/s genético/s responsable/s de la resistencia	Microorganismo aislado	Más útil cuando se presenta un único gen de resistencia, p. ej., alteraciones en PBP 2 en estafilococos; también se utiliza para la caracterización de β-lactamasas
Concentraciones bactericidas mínimas	Concentración mínima del antibiótico que destruye el 99,9% del inóculo	Microorganismo aislado	Pocas veces está indicado; posiblemente endocarditis estreptocócica; potencialmente para osteomielitis; potencialmente aislamientos tolerantes si no responde al tratamiento
Concentraciones de los antibióticos	Concentración (µg/mL) del antibiótico en suero	Pico en suero, mínima en suero	Impredicibilidad de las concentraciones pico o potencial para la toxicidad; puede ser incorporado en algoritmo de manejo
Títulos bactericidas en suero	Dilución del suero que destruye el 99,9% del inóculo	Pico en suero, mínima en suero, microbio aislado	Pocas veces está indicado; posiblemente endocarditis bacteriana, osteomielitis, sepsis por gramnegativos en pacientes inmunodeprimidos
Pruebas sinérgicas	Actividad sinérgica de múltiples antibióticos	Microorganismo aislado	Procedimiento de investigación para el desarrollo de regímenes terapéuticos; pocas veces, confirmación de sinergia contra aislamientos individuales, más comúnmente en microorganismos aislados en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística

Recuadro 17-3 Otros procedimientos para evaluar los antibióticos

1. Determinación de la actividad bactericida y de la actividad inhibitoria de los antibióticos contra las bacterias aisladas
2. Medición de la actividad antibacteriana de los fármacos en combinación, también conocida como prueba de sinergia
3. Cuantificación de las concentraciones del antibiótico en líquidos corporales, sobre todo suero
4. Determinación de la actividad bactericida en suero, a veces denominada prueba de Schlichter

El medio más útil para evaluar si el tratamiento antibiótico es adecuado en muchas infecciones es la respuesta clínica del paciente al tratamiento y, si fuera necesario, la demostración mediante cultivos repetidos de que el microorganismo infectante ha sido eliminado (curación bacteriana) o persiste (fracaso bacteriano). Lamentablemente, una curación bacteriana no siempre asegura un resultado clínico satisfactorio.

Es importante señalar que las pruebas de sensibilidad a los antibióticos están destinadas a ser una guía para el médico, no una garantía de que un antibiótico será eficaz en el tratamiento. Un objetivo de los microbiólogos ha sido, y debe seguir siendo, la provisión de pruebas *in vitro* estandarizadas que puedan ser reproducidas día a día y de un laboratorio a otro. Sin reproducibilidad no existe ninguna base científica para el tratamiento. Sin embargo, en la lucha por la estandarización, es posible que no se tenga en cuenta la variabilidad de cada infección y de cada paciente. Los factores que determinan el pronóstico de un proceso infeccioso son complejos y, en muchos casos, son evaluados en forma incompleta por las pruebas *in vitro*.³³² Los ejemplos que siguen pueden aclarar el carácter esquivo de una correlación absoluta entre las interrelaciones del laboratorio y el resultado clínico.

pH: las pruebas de sensibilidad microbiana están estandarizadas a pH fisiológico (7,2 a 7,4), aunque a menudo se desarrollan niveles no fisiológicos de pH en los sitios de infecciones purulentas (como meningitis bacteriémica²⁹⁸ o abscesos¹²¹). Algunos antibióticos, como las penicilinas y las cefalosporinas, funcionan bien en un amplio intervalo de valores de pH. Las tetraciclinas funcionan mejor en medioambientes más ácidos y podrían en realidad resultar más eficaces en un exudado inflamatorio ácido que en medios de cultivo del laboratorio. Por el contrario, los aminoglucósidos y los macrólidos, como la eritromicina, son menos eficaces en medioambientes ácidos que a pH neutro. Aunque se pueden lograr concentraciones elevadas de aminoglucósidos en las vías urinarias, los fármacos no funcionarán en condiciones óptimas si el pH de la orina es bajo.

Cationes: en ciertas combinaciones de bacterias y agentes antimicrobianos, más notablemente entre *Pseudomonas aeruginosa* y aminoglucósidos, la concentración de cationes divalentes, en especial calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}), tiene un efecto drástico en la sensibilidad *in vitro*. Las variaciones en la concentración de cationes²⁶⁴ pueden desencadenar una diversidad de resultados entre la sensibilidad y la resistencia como consecuencia de cambios en el transporte de los agentes antimicrobianos a través de la membrana. Los medios de agar y de caldo varían mucho en su concentración de catio-

nes divalentes. Por convención, las determinaciones se realizan bajo condiciones fisiológicas.

Inóculo: con ciertas combinaciones de bacterias y antibiótico, el inóculo es de gran importancia para determinar la sensibilidad *in vitro*.⁷⁹ La inactivación enzimática de los β -lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, es un mecanismo importante de resistencia bacteriana. Estas enzimas siempre son expresadas en algunas bacterias, pero deben ser inducidas por la presencia del antibiótico en otras bacterias. Si se incuban *in vitro* con penicilina pequeñas cantidades de *Staphylococcus aureus*, que contiene una β -lactamasa inducible, las bacterias pueden ser destruidas antes de que se produzcan cantidades eficaces de la enzima. Por el contrario, grandes cantidades de bacterias en una infección clínica activa pueden sobrevivir para producir la enzima inactivadora y destruir al antibiótico. En este caso, con la prueba de laboratorio se podría producir una falsa impresión de sensibilidad a los antibióticos y un falso sentido de seguridad.

Cuando interactúan estafilococos y penicilinas resistentes a las β -lactamasas, como meticilina, sólo una pequeña fracción de bacterias expresan resistencia (heterorresistencia). Por lo tanto, si el inóculo es pequeño, es posible que no se incluyan las células bacterianas resistentes. La cantidad de bacterias en los pacientes infectados varía mucho, de modo que los inóculos estandarizados utilizados en el laboratorio representan un compromiso razonable más que una reproducción de condiciones *in vivo*.

Por último, la interacción entre las β -lactamasas y las membranas de las bacterias gramnegativas puede conducir a los efectos del inóculo, como se muestra en la figura 17-9.

Farmacología clínica: la penetración de los antibióticos en sitios de infección es otra variable importante que no se puede evaluar *in vitro*. Se pueden lograr altas concentraciones de los antibióticos en sitios donde son excretados del cuerpo, por lo habitual en la orina o la bilis. Por el contrario, pueden hallarse bajas concentraciones en relación con el suero en tejidos como líquido prostático, hueso o líquido cefalorraquídeo. En el caso del cloranfenicol, la excreción se realiza a través de las vías biliares y el fármaco no aparece en la orina. Sucede lo inverso con ciertos antibióticos, como la nitrofurantoína y la norfloxacin, que no logran concentraciones eficaces en sitios distintos de las vías urinarias.

La ineficacia de muchos antibióticos, como los aminoglucósidos, en el tratamiento de las infecciones por *Legionella*, a pesar de su excelente actividad *in vitro*, es causada probablemente por la mala concentración de los antibióticos en los macrófagos donde las bacterias están creciendo.²⁰⁵ En otras situaciones, la fisiología bacteriana es un determinante importante (p. ej., desviación de los efectos de la trimetoprim y las sulfamidas por los enterococos; véase más adelante la sección sobre enterococos).

Algunas interacciones favorecen la resolución de la infección, aun cuando el tratamiento antibiótico sea subóptimo. Las defensas inflamatorias e inmunitarias del paciente son esenciales para el éxito del resultado clínico. Está claro que las bajas concentraciones de los antibióticos, por debajo de la concentración necesaria para destruir la bacteria, pueden aumentar la capacidad de las células fagocíticas para ingerir y destruir un microorganismo infectante.¹²⁸

Muchas infecciones, sobre todo las causadas por las bacterias anaerobias estrictas, son sinérgicas; es decir, las bacterias dependen unas de otras para la supervivencia. Esta infección puede curarse con fármacos que son ineficaces contra algunas

de las bacterias infectantes si se eliminan los participantes esenciales.²⁷³ Al considerar todos los factores que influyen en el resultado de una infección, es imperativo que el laboratorio proporcione a los médicos el "registro de rastreo" del antibiótico para guiarlos en la selección del tratamiento antibiótico apropiado. Algunos estudios clínicos bien diseñados han demostrado una relación entre el pronóstico y lo apropiado del tratamiento.³³⁷ Por lo tanto, los médicos deben relacionar los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la experiencia clínica con la selección de los regímenes terapéuticos en los pacientes con infecciones similares.

Pruebas para determinar la actividad inhibitoria de los antibióticos

Indicaciones

Las pruebas de actividad inhibitoria de los antibióticos están ideadas para bacterias que crecen bien después de una incubación de una noche en aire y tienen pruebas de sensibilidad imprevisibles. Las bacterias con requerimientos nutricionales especiales, que crecen más lentamente o necesitan suplementos nutricionales o atmosféricos, deben ser evaluadas con antibiogramas por dilución sólo cuando el uso cuidadoso de las cepas bacterianas de control demuestra la ausencia de efectos inhibitorios sobre las interacciones. La prueba por difusión con discos puede ser modificada para estos microorganismos cuando el procedimiento ha sido validado mediante la comparación con pruebas de referencia y con la experiencia clínica.²²²

Los microbiólogos deben resistir la presión de los médicos para aplicar los procedimientos más allá de sus límites establecidos. Los participantes en los estudios de pruebas de eficiencia del College of American Pathologists cometieron muchos errores en la determinación de la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* a la penicilina y la ampicilina porque las pautas publicadas no fueron diseñadas para esta bacteria.¹⁴⁴ Otros estudios hicieron posible establecer pautas válidas para las especies de *Listeria* y los resultados de los estudios han mejorado.

Lamentablemente, la lista de bacterias que tienen sensibilidades siempre predecibles se está volviendo más breve. La prevalencia de cepas de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* productoras de β -lactamasas es suficientemente alta como para que no se considere que estos microorganismos son sensibles a los análogos de la penicilina.⁶⁶ Los neumococos que son relativamente resistentes a la penicilina (CIM, 0,12-1 $\mu\text{g/mL}$) o que tienen resistencia de alto grado (CIM, > 1 $\mu\text{g/mL}$) son cada vez más frecuentes en los Estados Unidos y se deben evaluar para resistencia las cepas neumocócicas aisladas en las infecciones graves.⁶³ Aun la vancomicina, el bastión de la antibióticoterapia para las infecciones causadas por bacterias grampositivas, ha mostrado fisuras en su eficacia contra los enterococos¹⁰³ y los estafilococos.⁹⁴ Casi solo, *Streptococcus pyogenes* sigue sensible a la penicilina, aunque la resistencia a los antibióticos macrólidos se ha convertido en un hecho de la vida en varios géneros importantes de cocos grampositivos.^{39,63,172}

En ciertas situaciones, que se resumen en el cuadro 17-8, no se deben realizar las pruebas de sensibilidad ni se deben comunicar los resultados a los médicos. Algunos de estos problemas se consideran en forma más completa en las secciones correspondiente de este capítulo.

En algunos casos la sensibilidad o la resistencia siguen siendo predecibles y no están indicadas las pruebas de rutina. Estas pruebas pueden estar indicadas cuando la respuesta clínica no es la esperada. Sin embargo, cabe recordar que puede haber explicaciones alternativas a la falta de respuesta clínica. Los pacientes con faringitis por *Streptococcus pyogenes* suelen sufrir recaídas clínicas o bacteriológicas, después de las cuales los médicos sospechan resistencia a la penicilina. Como mencionamos, no se ha detectado aún resistencia de *S. pyogenes* a la penicilina; de las posibles explicaciones alternativas para las recaídas la más probable es la penetración insuficiente del antibiótico administrado por boca en las criptas de las amígdalas y las adenoides donde las bacterias merodean. Por supuesto, los microbiólogos deben estar listos para revisar la lista cuando sea pertinente.

Sólo deben evaluarse los microorganismos aislados que producen una infección. Las bacterias aisladas en un líquido corporal normalmente estéril suelen ser patógenas. Si se aísla la bacteria potencialmente patógena en un sitio que contiene flora colonizadora, como las vías respiratorias altas o la piel, se debe escrutar más estrechamente el cultivo antes de realizar una prueba de sensibilidad, sobre todo si se presentan diversas especies de microorganismos. El examen de un frotis con tinción de Gram puede documentar la inclusión de células epiteliales pavimentosas y sugiere la contaminación por secreciones colonizadas, o la ausencia de neutrófilos segmentados, lo que indica la falta de una respuesta inflamatoria. En situaciones en las cuales el microbiólogo no puede determinar si una prueba de sensibilidad es procedente, es adecuado realizar una consulta con el médico.

Elección de la prueba

En la mayoría de las situaciones es suficiente realizar un antibiograma por difusión con discos (protocolo 17-1) o un antibiograma por microdilución en caldo (protocolo 17-2) para guiar el tratamiento clínico. Una alternativa más reciente es el antibiograma por difusión de gradiente (Etest, AB Biodisk, Solna, Suecia) (protocolo 17-3). Las ventajas de las pruebas de dilución es que proporcionan más información cuantitativa y pueden aplicarse en un espectro más amplio de microorganismos aislados que la prueba de difusión. Sin embargo, no existe un potencial definido para una mala interpretación de un resultado cuantitativo si los médicos no comprenden cómo utilizar la información y el laboratorio no proporciona suficiente guía en la interpretación. Las pruebas de difusión con discos tiene un registro de rastreo largo y exitoso. La elección del método que se debe utilizar depende de las necesidades y los recursos locales. Para evaluar las pruebas de sensibilidad, la mayoría de los investigadores utilizan la siguiente convención:

- Error muy grave: caracterización de una bacteria aislada resistente como sensible.
- Error grave: caracterización de una bacteria aislada sensible como resistente.
- Error menor: caracterización de una cepa sensible o resistente como de sensibilidad intermedia, o caracterización de una cepa de sensibilidad intermedia como sensible o resistente.

Selección de los antibióticos

La selección final de los antibióticos para el formulario del hospital debe decidirse en consulta con los miembros del personal médico. En los cuadros 17-9 y 17-10 se enumeran las lis-

Cuadro 17-8 Situaciones en las cuales no deben realizarse las pruebas para antibióticos o no se deben comunicar sus resultados

CATEGORÍA	ANTIBIÓTICO/S	MICROORGANISMO/S	SITIO	ACCIÓN	FUNDAMENTO
Sensibilidad predecible	Penicilinas	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i>	Todos	No se evalúa de rutina; enviar los aislamientos resistentes a un laboratorio de referencia	No está indicada la evaluación
	Nitrofurantoína; trimetoprim-sulfametoxazol	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Orina	No es necesaria la evaluación	Sensibilidad predecible
Resistencia predecible	Trimetoprim-sulfametoxazol; fluoroquinolonas	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Todos	No se evalúa de rutina	No está indicada la evaluación
El antibiótico no se acumula en el sitio de la infección	Cefalosporinas de primera y de segunda generación; clindamicina; macrólidos; tetraciclinas; fluoroquinolonas; antibióticos administrados por boca	Todos	LCR	No se evalúa	Los antibióticos no penetran en el LCR ni se acumulan en concentraciones terapéuticas
	Varios	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LCR	Evaluar y comunicar sólo penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, meropenem o vancomicina	La eficacia clínica no está claramente establecida en las concentraciones logradas en el LCR
	Cloranfenicol	Todos	Vías urinarias	No se evalúa	Antibiótico excretado a través de las vías biliares; no es excretado en la orina
	Norfloxacin; nitrofurantoína	Todos	Sitios distintos de la orina	No se evalúa	Antibiótico excretado en la orina; no alcanza concentraciones terapéuticas en otros sitios
Las pruebas in vitro no predicen confiablemente resistencia	Cefalosporinas	Especies de <i>Enterococcus</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i>	Todos	No se evalúa	No está indicada la evaluación y los resultados de la sensibilidad pueden ser engañosos
	Aminoglucósidos (dosis bajas)	Especies de <i>Enterococcus</i>	Todos	No se evalúa	No está indicada la evaluación salvo en las pruebas de dosis altas para determinar la sinergia; los resultados de sensibilidad pueden ser engañosos
	Clindamicina; trimetoprim; trimetoprim-sulfametoxazol	Especies de <i>Enterococcus</i>	Todos	No se evalúa	No está indicada la evaluación y los resultados de sensibilidad pueden ser engañosos
	Todos los antibióticos β-lactámicos	Especies de <i>Staphylococcus</i> resistentes a la oxacilina	Todos	Comunicar como resistente	Los resultados de sensibilidad no predicen la eficacia clínica y serán engañosos
	Cefalosporinas de primera y de segunda generación; aminoglucósidos	Especies de <i>Salmonella</i> ; especies de <i>Shigella</i>	Todos	No se evalúa o se comunica como resistente	Los resultados de sensibilidad no predicen la eficacia clínica y serán engañosos
	Antibióticos β-lactámicos salvo los carbapenémicos (imipenem y meropenem)	<i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> que producen β-lactamasas de espectro ampliado	Todos	No se comunica o se comunica como resistente	Los resultados de sensibilidad no predicen la eficacia clínica y serán engañosos

Adaptado de las referencias^{217,218}

Cuadro 17-9 Agrupamientos sugeridos de antibióticos aprobados por la FDA que deben ser considerados por los laboratorios de microbiología clínica para las pruebas y el informe de rutina de microorganismos sin requerimientos nutricionales especiales

	ENTEROBACTERIACEAE ^e	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> Y OTRAS NO ENTEROBACTERIAS ^f	ESPECIES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	ESPECIES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> ^g
PRUEBA PRIMARIA E INFORME PARA EL GRUPO A	Ampicilina ^a Cefazolina ^a Cefalotina ^a Gentamicina	Ceftazidima Gentamicina Mezlocilina o ticarcilina Piperacilina	Oxacilina ^f Penicilina ^f	Penicilina ^a o ampicilina
PRUEBA PRIMARIA DEL GRUPO B^c INFORME SELECTIVO	Amikacina Amoxicilina-ácido clavulánico o ampicilina-sulbactam Piperacilina-tazobactam Ticarcilina-ácido clavulánico Cefamandol o cefonicida o cefuroxima Cefepina Cefmetazol Cefoperazona ^a Cefotetán Cefoxitina Cefotaxima ^{a,h,i} o cefizoxima ^{a,i} o ceftriaxona ^{a,h,i} Ciprofloxacina ^a o levofloxacina ^a Ertapenem Imipenem o meropenem Mezlocilina o piperacilina Ticarcilina Trimetoprim-sulfametoxazol ^a	Amikacina Cefepima Cefoperazona Aztreonam Ciprofloxacina Imipenem Meropenem Ticarcilina-ácido clavulánico ^k Tobramicina Trimetoprim-sulfametoxazol ^k	Azitromicina ^d o claritromicina ^d o eritromicina ^d Clindamicina ^d Linezolid Trimetoprim-sulfametoxazol Vancomicina	Linezolid Quinupristina-dalfopristina ^r Vancomicina ^p
PRUEBA PRIMARIA DEL GRUPO C^c INFORME SELECTIVO	Aztreonam Ceftazidima (ambos son indicadores útiles de las β-lactamasas de espectro ampliado) ⁱ Cloranfenicol ^{d,g} Kanamicina Netilmicina Tetraciclina ^b Tobramicina	Cefotaxima o ceftriaxona Cloranfenicol ^{d,k} Netilmicina	Cloranfenicol ^d Ciprofloxacina o levofloxacina u ofloxacina Gatifloxacina Gentamicina Quinupristina-dalfopristina ^m Rifampicina ^c Tetraciclina ^b	Gentamicina (evaluar sólo la resistencia de alto nivel) Estreptomicina (evaluar sólo la resistencia de alto nivel) Cloranfenicol ^d Eritromicina ^d Rifampicina ^d Tetraciclina ^b (Estos agentes pueden ser evaluados para enterococos resistentes a la vancomicina) ^q
COMPLEMENTARIO DEL GRUPO U SÓLO PARA ORINA	Carbenicilina Cinoxacina Lomefloxacina o norfloxacina u ofloxacina Gatifloxacina Loracarbef Nitrofurantoína Sulfisoxazol Trimetoprim	Carbenicilina Ceftizoxima Levofloxacina o lomefloxacina o norfloxacina u ofloxacina Sulfisoxazol Tetraciclina ^{a,k}	Lomefloxacina o norfloxacina Nitrofurantoína Sulfisoxazol Trimetoprim	Ciprofloxacina Levofloxacina Norfloxacina Nitrofurantoína Tetraciclina ^b

(Continúa)

Cuadro 17-9 Agrupamientos sugeridos de antibióticos aprobados por la FDA que deben ser considerados por los laboratorios de microbiología clínica para las pruebas y el informe de rutina de microorganismos sin requerimientos nutricionales especiales (cont.)

Advertencia: los siguientes antibióticos no deben ser comunicados de rutina para las bacterias aisladas del LCR y que están incluidas en este documento. Estos antibióticos no son los fármacos de elección y es posible que no sean eficaces para el tratamiento de las infecciones del LCR causadas por estos microorganismos (las bacterias incluidas en los cuadros 2A y 2J):

agentes administrados sólo por vía oral
cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto cefuroxima sódica)
clindamicina
macrólidos
tetraciclinas
fluoroquinolonas

Observación 1: la selección de los antibióticos más apropiados para evaluar y comunicar es una decisión que toma cada laboratorio clínico en consulta con los médicos especialistas en enfermedades infecciosas y la farmacia, y con los comités de farmacia, terapéutica y control de infecciones del personal médico. Las listas para cada grupo de microorganismos comprende agentes de eficacia comprobada que muestran un rendimiento aceptable de la prueba in vitro. Las consideraciones acerca de la asignación de los agentes a los grupos A, B, C y U incluyen eficacia clínica, prevalencia de resistencia, reducción de la aparición de resistencia, costo y recomendaciones de consenso actuales para fármacos de primera elección y alternativos, además del comentario específico en las notas al pie f y g. Las evaluaciones de agentes seleccionados pueden ser útiles a los fines del control de las infecciones.

Observación 2: los recuadros en el cuadro designan agrupamientos de agentes comparables que no es necesario duplicar en las pruebas, porque los resultados de la interpretación suelen ser similares y la eficacia clínica es comparable. Además "o" designa un grupo relacionado de agentes que tiene un espectro de actividad y resultados interpretativos casi idénticos y para los cuales la resistencia cruzada y la sensibilidad son casi completas. Por lo tanto, habitualmente es necesario seleccionar sólo uno de los agentes dentro de cada recuadro de selección (agrupamiento o grupo relacionado) para las pruebas. Se deben evaluar los agentes que se comunican, a menos que el informe basado sobre la evaluación de otro agente proporcione un resultado más exacto (p. ej., sensibilidad de los estafilococos a cefazolina o cefalotina sobre la base de las pruebas de oxacilina) y habitualmente deben equipararse a los incluidos en el vademécum hospitalario; o el informe debe incluir notas al pie que indiquen los agentes que suelen tener resultados comparables en la interpretación. Por último, se deben considerar para el informe los resultados inesperados (p. ej., resistencia de las enterobacterias a las cefalosporinas de tercera generación o imipenem).

Observación 3: la información en negrita se considera tentativa durante un año.

Comentarios generales

La cefalotina puede ser utilizada para representar cefalotina, cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor y cefradoxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozilo y loracarbef (sólo aislamientos urinarios) pueden ser evaluados en forma individual, porque algunas cepas pueden ser sensibles a estos agentes cuando son resistentes a la cefalotina.

Los microorganismos que son sensibles a las tetraciclinas también deben ser considerados sensibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos que son intermedios o resistentes a la tetraciclina pueden ser sensibles a doxiciclina, minociclina o ambas.

Tratamiento: no se debe utilizar la rifampicina sola como quimioterapia.

No se comunica de rutina sobre microorganismos aislados de las vías urinarias.

El grupo B representa agentes que pueden justificar una evaluación primaria pero que sólo deben ser comunicados de forma selectiva, como cuando el microorganismo es resistente a agentes de la misma familia en el grupo A. Otras indicaciones para informar el resultado podrían incluir fuentes de muestras seleccionadas (p. ej., cefalosporinas de tercera generación seleccionadas para el aislamiento de bacterias entericas de LCR o trimetoprim-sulfametoxazol para los aislamientos de las vías urinarias); alergia o intolerancia establecida o falta de respuesta a un agente en el grupo A; infecciones polimicrobianas; infecciones que afectan múltiples sitios con diferentes microorganismos o informes para el control de infecciones como auxiliar epidemiológico.

El grupo C representa antibióticos alternativos o suplementarios que pueden requerir pruebas en instituciones que albergan cepas endémicas o epidémicas resistentes a uno o más de los agentes (especialmente en la misma familia, p. ej., β -lactámicos o aminoglucósidos) o para el tratamiento de microorganismos inusuales (p. ej., cloranfenicol para algunas especies de Pseudomonas y cloranfenicol, eritromicina, rifampicina y tetraciclina para algunos enterococos resistentes a la vancomicina) o informe al control de infecciones como auxiliar epidemiológico.

Enterobacterias

Para los aislamientos fecales de especies de Salmonella y Shigella, sólo se deben evaluar y comunicar de rutina ampicilina, una fluoroquinolona y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, se deben evaluar y comunicar cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación para los aislamientos extraintestinales de especies de Salmonella.

La cefotaxima y la ceftriaxona deben ser evaluadas y comunicadas en los aislamientos del LCR en lugar de cefalotina y cefazolina.

*Las cepas de especies de Klebsiella y Escherichia coli que producen β -lactamasas de espectro ampliado pueden ser clínicamente resistentes al tratamiento con penicilinas, cefalosporinas o aztreonam, a pesar de la aparente sensibilidad in vitro a algunos de estos agentes. Algunas de estas cepas muestran CIM por encima de la población sensible normal pero por debajo de los puntos de corte estándares para ciertas cefalosporinas de espectro ampliado o aztreonam; estas cepas pueden ser evaluadas para la producción potencial de β -lactamasas de espectro ampliado utilizando los puntos de corte de examen de detección enumerados al final del cuadro 2A, **Prueba de detección inicial**. Otras cepas pueden dar un resultado intermedio o resistente por los puntos de corte estándares a uno o más de estos agentes. En todas las cepas con β -lactamasas de espectro ampliado, las CIM para una o más de las cefalosporinas de espectro ampliado o aztreonam deben disminuir en presencia de ácido clavulánico como se describe al final del cuadro 2A, **Prueba de confirmación fenotípica**. Para todas las cepas productoras de β -lactamasas de espectro ampliado confirmadas, la interpretación de la prueba debe ser comunicada como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. (Véase Glosario 1 para los agentes específicos incluidos en la clase de antibiótico, penicilinas y subclase de antibióticos, cefalosporinas).*

Pseudomonas aeruginosa y otras no enterobacterias

Las no enterobacterias incluyen especies de Acinetobacter, Stenotrophomonas maltophilia, especies de Pseudomonas y otros bacilos gramnegativos, no fermentadores de glucosa y sin requerimientos nutricionales especiales.

Puede estar indicada para la evaluación primaria de algunas especies de Pseudomonas (fuera de P. aeruginosa), S. maltophilia (también se puede evaluar el moxalactam) y especies de Acinetobacter (se puede evaluar ampicilina-sulbactam y se informa para especies de Acinetobacter resistente a otros agentes).

Especies de Staphylococcus

Los estafilococos sensibles a la penicilina también son sensibles a otras penicilinas, cefemes y carbapenémicos aprobados para uso por la FDA para las infecciones estafilocócicas. Las cepas resistentes a la penicilina y sensibles a la oxacilina son resistentes a la penicilina lábiles a la penicilinas pero sensibles a otras penicilinas estables a la penicilinas. Las combinaciones β -lactámicos/inhibidores de la β -lactamasas, los cefemes relevantes y los carbapenémicos. Véase Glosario 1 para los agentes específicos incluidos en la clase de antibiótico o la subclase de antibiótico indicada. Los estafilococos resistentes a la oxacilina son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos actualmente disponibles. Por lo tanto, la sensibilidad o la resistencia a un amplio conjunto de antibióticos β -lactámicos puede deducirse de las pruebas sólo sobre penicilina y oxacilina. No se aconsejan las pruebas de rutina de otras penicilinas, combinaciones de inhibidores de β -lactamasas, cefemes y carbapenémicos.

**Para informar contra Staphylococcus aureus sensible a la metilicina.*

Especies de Enterococcus

Advertencia: para especies de Enterococcus, cefalosporinas, aminoglucósidos (salvo para la evaluación de resistencia de alto nivel), clindamicina y trimetoprim-sulfametoxazol pueden parecer activos in vitro pero no son eficaces desde el punto de vista clínico y no deben ser comunicados como sensibles.

Se puede utilizar la sensibilidad a la penicilina para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina y piperacilina-tazobactam para enterococos no productores de β -lactamasas. Para los aislamientos de sangre y LCR, también se recomienda una prueba para β -lactamasas.

Tratamiento: el uso combinado de penicilina o ampicilina, más un aminoglucósido, suele estar indicado para las infecciones enterocócicas graves, como la endocarditis.

Cuadro 17-10 Agrupamientos sugeridos de antibióticos aprobados por la FDA que deben ser considerados por los laboratorios de microbiología clínica para las pruebas de sensibilidad y el informe de rutina de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales

	ESPECIES DE <i>HAEMOPHILUS</i> ^a	<i>NEISSERIA GONORRHOEA</i> ^a	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	ESPECIES DE <i>STREPTOCOCCUS</i> DISTINTOS DE <i>S. PNEUMONIAE</i>
PRUEBA PRIMARIA E INFORME PARA EL GRUPO A	Ampicilina ^{a,d}		Eritromicina ^a	Eritromicina ^{a,m} Penicilina ^{l,m} o ampicilina ^{l,n}
	Trimetoprim-sulfametoxazol		Penicilina ⁱ Trimetoprim-sulfametoxazol	
PRUEBA PRIMARIA DEL GRUPO B^a	Cefuroxima sódica (parenteral) Cefotaxima ^a o ceftazidima o cefizoxima ^a o ceftriaxona ^a		Cefepima Cefotaxima ^a o ceftriaxona ^a Clindamicina Gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, esparfloxacin Ofloxacina, gemifloxacina Tetraciclina ^d Vancomicina ⁱ	Cloranfenicol ^m Clindamicina ^m Vancomicina
	Cloranfenicol ^c Meropenem ^{e,h}			
PRUEBA COMPLEMENTARIA DEL GRUPO C^a INFORME SELECTIVO	Azitromicina ⁱ o claritromicina ⁱ Aztreonam Amoxicilina-ácido clavulánico ^f	Cefixima o cefotaxima o cefpodoxima o ceftizoxima o ceftriaxona	Amoxicilina o amoxicilina-ácido clavulánico	Cefepima o cefotaxima o ceftriaxona
	Cefaclor ⁱ o cefprozilo ⁱ o loracarbef ⁱ	Cefmetazol Cefotetán	Cefuroxima	Levofloxacina Ofloxacina
	Cefdinir ⁱ o cefixima ⁱ o cefpodoxima ⁱ	Cefoxitina Cefuroxima		
	Cefonicid			
	Cefuroxima axetilo ⁱ (oral)	Ciprofloxacina o gatifloxacina u ofloxacina	Cloranfenicol Ertapenem Imipenem Linezolid Rifampicina ^k	Linezolid Quinupristina-dalfopristina ⁱ
	Ciprofloxacina o gatifloxacina o levofloxacina o moxifloxacina u ofloxacina o esparfloxacin	Penicilina		
	Ertapenem o imipenem			
	Rifampicina	Espectinomicina		
	Tetraciclina ^d	Tetraciclina ^d		

Advertencia: los siguientes antibióticos no deben ser comunicados de rutina para las bacterias aisladas del LCR y que están incluidas en este documento. Estos antibióticos no son los fármacos de elección y es posible que no sean eficaces para el tratamiento de las infecciones del LCR causadas por estos microorganismos (las bacterias incluidas en los cuadros 2A y 2J):

agentes administrados sólo por vía oral
 cefalosporinas de primera y de segunda generación (excepto cefuroxima sódica)
 clindamicina
 macrólidos
 tetraciclinas
 fluoroquinolonas

(Continúa)

Cuadro 17-10 Agrupamientos sugeridos de antibióticos aprobados por la FDA que deben ser considerados por los laboratorios de microbiología clínica para las pruebas de sensibilidad y el informe de rutina de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales (cont.)

- OBSERVACIÓN 1:** la selección de los antibióticos más apropiados para evaluar y comunicar es una decisión que toma cada laboratorio clínico en consulta con los médicos especialistas en enfermedades infecciosas y la farmacia, y con los comités de farmacia, terapéutica y control de infecciones del personal médico. Las listas para cada grupo de microorganismos comprende antibióticos de eficacia comprobada que muestran un rendimiento aceptable de la prueba in vitro. Las consideraciones acerca de la asignación de los antibióticos a los grupos A, B, C y U incluyen eficacia clínica, prevalencia de resistencia, reducción de la aparición de resistencia, costo y recomendaciones de consenso actuales para fármacos de primera elección y alternativos, además del comentario específico en las notas al pie b y c. Las evaluaciones de agentes seleccionados pueden ser útiles a los fines del control de las infecciones.
- OBSERVACIÓN 2:** los recuadros en el cuadro designan grupos de antibióticos comparables que no es necesario duplicar en las pruebas, porque los resultados de la interpretación suelen ser similares y la eficacia clínica comparable. Además "o" designa un grupo relacionado de antibióticos que tiene un espectro de actividad y resultados interpretativos casi idénticos y para los cuales la resistencia cruzada y la sensibilidad son casi completas. Por lo tanto, habitualmente es necesario seleccionar sólo uno de los antibióticos dentro de cada recuadro de selección (grupo relacionado) para las pruebas. Se deben evaluar los agentes que se comunican, a menos que el informe basado sobre la evaluación de otro agente proporcione un resultado más exacto y habitualmente deben equipararse a los incluidos en el vademécum hospitalario; o el informe debe incluir notas al pie que indiquen los antibióticos que suelen tener resultados comparables en la interpretación. Por último, se deben considerar para el informe los resultados inesperados.
- OBSERVACIÓN 3:** la información en negrita se considera tentativa durante un año.

Comentarios generales

*Se pueden predecir la sensibilidad y la resistencia a azitromicina, claritromicina y diritromicina mediante la evaluación de eritromicina.

*El grupo B representa a los antibióticos que pueden justificar pruebas primarias pero que deben ser comunicados sólo selectivamente, como cuando el microorganismo es resistente a los agentes de la misma clase en el grupo A. Otras indicaciones para informar el resultado podrían incluir fuentes de muestras seleccionadas (p. ej., cepas de tercera generación seleccionadas para el aislamiento de H. influenzae en el LCR); alergia o intolerancia establecida o falta de respuesta a un agente del grupo A; infecciones polimicrobianas; infecciones que afectan múltiples sitios con diferentes microorganismos o informes para el control de infecciones como auxiliar epidemiológico.

*El grupo C representa antibióticos alternativos o suplementarios que pueden requerir pruebas en instituciones que albergan cepas endémicas o epidémicas resistentes a uno o más de los antibióticos (especialmente en la misma familia, p. ej., β -lactámicos) o para el tratamiento de microorganismos inusuales o informe al control de infecciones como auxiliar epidemiológico.

*Los microorganismos que son sensibles a la tetraciclina también se consideran sensibles a doxiciclina y minociclina.

Especies de Haemophilus

*Sólo el resultado de las pruebas con ampicilina, una de las cefalosporinas de tercera generación, cloranfenicol y meropenem debe ser comunicado de rutina con los aislamientos del LCR con Haemophilus influenzae.

Amoxicilina-ácido clavulánico, azitromicina, claritromicina, cefaclor, cefprozilo, loracarbef, cefdinir, cefixima, cefpodoxima y cefuroxima axetilo son agentes orales que pueden ser utilizados para el tratamiento empírico de las infecciones respiratorias debidas a especies de Haemophilus. Los resultados de la prueba de sensibilidad con estos antibióticos a menudo no son útiles para el tratamiento de pacientes individuales. Sin embargo, las pruebas de sensibilidad de la especie de Haemophilus con estos compuestos pueden ser apropiadas para los estudios de vigilancia o epidemiológicos.

*Se deben utilizar los resultados de las pruebas de sensibilidad a la ampicilina para predecir la actividad de amoxicilina. La mayoría de los aislamientos de H. influenzae que son resistentes a ampicilina y amoxicilina producen una β -lactamasa tipo TEM. En la mayoría de los casos, una prueba de β -lactamasa directa puede proporcionar un medio rápido para detectar resistencia a ampicilina y amoxicilina.

*Las indicaciones clínicas y los patógenos relevantes incluyen meningitis bacteriana y bacteriemia simultánea en asociación con meningitis causada por Haemophilus influenzae (cepas productoras y no productoras de β -lactamasas.)

Neisseria gonorrhoeae

La prueba de β -lactamasa detectará una forma de resistencia a la penicilina en N. gonorrhoeae y también puede ser utilizada para proporcionar información epidemiológica. Las cepas con resistencia mediada por cromosomas sólo pueden ser detectadas mediante pruebas adicionales de sensibilidad, como el método por difusión en disco o el método de la CIM por dilución en agar.

Streptococcus pneumoniae

Sólo los resultados de las pruebas con penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, meropenem y vancomicina deben ser comunicadas de rutina para los aislamientos en LCR de S. pneumoniae.

*Tratamiento: no se debe utilizar rifampicina sola como quimioterapia.

Especies de Streptococcus

*Tratamiento: los aislamientos con sensibilidad intermedia a penicilina o ampicilina pueden requerir un tratamiento combinado con un aminoglucósido para la acción bactericida.

*No se comunica de rutina para los microorganismos aislados de las vías urinarias.

*No son necesarias las pruebas de sensibilidad de penicilina y otros β -lactámicos aprobados por la FDA para el tratamiento de Streptococcus pyogenes o Streptococcus agalactiae para fines clínicos y no se deben realizar de rutina, dado que como sucede con la vancomicina, no se han reconocido cepas resistentes. Los criterios de interpretación provienen del desarrollo farmacéutico, la epidemiología o la monitorización para la resistencia emergente. Cualquier cepa que tenga una sensibilidad intermedia o sea resistente debe ser derivada a un laboratorio de referencia para su confirmación.

*Informar contra Streptococcus pyogenes.

tas de antibióticos que han sido sugeridos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (antes National Committee for Clinical Laboratory Standards).¹

¹ El permiso para utilizar fragmentos del M100-S7 (Examen de las CIM, cuadros complementarios, enero de 2003) y del M100-S13 (Difusión en disco: cuadros complementarios, enero de 2003) ha sido otorgado por el NCCLS. Los datos interpretativos sólo son válidos si se siguen los métodos M7-A6 (Métodos para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos por dilución para bacterias que crecen en condiciones aerobias; estándar aprobado 6ª ed.) y M2-A8 (Estándares de rendimiento para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en discos; Estándar aprobado 8ª ed.). El NCCLS actualiza periódicamente los cuadros M2 y M7 a través de nuevas ediciones de los estándares y suplementos. Los usuarios deben ser derivados a las ediciones más recientes. Los estándares actuales se pueden obtener en el NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 o de su sitio web (<http://www.nccls.org/>).

Obsérvese que muchos antibióticos son agrupados por clase porque el espectro de actividad es similar. Las recomendaciones recientes del CLSI encaran las pruebas selectivas y los informes selectivos, y reconocen que los problemas son complejos y que varían de una institución a otra. Washington ha proporcionado una guía para los agrupamientos de antibióticos (cuadro 17-11).³³³ No es necesario evaluar cada antibiótico de la lista. Cuando se seleccionan los antibióticos para las pruebas es necesario conocer y considerar los patrones de uso de los antibióticos y de resistencia bacteriana en cada comunidad. Se pueden realizar distinciones entre los antibióticos que son evaluados de rutina y aquellos cuyos resultados se comunican en forma habitual a los médicos.

En los cuadros 17-9 y 17-10 se ofrecen elecciones de antibióticos para las pruebas. En algunos casos, varios antibióticos

Cuadro 17-11 Agrupamiento de los antibióticos recomendados para evaluación e informe		
GRUPO	CATEGORÍA	TIPO DE ANTIBIÓTICO
A	Prueba e informe primario	Incluyen el panel de rutina e informan de rutina
B	Prueba primaria, informe selectivo	Antibióticos de segunda línea o de refuerzo para grupo A debido a un mayor costo o toxicidad, apropiado para un sitio específico o insuficiencia clínica con un antibiótico del grupo A
C	Pruebas complementarias; informes selectivos	Pruebas en instituciones con problemas específicos de resistencia bacteriana o en pacientes que son alérgicos a otros antibióticos o en infecciones inusuales
D	Complementaria	Pruebas sólo de infecciones de las vías urinarias

Adaptado de la referencia³³³.

pueden tener equivalencia terapéutica, es decir que proporcionan un espectro similar de actividad antimicrobiana. Sin embargo, es posible que los resultados de las pruebas in vitro de una cepa específica ante un agente no predigan el resultado in vitro ante otros antibióticos en el grupo; en efecto, estos antibióticos son equivalentes pero no siempre tienen la misma eficacia contra todas las cepas. Se deben evaluar todos los de un grupo considerados para uso terapéutico.

Por el contrario, se pueden aplicar los resultados de las pruebas in vitro de algunos antibióticos a los familiares cercanos. No es necesario evaluar cada agente del grupo. Algunas de estas situaciones se detallan en el cuadro 17-12.^{217,218}

Estandarización

La principal mejoría en la guía de laboratorio de las pruebas de sensibilidad en las últimas décadas ha provenido del desarrollo de procedimientos estandarizados que han sido adoptados ampliamente. Es muy importante cumplir con los protocolos recomendados para lograr resultados reproducibles. El CLSI publica en forma continua estándares para estas pruebas y otras. (Se pueden obtener copias de los *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* y los *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* solicitándolas por escrito al CLSI en 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898).²¹⁷⁻²²⁰ Es importante que todos los laboratorios clínicos adopten rápidamente los procedimientos revisados y las recomendaciones actuales. Que una institución sea miembro del CLSI garantiza que recibirá en forma oportuna todas las recomendaciones nuevas y revisadas. Washington ha resumido los recursos y procesos de esta organización de consenso nacional que incumben a los microbiólogos clínicos.³³³

Los siguientes parámetros son algunas de las importantes facetas de las pruebas de sensibilidad que han sido estandarizadas.

MEDIO DE CULTIVO

Se ha seleccionado caldo y agar de Mueller-Hinton para evaluar las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Estas fórmulas se aproximan más estrechamente a los criterios para un medio reproducible. Contienen infusión de carne de vaca deshidratada, digerido ácido de caseína y almidón de maíz. La mayoría de los patógenos crecen satisfactoriamente y los medios tienen un efecto inhibitor mínimo sobre sulfamidas, trimetoprim y tetraciclina.¹⁰ Se presentan grandes cantidades de timidina en algunos lotes de medios. Algunos microorganismos pueden utilizar la timidina para evitar el mecanismo de acción de trimetoprim y crecer, aun cuando sean innatamente resistentes al antibiótico. Se afectan particularmente los enterococos; las colonias aisladas pueden aparecer dentro de la zona establecida de inhibición alrededor de discos que contienen trimetoprim.

Es obvio a partir del examen de la fórmula que incluso el medio de Mueller-Hinton no está definido desde el punto de vista químico.¹⁷¹ El agar es un compuesto natural preparado a partir de algas rojas. La variación ocurre en la composición del agar entre los fabricantes e incluso entre los lotes producidos por una misma compañía, según el origen del alga. Continúan los intentos por reducir la variación entre los lotes de agar de Mueller-Hinton. Un estándar de referencia para los fabricantes puede proporcionar una mayor reproducibilidad.²⁵⁶ Se ha creado un medio formulado especialmente para evaluar *Haemophilus influenzae* que ha sido recomendado por el CLSI para uso habitual.¹⁵⁴ Este medio de prueba para *Haemophilus* puede utilizarse también para especies de *Haemophilus*, como se describe más adelante.¹⁵¹

pH

El pH del medio debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. El pH del medio de caldo puede evaluarse en forma directa con un electrodo para pH y los medios de agar pueden evaluarse macerando lo suficiente el agar de modo que se pueda sumergir la punta del electrodo, permitiendo que una porción del agar se solidifique alrededor del electrodo o utilizando un electrodo de superficie calibrado.

SUERO

Los antibióticos difieren mucho en el grado en el cual se unen a las proteínas. En el torrente circulatorio, el antibiótico libre se encuentra en equilibrio con el antibiótico unido a las proteínas séricas. Se puede medir el antibiótico libre y el antibiótico unido a las proteínas, pero no está claro cuál es el resultado más útil. En el laboratorio, se pueden obtener diferentes valores para antibióticos altamente unidos a las proteínas si se agrega suero al medio. El método CLSI no incluye suero agregado debido a la dificultad en la estandarización del producto y la incertidumbre acerca de cómo interpretar los resultados. Perl y cols. estudiaron el efecto del suero en 11 antibióticos de amplio espectro utilizados para tratar infecciones intrahospitalarias por bacilos gramnegativos.²⁴⁷ Los resultados fueron idénticos con 9 de los 11 antibióticos. Sólo en el caso de la ceftriaxona (> 95% ligado a las proteínas) y de la cefoperazona (90% ligado a las proteínas) las diferencias fueron sustanciales cuando se incorporó suero en el procedimiento de referencia.

CONCENTRACIÓN DE CATIONES

Como se explicó, la concentración de los cationes divalentes Ca²⁺ y Mg²⁺ afecta los resultados de la sensibilidad cuando se

Cuadro 17-12 Situaciones en las que puede probarse la sensibilidad a un antibiótico para predecir el resultado de las pruebas de sensibilidad in vitro con otros

MICRO-ORGANISMOS	ANTIBIÓTICO	GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS SUSTITUTOS	COMENTARIOS
Estafilococos	Penicilina	Antibióticos lábiles ante las penicilinas, agentes estables antes las penicilinas, combinaciones con inhibidores de β -lactamasas	La determinación de que el microorganismo es sensible (con inclusión de las pruebas de β -lactamasas después de la inducción) predice que es sensible a todos los antibióticos; la determinación de que es resistente predice la resistencia a los antibióticos lábiles a las penicilinas, pero otros antibióticos serán eficaces excepto que la cepa también sea resistente la oxacilina.
Estafilococos	Oxacilina	Nafcilina, meticilina, oxacilina, dicloxacilina, aztreonam, todos los cefemos, todos los carbapenémicos	La determinación de que el microorganismo es sensible o resistente predice la respuesta a los antibióticos con labilidad a las penicilinas y a combinaciones con inhibidores de β -lactamasas; no se recomienda probar antibióticos sustitutos.
Estreptococos	Penicilina	Todos los antibióticos β -lactámicos, incluidos penicilinas, cefemos, carbapenémicos, monobactámicos y estos agentes en combinación con inhibidores de β -lactamasas	La determinación de que el microorganismo es sensible indica que también es sensible a todos los antibióticos del grupo sustituto; la determinación de que es resistente no predice resistencia a otros antibióticos.
Todos	Tetraciclina	Tetraciclina, minociclina, doxamicina	La determinación de que el microorganismo es sensible predice una respuesta al grupo sustituto; la determinación de que es resistente no predice resistencia a antibióticos del grupo sustituto.
Todos	Eritromicina	Eritromicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina	La determinación de que el microorganismo es sensible predice que responderá a los antibióticos del grupo sustituto; la determinación de resistencia no predice resistencia al grupo sustituto.
Enterobacteriaceae	Cefalotina	Cefalotina, cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor, cefradoxilo	Observar que la respuesta a la cefalotina no predice la respuesta a otras cefalosporinas.
Enterococos no productores de β -lactamasas	Penicilina	Todas las penicilinas, con β -lactamasas o sin ellas	
Agentes para los que el tratamiento oral es adecuado	Ampicilina	Ampicilina, amoxicilina	

Adaptado de las referencias^{217, 218}.

evalúan ciertas combinaciones de especies bacterianas y antibióticos.²⁶⁴ Barry propuso que el mecanismo por el cual la concentración de cationes afecta la actividad de *Pseudomonas aeruginosa*, por ejemplo, comprende la permeabilidad de la pared de la célula bacteriana.¹⁰ Los lipopolisacáridos en la pared celular de *P. aeruginosa* tienen uniones cruzadas con cationes divalentes, lo que proporciona estabilidad. Cuando los microorganismos crecen en medios deficientes en cationes, aumenta la permeabilidad de la pared celular a los aminoglucósidos y otros compuestos. Por lo tanto, los microorganismos son más sensibles a la acción de los aminoglucósidos, lo que produce resultados de CIM falsamente bajos o tamaños grandes de zonas inhibitorias. El caldo de Mueller-Hinton tiene concentraciones muy bajas de cationes divalentes y debe tener un suplemento hasta concentraciones fisiológicas (20 a 35 $\mu\text{g/L}$ de Mg^{2+} y 50-100 $\mu\text{g/L}$ de Ca^{2+}). En realidad, algunos lotes de agar de Mueller-Hinton pueden tener concentraciones anormalmente altas de estos cationes, de modo que se producen pequeñas zonas inhibitorias cuando se evalúa *P. aeruginosa* contra aminoglucósidos. Estos lotes, que pueden ser identificados evaluando con cepas de referencia de reactividad conocida, deben descartarse.

La detección de resistencia de ciertas cepas de estafilococos a las penicilinas semisintéticas mejora si se agrega NaCl al 2% en los medios para las pruebas de sensibilidad por dilución.²¹⁸

ATMÓSFERA

Se incuba el agar o el caldo en una estufa de incubación con aire ambiental. No se debe utilizar una estufa con CO_2 para pruebas de rutina. El ácido carbónico formado sobre la superficie del agar o en el caldo puede producir una disminución en el pH, que puede afectar la actividad antibacteriana de ciertos antibióticos, como ya se explicó. En los laboratorios que tienen poca carga de trabajo y donde sólo se cuenta con una estufa con CO_2 , es aceptable colocar las placas o los tubos para sensibilidad en una jarra sellada para evitar el acceso del CO_2 desde la estufa.

TEMPERATURA

Las placas y los tubos deben ser incubados de rutina a 35 °C. A temperaturas más altas, la detección de estafilococos resistentes a la oxacilina está comprometida. Si se sospecha resis-

tencia a la oxacilina y no se manifiesta a 35 °C, las placas o los tubos pueden ser incubados a 30 °C.

INÓCULO

En general, el inóculo se prepara a partir de un cultivo en caldo que ha sido incubado durante 4 a 6 horas, cuando se considera que el crecimiento se encuentra en fase logarítmica. Se deben tomar muestras de varias colonias de aspecto similar para reducir la variación en la población bacteriana. La densidad de la suspensión se ajusta hasta aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro comparando la turbidez con un estándar de BaSO_4 de McFarland de 0,5. El estándar se prepara agregando 0,5 mL de 0,048 M de BaCl_2 (1,175% p/v de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 99,5 mL de H_2SO_4 0,36N. Se distribuyen alícuotas de 4 a 6 mL de estándar de turbidez de sulfato de bario en tubos con tapa a rosca del mismo tamaño, se los sella apretadamente y se los almacena en la oscuridad a temperatura ambiente. Se pueden utilizar nefelómetros para determinar la turbidez. Comúnmente, se compara el grado de turbidez en el caldo con el estándar, visualizándose los dos contra un fondo blanco en el cual se han dibujado líneas negras. Otros ajustes hacia el inóculo dependen del tipo de prueba utilizada. Como alternativa, los dispositivos comerciales para preparar un inóculo estandarizado han funcionado bien.¹¹

Si el tiempo no permite la incubación durante 4 a 6 horas, se pueden eliminar de la superficie las colonias jóvenes de una placa de agar que ha sido incubada durante toda la noche y diluida hasta la densidad adecuada (el método de suspensión directa de colonias). Se recomienda este método cuando se evalúan estafilococos para resistencia a la meticilina y cuando se evalúan cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

Si se utiliza un estándar de McFarland para preparar el inóculo, se debe controlar la densidad del estándar utilizando un espectrofotómetro con un camino de luz de 1 cm y cubetas apareadas. La absorbencia a 625 nm debe ser de 0,08 a 0,10 para el estándar de McFarland de 0,5. El estándar debe ser reemplazado o debe controlarse mensualmente si es adecuado.²¹⁹ Es útil, pero no esencial, documentar la cantidad de microorganismos en el inóculo en forma periódica inoculando diluciones seriadas de la suspensión en placas de agar.

ANTIBIÓTICOS

Los polvos del antibiótico de referencia que se van a utilizar en las pruebas de dilución deben obtenerse del fabricante o de la Farmacopea de los Estados Unidos en Rockville, Md. Estos polvos de referencia se documentan con un ensayo de actividad antibiótica. Por ejemplo, el rótulo puede indicar que el polvo contiene 1 075 µg de la sustancia química activa en cada 1 000 µg de polvo. La cantidad de polvo pesado se debe ajustar para la actividad de cada lote. No se deben obtener frascos ampolla de la farmacia del hospital porque pueden contener agregados y no se realizan pruebas de actividad biológica. Los antibióticos deben almacenarse en un desecador como se indica para cada agente. Muchos antibióticos, sobre todo los de la clase de los β-lactámicos, son más estables a temperaturas por debajo de -20 °C. Las suspensiones del antibiótico deben almacenarse a -20 °C o menos, de preferencia a -70 °C; no deben ser recongelados después de distribuirlos. El imipenem, que es particularmente afectado por la congelación y la descongelación,³⁴³ debe ser reconstituido cada vez que se prepara un lote de placas o tubos. No se debe utilizar un refrigerador con sis-

temas “sin escarcha” porque producen ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Los discos impregnados con antibióticos deben almacenarse a -20 °C o menos en un estado anhidrido. Según las pautas establecidas por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos, los fabricantes de discos con antibióticos deben controlar con cuidado la concentración de los antibióticos en los discos hasta dentro del 60-120% del contenido establecido; la variación real suele ser mucho menor. Se puede mantener un pequeño suministro a temperaturas de refrigerador en un desecador. Siempre se debe permitir que los discos se calienten hasta temperatura ambiente antes de abrir el desecador, de modo que la condensación de la humedad desde el aire no los rehidrate parcialmente. La falsa resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina fue el resultado del uso de un lote defectuoso de discos.²⁴

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad riguroso es importante para los antibiogramas debido a la gran cantidad de variables que pueden afectar los resultados. Se pueden controlar las características físicas y químicas de los medios, como pH y profundidad del agar, pero el control final es proporcionado por diversas cepas bacterianas de referencia (cuadro 17-13).²¹⁷⁻²²⁰ Las cepas controles ideales tienen parámetros de sensibilidad en el intervalo medio de las concentraciones antibióticas evaluadas y presentan tendencias mínimas a modificar los patrones de sensibilidad con el tiempo.

Estas cepas de referencia deben almacenarse en un estado que reduzca al mínimo la posibilidad de una mutación. Pueden almacenarse congeladas (por debajo de -20 °C o de preferencia por debajo de -60 °C) después de la suspensión en un estabilizador, como sangre entera desfibrinada, suero fetal bovino al 50% en caldo bacteriológico o glicerol al 10% en caldo. Como alternativa, las cepas pueden ser liofilizadas. Para un almacenamiento a corto plazo, las bacterias pueden crecer en agar con digerido de soja y caseína y almacenadas a 2-8 °C. Los tubos con agar inclinados (“picos de flauta”) deben ser preparados cada dos semanas y se debe obtener un nuevo cultivo de reserva cuando se observan resultados aberrantes. Es necesario preparar un subcultivo fresco todos los días en que se utilice la cepa control.

El CLSI ha establecido reglas para la frecuencia de las pruebas de sensibilidad (cuadro 17-14). Asimismo, definió las acciones adecuadas de corrección que se deben tomar cuando no se cumplen los parámetros de calidad (cuadro 17-15).

Garantía de calidad

Además del control de calidad tradicional, la participación en un programa de pruebas de eficiencia, exigido actualmente por ley federal de los Estados Unidos, mejora el rendimiento y proporciona datos agregados útiles para evaluar el estado de las pruebas de sensibilidad con base nacional.^{61,65,142,145} También se han implementado con éxito programas de eficiencia dirigidos.³¹¹

Interpretación de los resultados

Un médico que recibe los resultados de un antibiograma por dilución conoce las concentraciones de un grupo de fármacos que inhibieron el crecimiento del patógeno en condiciones cuidadosamente definidas en el laboratorio. Para efectuar la selec-

Cuadro 17-13 Cepas para control de calidad de las pruebas de sensibilidad

TIPO DE PRUEBA	CEPA	COMENTARIOS
Dilución y difusión con discos	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Sensible a vancomicina y aminoglucósidos en altas dosis; para uso general
Dilución y difusión con discos	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	Resistente a vancomicina y aminoglucósidos en altas dosis; para pruebas de aminoglucósidos en altas dosis y para agar de examen de detección de vancomicina
Dilución y difusión con discos	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Control general de calidad, que incluye antibióticos betalactámicos
Dilución y difusión con discos	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	Control de inhibidores de las β -lactamasas; se puede utilizar junto con <i>E. coli</i> ATCC 25922 para combinaciones β -lactámico-inhibidores de las β -lactamasas
Dilución y difusión con discos	<i>Haemophilus influenzae</i> (ATCC 49247)	Resistente a la ampicilina; β -lactamasas negativos
Dilución y difusión con discos	<i>Haemophilus influenzae</i> (ATCC 49766)	Sensibles a la ampicilina; más reproducible que <i>H. influenzae</i> (ATCC 49247) para β -lactámicos seleccionados
Dilución	<i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504)	Para laboratorios especializados
Dilución y difusión con discos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	Control para pruebas de β -lactamasas de espectro ampliado
Dilución en agar y difusión con discos	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 49226)	
Dilución y difusión con discos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Pruebas generales
Dilución	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	Pruebas generales
Dilución	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	Utilizado junto con <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) para controlar las pruebas de evaluación de agar-sal de oxacilina
Difusión con discos	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Pruebas generales; cepa sensible para agar de evaluación de vancomicina
Difusión con discos	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212 o ATCC® 33186)	Monitorización de lotes de agar de Mueller-Hinton para niveles poco satisfactorios de los compuestos inhibidores de sulfamidas, trimetoprim o trimetoprim-sulfametoxazol
Dilución y difusión con discos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	Pruebas generales

ATCC. American Type Culture Collection.

Adaptado de las referencias^{217,218}.

ción racional del antibiótico más apropiado para un paciente, el médico necesita al menos otras tres de informaciones: 1) la farmacocinética del antibiótico, que incluye la concentración pico que se puede esperar en el sitio de la infección y la rapidez con la cual disminuirá esa concentración, es decir, la vida media; 2) de qué modo se compara la bacteria aislada con otras cepas de la misma especie y 3) cualquier dato clínico disponible sobre la respuesta in vivo de bacterias aisladas similares en situaciones similares.

Sin un conocimiento completo de estos factores, es fácil interpretar erróneamente los datos crudos. Por ejemplo, un antibiótico β -lactámico, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2 $\mu\text{g/mL}$ para un aislamiento de *E. coli*, podría ser considerado menos eficaz que un antibiótico aminoglucósido, como gentamicina, con una CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. De hecho, las concentraciones del fármaco que se pueden alcanzar en suero son mucho mayores para la ampicilina que para la gentamicina y el riesgo de toxicidad es mucho menor en ausencia de antecedentes de reacciones alérgicas al fármaco. Por lo tanto, la elección correcta del tratamiento sería ampicilina y no el antibiótico con la CIM mínima.

El laboratorio debe ayudar al médico a realizar una selección racional del tratamiento proporcionando interpretaciones sugeridas de los resultados cuantitativos. Las recomendaciones se relacionan con la respuesta esperada en suero y en los líquidos o tejidos corporales donde se acumulan las concentraciones similares al suero. El médico debe recordar que las concentraciones más altas de ciertos fármacos se acumulan en

determinados sitios, como orina o bilis; un microorganismo que es clasificado como "resistente" por los criterios para suero bien puede ser tratable si se encuentra en las vías urinarias bajas. Por ejemplo, una cepa de *E. coli* con una CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$ para ampicilina sería considerada resistente en el suero en el cual se presentan concentraciones relativamente bajas del fármaco. Por el contrario, serían esperables concentraciones urinarias de ampicilina del orden de cientos de microgramos por mililitro; sería de prever que la utilización de la ampicilina en una infección urinaria baja tendría éxito, aun cuando la cepa sea intrínsecamente algo resistente. Si se acepta que la ampicilina es el antibiótico disponible menos costoso y menos tóxico, el médico debe decidir si el paciente tiene una infección que afecta el parénquima del riñón (pielonefritis), caso en el cual la ampicilina sería inapropiada o si la infección se encuentra en la vejiga, y entonces la ampicilina bien puede ser eficaz contra este microorganismo resistente. Sin duda, la gravedad de la infección y la posibilidad de dañar al paciente por un cálculo equivocado también influyen sobre la decisión.

Asimismo, una cepa de *E. coli* con una CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ para cefazolina sería considerada sensible en suero o la mayoría de los tejidos. Sin embargo, la cefazolina penetra muy mal a través de las meninges y no se la debe utilizar para tratar a un paciente con meningitis, sin importar cuál sea la CIM. De hecho, si el aislamiento proviene de líquido cefalorraquídeo, el laboratorio no debe ni siquiera comunicar los resultados con este antibiótico.

Cuadro 17-14 Frecuencia de control de calidad para las pruebas de sensibilidad de los antibióticos

TIPO DE PRUEBA	ENFOQUE	FRECUENCIA	PRUEBAS DE VALIDACIÓN INICIALES	CRITERIOS PARA LA ACCIÓN CORRECTORA	COMENTARIOS
Difusión con discos o dilución	Control de calidad diario	Diaria	Ninguna	> 1 derivan en 20 pruebas consecutivas fuera de control	Conversión a pruebas semanales si < 2 de 20 o < 4 de 30 pruebas consecutivas para cada antibiótico está fuera de control
Difusión con discos o dilución	Semanal	Semanal o cuando existe un cambio en un componente reactivo (p. ej., un nuevo lote de discos o bandejas) o del método	Evaluar todas las cepas control aplicables durante 20 o 30 días de prueba consecutivos; se pueden implementar pruebas semanales si < 2 de 20 o < 4 de 30 pruebas consecutivas para cada antibiótico están fuera de control	Cualquier resultado fuera de control	Si se agrega un nuevo antibiótico, debe ser validado. Sólo es apropiado realizar pruebas semanales para los antibióticos evaluados de rutina. Los que son evaluados rara vez sólo deben evaluarse el día de su uso
Pruebas de evaluación en agar	Diario	Diaria	Ninguna	> 1 derivan en 20 pruebas consecutivas fuera de control	Las pruebas diarias deben realizarse si la prueba de detección se efectúa con una frecuencia menor de una vez por semana o si el antibiótico es lábil (p. ej., prueba de detección de oxacilina para <i>S. aureus</i>)
Pruebas de evaluación en agar	Semanal	Semanal o cuando existe un cambio en un componente reactivo (p. ej., nuevo lote de discos o bandejas) o cambio de método	Evaluar todas las cepas control aplicables durante 20 o 30 días de prueba consecutivos; se pueden implementar pruebas semanales si < 2 de 20 o < 4 de 30 pruebas consecutivas para cada antibiótico están fuera de control	Cualquier resultado fuera de control	Si se agrega un nuevo agente antibiótico, debe ser validado; sólo es apropiado realizar pruebas semanales para los antibióticos evaluados de rutina; los que son evaluados rara vez sólo deben evaluarse el día de su uso

Adaptado de las referencias^{219,220}.**Cuadro 17-15 Acción correctora para las pruebas de antibióticos que están fuera de control**

FUENTE DE ERROR	ACCIÓN CORRECTORA	ACCIÓN CORRECTORA ADICIONAL
Obvia (p. ej., cepa control equivocada, temperatura equivocada, contaminación)	Repetir la prueba el día que se observa la falla del control de calidad; continuarla si el nuevo resultado se ajusta al control	Proseguir como se hace para un error desconocido
Desconocida	1. Evaluar el antibiótico que ha fallado durante cinco días consecutivos de prueba 2. Si todos los resultados están en control, proseguir con pruebas semanales 3. Si alguno de los resultados está fuera de control, proseguir con otras pruebas 4. Suprimir los informes de cualquier antibiótico que esté fuera de control hasta que se resuelva el problema	1. Las posibles explicaciones para la falla continua se resumen en el cuadro 17-23 2. Después de implementar los posibles problemas (p. ej., nuevos reactivos), proseguir con las pruebas de validación 3. Continuar las pruebas diarias hasta que se resuelva el problema 4. Suprimir los informes de cualquier agente antibiótico que esté fuera de control hasta que se resuelva el problema

Adaptado de las referencias^{219,220}.

El NCCLS reconoce tres categorías de sensibilidad a los antibióticos para las pruebas de dilución (cuadro 17-16) (protocolos 17-2 y 17-3). Un microorganismo es "sensible" si responde a las dosis habituales del antibiótico administrado por una vía adecuada, que incluye la vía oral. Una sensibilidad "intermedia" implica que la cepa puede ser inhibida por concentraciones del fármaco que se logran cuando se administran las dosis parenterales máximas; se puede seleccionar el antibiótico, pero se deben considerar otras opciones que pueden proporcionar un tratamiento más óptimo. Una bacteria es "resistente" si no es inhibida por las concentraciones del fármaco que se pueden alcanzar y, por lo tanto, el fármaco no debe ser seleccionado para el tratamiento, salvo en ciertos líquidos corporales, en los cuales pueden acumularse concentraciones altas del antibiótico. La cantidad de "errores graves y muy graves"—aquellos que invierten sensibles y resistentes—se debe mantener en el mínimo absoluto.

Si el laboratorio realiza un antibiograma por difusión con discos, se debe comunicar el método estandarizado y las interpretaciones sugeridas por el CLSI (cuadro 17-17) (protocolo 17-1).^{217,220} En ocasiones, un médico obtiene información útil de la proximidad del tamaño de la zona real en los valores críticos de la CIM, pero esta información pocas veces se notifica.

Un laboratorio que realiza antibiogramas por dilución puede informar sólo la correlación interpretativa —es decir, sensible, intermedia o resistente— o puede informar el valor de la CIM junto con la correlación interpretativa. Aunque en realidad cada vez más instituciones determinan la CIM se ha decidido informar sólo la interpretación debido a la posibilidad de que los médicos confundan el valor numérico. Los valores de CIM se reservan para los usuarios informados, como los especialistas en enfermedades infecciosas. Si se incluye en el informe la CIM, se debe instruir a los médicos sobre su propósito.

A menudo los médicos deben tomar decisiones en forma empírica sobre el tratamiento antibiótico, porque la decisión no puede esperar el aislamiento de una bacteria y las pruebas de sensibilidad. Para tomar esas decisiones, es esencial el conocimiento de los patrones locales de sensibilidad. Es parte del deber de cada laboratorio de microbiología proporcionar esa información. El CLSI ha publicado recomendaciones para el formato de los informes de sensibilidad.²¹⁶ En el cuadro 17-18 se da una reseña de parámetros seleccionados y el fundamento para su inclusión. En el recuadro 17-4 se sintetizan otros diversos factores que vale la pena destacar.

En el cuadro 17-19 se presenta una muestra del resumen anual de antibióticos de una institución, junto con las instrucciones acompañantes.

Si se dispone de una página web en un red local ("Intranet") o un acceso compartido a archivos electrónicos, la publicación de informes través de ellos es una forma conveniente de comunicación general. Los contenidos pueden descargarse en los asistentes personales de datos. Además, es útil proporcionar a los médicos una copia tangible: un formato práctico es una tarjeta de bolsillo para CD-Rom que permite su consulta rápida.

Además de los datos locales existen varias bases de datos regionales y nacionales para rastrear los perfiles de sensibilidad a los antibióticos.¹¹⁶ Estos recursos también pueden ser valiosos, pero no pueden reemplazar a los datos locales.

Lo que caracteriza a un verdadero microbiólogo, por oposición a un tecnócrata en microbiología, es la capacidad de síntesis de datos de diversas fuentes y de realizar inferencias que pueden alertar a los trabajadores del laboratorio o los médicos sobre un posible problema con los datos. En el caso de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, la comparación de los

resultados con la identificación presuntiva del microorganismo puede alertar al microbiólogo sobre un posible problema con una pieza de información o con ambas. Algunos de estos indicios se resumen en el cuadro 17-20. Además de los resultados erróneos de la sensibilidad o las identificaciones erróneas de los microorganismos, el examen inadvertido de cultivos mixtos es una causa frecuente de errores; es esencial la inclusión de una placa de "pureza" con la prueba de sensibilidad, pero la pureza aparente del aislamiento evaluado no es una garantía absoluta de pureza.

Selección de los antibióticos para el informe

Sólo se deben incluir en un informe los antibióticos apropiados para la infección. No se deben informar los fármacos que sólo son activos en las vías urinarias si el aislamiento proviene de otro sitio. Los antibióticos que no penetran en el sitio, como cefazolina o cefalotina en las meninges, no deben ser informados para los microorganismos aislados en ese sitio. Es inadecuado el uso de cloranfenicol para las infecciones de las vías urinarias porque no se excreta por la orina; los microbiólogos no deben alentar el uso inadecuado al incluir los resultados de las pruebas de sensibilidad en un informe del laboratorio. Asimismo, las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas en líquido cefalorraquídeo (LCR) sólo deben evaluarse contra uno o más de los siguientes antibióticos: penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, meropenem y vancomicina.²¹⁸ Lamentablemente existen muy pocas de estas prohibiciones absolutas. La mayoría de las decisiones se deben tomar en consulta con miembros del personal médico y la farmacia. Todos los hospitales acreditados cuentan con comités de farmacia y terapéutica (o el equivalente) que proporcionan una forma útil para un esfuerzo coordinado. En el recuadro 17-5 se mencionan varias estrategias razonables, que dependen de la política local, las necesidades y los recursos.

Antibiograma por macrodilución en caldo

La prueba de sensibilidad en caldo por macrodilución fue una de las primeras en ser desarrolladas y sigue sirviendo como método de referencia. Se realizan varias diluciones del antibiótico en caldo o en agar, después de lo cual se agrega una suspensión bacteriana estandarizada. En la figura 17-11 se muestran 10 tubos de ensayo que contienen caldo de Mueller-Hinton con suplemento de cationes. Se diluyen en forma seriada distintas cantidades del antibiótico desde 100 µg/mL hasta 0,4 µg/mL. El tubo número 10 no tiene el antibiótico y se utiliza como control del crecimiento. Se inocula cada uno de los 10 tubos con una suspensión calibrada del microorganismo por evaluar y se lo incuba a 35 °C durante 18 horas. Al final del período de incubación, se examinan visualmente los tubos para detectar turbidez. Obsérvese en la figura 17-11 que los cinco tubos de la izquierda están claros y los cinco de la derecha aparecen turbios. La turbidez indica que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración del antibiótico contenido en el medio.

En la figura 17-12 se muestra que el valor crítico de inhibición del crecimiento de la figura 17-11 se encuentra entre los tubos 5 y 6, o entre 6,25 µg/mL y 3,12 µg/mL del antibiótico. Este valor crítico representa la CIM, definida como la concentración más baja del antibiótico en microgramos por mililitro que impide el crecimiento in vitro de bacterias. Así, en el ejemplo que se muestra en las figuras 17-11 y 17-12, la CIM se ubica en algún lugar entre 6,25 µg/mL y 3,12 µg/mL. Sin

Cuadro 17-16 Estándares interpretativos para CIM ($\mu\text{g/mL}$) para enterobacterias^a**CONDICIONES DE LA PRUEBA**

Medio:	Dilución en caldo: caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes (CAMHB)
	Dilución en agar: agar de Mueller-Hinton (MHA)
Inóculo:	Método de cultivo o suspensión directa de las colonias, equivalente a un estándar de McFarland de 0,5
Incubación:	35 °C; aire ambiente; 16 a 20 horas, 24 horas para <i>Yersinia pestis</i>

Recomendaciones mínimas del control de calidad (véase cuadro 17-3 para los rangos aceptables de control de calidad)

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218 (para combinaciones β -lactámico/inhibidor de la β -lactamasa)

Comentarios generales

- 1) Para los aislamientos fecales de especies de *Salmonella* y *Shigella*, sólo se deben evaluar e informar de rutina ampicilina, una fluoroquinolona y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, se deben evaluar y comunicar cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación para los aislamientos extraintestinales de especies de *Salmonella*

OBSERVACIÓN: la información en negrita se considera tentativa durante un año.

GRUPO DE EVALUACIÓN/ INFORME	ANTIBIÓTICO	CIM (μG/mL) ESTÁNDAR INTERPRETATIVO			COMENTARIOS
		S	I	R	
PENICILINAS					
A	Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32	2) Clase representativa de ampicilina y amoxicilina.
B	Mezlocilina o piperacilina	≤ 16	32-64	≥ 128	
B		≤ 16	32-64	≥ 128	
B	Ticarcilina	≤ 16	32-64	≥ 128	
U	Carbenicilina	≤ 16	32-64	≥ 64	
U/Inv.	Mecilinam	≤ 8	16	≥ 32	3) Para uso contra <i>E. coli</i> sólo para aislamientos en las vías urinarias.
COMBINACIONES β-LACTÁMICO/INHIBIDOR DE β-LACTAMASA					
B	Amoxicilina-ácido clavulánico o	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
B	ampicilina-sulbactam	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
B	Piperacilina-tazobactam	≤ 16/4	32/8-64/4	≥ 128/4	
B	Ticarcilina-ácido clavulánico	≤ 16/2	32/2-64/2	≥ 128/2	
CEFEMS (PARENTERALES) (Incluidas las cefalosporinas I, II, III y IV) Por favor remítase al Glosario I.					
4) ADVERTENCIA: para las especies de <i>Salmonella</i> y de <i>Shigella</i> , las cefalosporinas de primera y de segunda generación pueden parecer activas in vitro pero no son eficaces desde el punto de vista clínico y no deben ser comunicadas como sensibles.					
5) ADVERTENCIA: para <i>Yersinia pestis</i> , algunos estudios han demostrado que aunque los antibióticos β-lactámicos pueden parecer activos in vitro carecen de eficacia en modelos animales de infección. Estos agentes antibióticos no deben ser comunicados como sensibles.					
6) Las cepas de especies de <i>Klebsiella</i> y <i>E. coli</i> que producen β-lactamasas de espectro ampliado pueden ser clínicamente resistentes al tratamiento con penicilinas, cefalosporinas o aztreonam, a pesar de la aparente sensibilidad in vitro a algunos de estos agentes. Algunas de estas cepas muestran una CIM por encima de la población sensible normal pero por debajo de los puntos de corte estándares para ciertas cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam. Estas cepas deben ser evaluadas para la producción potencial de β-lactamasas de espectro ampliado utilizando los puntos de corte para el examen de estas β-lactamasas enumerados al final del cuadro antes de informar los resultados para penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam. Otras cepas pueden dar intermedias o resistentes por los puntos de corte estándares a uno o más de estos agentes. En todas las cepas con β-lactamasas de espectro ampliado, las CIM para una o más de las cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam deben disminuir en presencia de ácido clavulánico según se determina en las pruebas confirmatorias fenotípicas. Para todas las cepas productoras de β-lactamasas de espectro ampliado, la interpretación de la prueba se debe comunicar como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. (Véase cuadro ubicado al final del cuadro para el examen de detección de β-lactamasas de espectro ampliado y pruebas confirmatorias. Remítase al glosario para las definiciones de las penicilinas y las cefalosporinas). La decisión de realizar pruebas de detección para β-lactamasas de espectro ampliado sobre todos los aislamientos urinarios se debe tomar sobre una base institucional, considerando las cuestiones de prevalencia, tratamiento y control de infecciones.					

R, resistente; I, intermedio; S, sensible.

^aLos pedidos son para los documentos de CLSI.

Cuadro 17-17 Estándares interpretativos del diámetro de la zona y puntos de corte equivalentes de CIM para *Enterobacteriaceae*^a**CONDICIONES DE LA PRUEBA**

Medio:	agar de Mueller-Hinton
Inóculo:	método de cultivo o suspensión directa de las colonias, equivalente a un estándar de McFarland de 0,5
Incubación:	35 °C; aire ambiente; 16 a 18 horas

Recomendaciones mínimas del control de calidad (véase cuadro 17-3 para los rangos aceptables de control de calidad)

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218 (para combinaciones β-lactámico/inhibidor de la β-lactamasa)

Comentarios generales

- 1) Para los aislamientos fecales de especies de *Salmonella* y *Shigella*, sólo se deben evaluar e informar de rutina ampicilina, una quinolona y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, se deben evaluar y comunicar cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación para los aislamientos extraintestinales de especies de *Salmonella*.

OBSERVACIÓN: la información en negrita se considera tentativa durante un año

GRUPO DE EVALUACIÓN/ INFORME	ANTIBIÓTICO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO DE LA ZONA (MM COMPLETOS, MENOS CERCANOS)		PUNTOS DE CORTE EQUIVALENTES DE CIM (µG/mL)		COMENTARIOS	
			R	S	R	S		
PENICILINAS								
A	Ampicilina	10 µg	≤ 3	4-16	≥ 17	≥ 32	≤ 8	2) Clase representativa de ampicilina y amoxicilina
B	Mezlocilina o piperacilina	75 µg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16	
B		100 µg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16	
B	Ticarcilina	75 µg	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 128	≤ 16	3) Para uso contra <i>E. coli</i> sólo para aislamientos en las vías urinarias
U	Carbenicilina	100 µg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 64	≤ 16	
U	Mecilinam	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	≥ 32	≤ 8	
COMBINACIONES β-LACTÁMICO/INHIBIDOR DE LA β-LACTAMASA								
B	Amoxicilina-ácido clavulánico o	20/10 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 32/16	≤ 8/4	
B	ampicilina-sulbactam	10/10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	≥ 32/16	≤ 8/4	
B	Piperacilina-tazobactam	100/10 µg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128/4	≤ 16/4	
B	Ticarcilina-ácido clavulánico	75/10 µg	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2	

R, resistente; I, intermedio; S, sensible.

^aLos pedidos son para los documentos de CLSI.

embargo, por convención, la CIM se interpreta como la concentración del antibiótico, contenido en el primer tubo en la serie, que inhibe el crecimiento visible. Por lo tanto, en este ejemplo, la CIM es de 6,25 µg/mL.

En una sección ulterior se describe la adaptación de esta prueba a pequeños volúmenes para las pruebas de rutina.

Antibiograma por dilución en agar

El procedimiento por dilución en agar, que es el segundo método de referencia, ha sido adaptado con éxito para el uso de rutina en laboratorios grandes y evalúa sólo concentraciones seleccionadas del antibiótico. Se inocula una suspensión estandarizada de bacterias en una serie de placas de agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente del antibiótico, que abarca el intervalo terapéutico del fármaco. Por ejemplo, si el intervalo terapéutico para un antibiótico dado es 2 a 12 µg/mL, se podría utilizar una serie de placas de agar que

contuvieran 4, 8, 16 y 32 µg/mL del antibiótico para determinar la sensibilidad del microorganismo que se va a evaluar. Si el microorganismo crece en las tres primeras placas, pero no en la placa que contiene 16 µg/mL del antibiótico, se puede establecer un valor de CIM de 16 µg/mL, similar a la interpretación del parámetro en la técnica por dilución en caldo.

En la figura 17-13 se muestran placas de dilución en agar listas para su interpretación. Obsérvese que los microorganismos que son sensibles a la concentración del antibiótico contenido en cualquier placa de agar dada no producen un círculo de crecimiento en el sitio del inóculo, mientras que aquellas que son resistentes aparecen como colonias circulares. Las placas de agar se marcan con una cuadrícula para que cada microorganismo pueda ser identificado con un número y los resultados ingresados en la hoja de trabajo.

Para facilitar el examen de gran cantidad de cultivos, se utiliza un instrumento conocido como replicador Steers (fig. 17-14). La principal característica de este instrumento es un cabe-

Cuadro 17-18 Recomendaciones para la producción de resúmenes institucionales de sensibilidad a los antibióticos

PARÁMETRO	ACCIÓN RECOMENDADA	JUSTIFICACIÓN
Institución	Datos separados para cada centro que sirve el laboratorio; indicar el nombre de la institución en el informe	En un sistema que incluye múltiples instituciones los resultados pueden variar mucho entre las unidades
Frecuencia	Al menos anualmente; indicar el marco temporal en el informe	Aumenta la probabilidad de que se incluya una cantidad suficiente de cepas; evita la posible variación estacional en la resistencia
Pruebas duplicadas	Incluir sólo el primer aislamiento (véase el recuadro 17-4 para una explicación de la definición de duplicado)	Los cultivos frecuentes de pacientes problemáticos pueden conducir a una hiperrepresentación de estas cepas en estos datos
Origen de las cepas	Incluir sólo los aislamientos remitidos con fines diagnósticos	Es posible que los aislamientos remitidos como parte de un protocolo no sean representativos; es posible que las cepas aisladas en el medioambiente no tengan importancia clínica
Cantidad de aislamientos	Incluir sólo las especies bacterianas para las cuales se evaluaron al menos 10 cepas; resultados basados sobre los números intermedios (p. ej., < 25 o < 50 cepas pueden estar indicados con un asterisco)	Es posible que una cantidad menor de cepas no den resultados clínicamente significativos
Antibióticos que se comunican de forma selectiva por el método de la "cascada"	Incluir todos los resultados en el resumen, no sólo los que fueron comunicados	La exclusión de antibióticos no comunicados puede introducir un sesgo
Antibióticos que son evaluados o comunicados de forma selectiva (véase recuadro 17-4)	No incluir los resultados en el resumen (o indicar los resultados de las pruebas)	La naturaleza no aleatoria de las pruebas puede introducir un sesgo en los resultados
Interpretaciones "calculadas"	Incluir el resultado de relevancia clínica	Resultados que son modificados por el protocolo; p. ej., estafilococos y antibióticos β -lactámicos sobre la base de los resultados de la oxacilina; o modificación de los resultados β -lactamámicos para los productores de β -lactamasas de espectro ampliado
Análisis complementarios (véase el texto)	Incluir los factores adicionales	Decisiones basadas sobre parámetros y necesidades locales

Adaptado de la referencia²¹⁶.

zal con mecanismo de resorte provisto de 32 a 36 puntas de inoculación de superficie plana, cada una de unos 3 mm de diámetro. El cabezal está unido a un pistón y a un cilindro con resorte por medio del cual se puede mover hacia arriba y abajo en un plano vertical. La contraparte es una placa de siembra de aluminio que contiene 32 a 36 pocillos. Estos pocillos están equipados de forma tal que cuando la placa de siembra está alineada correctamente dentro de la guía en la base del replicador, cada una de las puntas de inoculación sobre el cabezal móvil se ajusta exactamente a los pocillos. Cada celda de la placa proporciona un receptáculo en el cual se pueden colocar diferentes suspensiones bacterianas.

La placa de sensibilidad por dilución en agar se inocula colocando una bandeja de siembra con sus diversas suspensiones directamente debajo del cabezal de inoculación. Se desciende la cabeza de modo que las puntas se extiendan por completo en el interior de cada pocillo y así se toman muestras de unos 0,003 mL de cada suspensión bacteriana sobre la superficie de cada punta de inoculación. A continuación, se eleva la cabeza y se mueve una placa de agar ubicada debajo de las puntas, las cuales a su vez se descienden de modo que la superficie plana de cada punta de inoculación toque la superficie del agar. Se eleva nuevamente la cabeza y se hace retroceder la placa de siembra en posición para la inoculación de la siguiente placa de agar. Se repite el procedimiento para evaluar todas las placas del antibiótico. Una vez inoculadas todas las placas, se las incuba a 35 °C durante 18 horas.

Antibiograma por difusión con discos

En la figura 17-15 se muestra el principio básico del método de difusión con discos para examen de la sensibilidad a los antibióticos.¹⁰ Tan pronto como el disco impregnado en el antibiótico entra en contacto con la superficie de agar húmeda, se absorbe agua en el papel de filtro y el antibiótico se difunde en el medio circundante. La velocidad de extracción del antibiótico del disco es mayor que su difusión hacia afuera en el medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder la del disco propiamente dicho. Sin embargo, a medida que aumenta la distancia desde el disco, existe una reducción logarítmica en la concentración del antibiótico. Si la placa ha sido inoculada antes con una suspensión bacteriana, el crecimiento simultáneo de las bacterias ocurre sobre la superficie del agar. Cuando se alcanza una masa celular crítica de bacterias, se supera la actividad inhibidora del antibiótico y las bacterias proliferan. El tiempo necesario para alcanzar la masa celular crítica (tiempo crítico; 4 a 10 horas para las bacterias evaluadas comúnmente) es característico de cada especie, pero está influido por la composición del medio y la temperatura de la incubación. La extensión lateral de la difusión del antibiótico antes de que se alcance el tiempo crítico se verá afectada por la profundidad del agar porque la difusión ocurre en tres dimensiones. Los puntos en los cuales se alcanza la masa celular crítica aparecen como un círculo bien demarcado de crecimiento bacteriano, con el centro del disco

Recuadro 17-4 Recomendaciones para el formato de los resúmenes de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos

1. Las partes interesadas en cada institución deben decidir cómo desean presentar los datos. Es posible que algunos sistemas de información del laboratorio o institucionales no puedan cumplir todas las recomendaciones.
2. Se deben excluir claramente los resultados duplicados, de modo de no sesgar los resultados hacia pacientes en los cuales los cultivos se realizan más a menudo. Sin embargo, la definición de "duplicado" es pasible de varias interpretaciones. Por ejemplo, el NCCLS recomienda incluir en el análisis sólo el primer aislamiento de una bacteria particular de un paciente particular en un período dado (p. ej., 1 año), independientemente de las otras características de los aislamientos. Será casi imposible para la mayoría de las instituciones rastrear la condición duplicada durante un año. Lo que es más importante, esta recomendación excluiría la visualización de múltiples cepas de patógenos importantes que circulan simultáneamente en una institución y por cierto disminuiría la probabilidad de detectar el brote de una infección resistente que comienza a propagarse.
3. Se deben excluir los antibióticos que son evaluados y comunicados selectivamente, porque no han sido evaluados en forma aleatoria. Por ejemplo, si se evalúa una cefalosporina de tercera generación sólo contra cepas de *S. pneumoniae* que no son sensibles a la penicilina, utilizando un examen con disco de oxacilina, los resultados no serán representativos de todos los neumococos de la institución; en este caso, los resultados pueden ser ajustados aceptando que todos los neumococos que son claramente sensibles a la penicilina por el examen con discos también son sensibles a la cefalosporina de tercera generación. Por el contrario, si se evalúan las cepas de *H. influenzae* contra ampicilina sólo si no producen β -lactamasa, los resultados serán sesgados hacia la sensibilidad de los aislamientos restantes a la ampicilina. En algunos casos, las solicitudes específicas de pruebas de sensibilidad pueden indicar un sesgo hacia la resistencia.
4. El análisis suplementario puede ser apropiado en varias situaciones clínicas o microbiológicas:
 - a. Aunque se recomienda no incluir la categoría "intermedia" para la mayoría de las combinaciones, es conveniente comunicar esta categoría para *S. pneumoniae* y para estreptococos viridans aislados de sitios estériles.
 - b. Para la mayoría de las combinaciones la interpretación comunicada se basa sobre las concentraciones de los antibióticos alcanzables en suero. Sin embargo, en el caso de *S. pneumoniae*, se recomienda comunicar los datos para cefotaxima y ceftriaxona (y para cefipima en los países donde existe una indicación para el uso del antibiótico tanto en meningitis como en no meningitis) utilizando los puntos de corte interpretativos para los aislamientos de sangre y de LCR.
 - c. Los resultados para el estafilococo coagulasa positivo, *S. aureus*, pueden ser analizados por separado para los aislamientos que son sensibles y resistentes a la oxacilina. Los patrones generales para estos dos grupos son muy diferentes y se pueden perder por la fusión de los datos.
 - d. Si la cantidad de aislamientos lo permite, puede ser útil diferenciar las poblaciones de pacientes (internados frente a ambulatorios, unidades de cuidados intensivos, niños frente a adultos), los sitios corporales (aparato urinario, aparato respiratorio, sangre, etc.), el origen de la infección (intrahospitalario o extrahospitalario) o situaciones clínicas específicas en las cuales existen problemas especiales (fibrosis quística).

formando el centro del círculo si la prueba se ha realizado de manera correcta (fig. 17-16). La concentración del antibiótico difundido en esta interfaz de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como la concentración crítica y se aproxima a la CIM obtenida en las pruebas de dilución. Aunque no se realiza en la práctica el cálculo directo de la concentración inhibitoria, la CIM se calcula en realidad con una exactitud razonable si se conocen las características de la difusión del antibiótico y el crecimiento bacteriano.¹⁰

DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO PARA PRUEBAS DE DIFUSIÓN CON DISCOS

Para finales de la década de 1950, el estado de los antibiogramas en los laboratorios de microbiología de todo el mundo era caótico debido a la falta de un procedimiento estándar adecuado. Las concentraciones de los antibióticos en los discos variaban de manera considerable, se utilizaba una amplia variedad de medios, los métodos de inoculación diferían de un laboratorio a otro, la duración del tiempo de incubación no era uniforme y los resultados eran interpretados según varios criterios. Se formó un comité de la Organización Mundial de la Salud para investigar este problema y la deliberación de este comité proporcionó el trabajo basal que condujo al desarrollo de varios procedimientos estándares (protocolo 17-1).¹ La prueba que se ha convertido en el estándar en los Estados Unidos se basa sobre el trabajo de Bauer, Kirby y cols.^{13,14}

Si la prueba se realiza en forma correcta, los bordes de la zona de inhibición deben ser claros y fáciles de medir. En el recuadro 17-6 se enumeran las situaciones en las cuales el técnico debe aprender a interpretar los resultados poco claros.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El tamaño de la zona observada en un antibiograma por difusión con discos no tiene significado por sí solo. Los estándares de interpretación provistos por el CLSI se obtienen a partir de una correlación entre los tamaños de la zona y las CIM de la especie que pueden ser evaluados mediante el método de difusión con discos. En la figura 17-21 se muestra un prototipo de una curva de regresión que proporciona dicha correlación. Cada triángulo representa los resultados de ambas pruebas para una sola cepa. Se ha dibujado una línea de regresión a través de muchos puntos individuales. Una vez establecida la línea de regresión, se puede inferir un resultado aproximado de la CIM a partir del diámetro de cualquier zona. En este ejemplo, el tamaño de una zona de 18 mm corresponde a una CIM de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, el valor crítico de la prueba de dilución en caldo que se muestra en la figura 17-11.

Por lo tanto, un antibiótico que produce una zona de diámetro mayor de 18 mm en teoría tendría una CIM de menos de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ y el microorganismo sería considerado sensible; uno que produjera una zona de tamaño inferior a 18 mm, por el contrario, sería considerado resistente. En la práctica real, las curvas de regresión no están definidas con tanta claridad y se puede establecer una zona de 2 a 4 mm donde no es posible determinar si el microorganismo es sensible o resistente (véase cuadro 17-17). Los aislamientos que producen una zona de inhibición en este intervalo son caracterizados como de sensibilidad intermedia. En los estudios llevados a cabo a finales de la década de 1950, Bauer, Perry y Kirby demostraron por primera vez que las cepas bacterianas evaluadas contra un antibiótico dado tienden a caer en las categorías de resistentes o sensibles; sólo un pequeño porcentaje (5% o

Cuadro 17-19 Planilla de informe resumido de sensibilidad a los antibióticos

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EVALUADA DESDE EL 1 DE JULIO DE 2003 HASTA EL 30 DE JUNIO DE 2004														
	ESPECIES DE ESCHERICHIA	ESPECIES DE ENTEROBACTER	ESPECIES DE KLEBSIELLA	PROTEUS MIRABILIS	ESPECIES DE PROTEUS	ESPECIES DE SERRATIA	ESPECIES DE ACINETOBACTER	CITROBACTER FREUNDII	CITROBACTER KOSERI	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVOS	STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVOS	ENTEROCOCCUS ^c	STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
Máximo de cepas evaluadas	3 497	312	748	269	106	107	45	89	24	1 333	2 174	894	1 234	148
% de sensibles										1				
Ampicilina	71	1	1	93	14	11	7 ^b	11 ^b	0 ^b	4	*	c	94	—
Ampicilina-sulbactam	78	23	75	100 ^b	54 ^b	20	100 ^b	50 ^b	60 ^b	—	—	—	—	—
Ampicilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	89	—	—	—	—
Amikacina	99+	99	99+	99+	100	97 ^b	100 ^b	100	100 ^b	71	—	—	—	—
Aztreonam	99	82	99	99	94	100 ^b	11 ^b	67	100 ^b	80	—	—	—	—
Ceftazidima	99	82	98	99+	92	96	97 ^b	65	100 ^b	17	—	—	—	—
Cefotaxima	99+	85	100	99+	97	96 ^b	80 ^b	74	100 ^b	21	—	—	—	—
Ceftriaxona	98	75	100	100	90 ^b	97	31 ^b	—	—	—	—	—	—	—
Clindamicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	68	54	37	—	—
Ciprofloxacina	98	95	99	92	95	99	100 ^b	95	100 ^b	1	66	51	—	—
Cefotetán	97	61	98	96	100 ^b	99	3 ^b	57 ^b	100 ^b	0	—	—	—	—
Cefazolina	97	7	95	97	15	0	0 ^b	2	100 ^b	0	67	34	—	—
Cefalotina ^d	89	1	84	97 ^b	0	0	0 ^b	14 ^b	60 ^b	5	67	34	—	—
Cotrimoxazol	87	93	93	84	83	98	93 ^b	86	100 ^b	—	—	—	—	—
Eritromicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	75	54	37	—	—
Gentamicina	98	97	98	95	96	98	98 ^b	98	100 ^b	78	—	—	—	—
Imipenem	100	100	100	99+	96	99	100 ^b	100	100 ^b	—	—	—	—	—
Meropenem	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(Continúa)

Cuadro 17-19 Planilla de informe resumido de sensibilidad a los antibióticos (cont.)

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EVALUADA DESDE EL 1 DE JULIO DE 2003 HASTA EL 30 DE JUNIO DE 2004														
	ESPECIES DE ESCHERICHIA	ESPECIES DE ENTEROBACTER	ESPECIES DE KLEBSIELLA	PROTEUS MIRABILIS	ESPECIES DE PROTEUS	ESPECIES DE SERRATIA	ESPECIES DE ACINETOBACTER	CITROBACTER FREUNDII	CITROBACTER KOSERI	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVOS	STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVOS	ENTEROCOCCUS ^a	STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
Oxacilina-nafcilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	67	—	—	—
Oxacilina-nafcilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34	—	—
Piperacilina	74	79	92	97	90	94	75 ^b	67	95 ^b	—	—	—	—	—
Piperacilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90	—	—	—	—
Piperacilina-tazobactam	97	62 ^b	100 ^b	—	—	—	100 ^b	—	—	—	—	—	—	—
Piperacilina-tazobactam	—	—	—	—	—	—	—	—	—	84	—	—	—	—
Tobramicina	99	99	98	96	100	96	100 ^b	100	100 ^b	87	—	—	—	—
Vancomicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	100	97	—
Penicilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	76% sensibles; 14% intermedios	
Ceftriaxona (criterios de LCR)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND
Ceftriaxona (criterios de suero)												—		ND
Sólo para infecciones urinarias														
Nitrofurantoína	99	67	68	1	19	0 ^b	0 ^b	96	94 ^b	1	100	99+	98	—

^a Para infecciones enterocócicas graves debe utilizarse terapia de combinación con un β -lactamámico y un aminoglucósido.
^b < 50 cepas evaluadas.
^c > 90% de las especies de Staphylococcus son resistentes a la penicilina y la ampicilina.
^d Cefalotina debe ser utilizada como el fármaco de clase para determinar sensibilidad a las cefalosporinas orales de primera generación.
^e 69 cepas neumocócicas evaluadas contra ceftriaxona; sólo cepas NO sensibles a penicilina en un procedimiento de detección evaluado contra ceftriaxona.
 ND, no disponible.

Cuadro 17-20 Datos que sugieren la necesidad de verificar el perfil de sensibilidad a los antibióticos o la identificación del aislamiento bacteriano*

MICROORGANISMO	FENOTIPOS QUE SON RAROS O PUEDEN SER EL RESULTADO DE ERRORES TÉCNICOS	FENOTIPOS QUE PUEDEN SER RAROS EN CIERTAS INSTITUCIONES
Enterobacterias (cualquiera)	I o R a carbapenémicos	R a amikacina o fluoroquinolonas
<i>Citrobacter freundii</i> Especies de <i>Enterobacter</i> <i>Serratia marcescens</i>	S a ampicilina, cefazolina o cefalotina	
<i>Proteus vulgaris</i> Especies de <i>Providencia</i>	S a ampicilina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		R a gentamicina, tobramicina y amikacina simultáneamente
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S a carbapenémicos	R a trimetoprim-sulfametoxazol
<i>Proteus mirabilis</i>	S a nitrofurantoina	
<i>Enterococcus faecalis</i>	R a penicilina o ampicilina; S a quinupristina-dalfopristina; R a linezolid	R a aminoglucósidos de alto nivel (sitios corporales estériles)
<i>Enterococcus faecium</i>	R a linezolid	R a aminoglucósidos de alto nivel (sitios corporales estériles); R a quinupristina-dalfopristina
<i>Staphylococcus aureus</i>	I o R a linezolid; I o R a quinupristina-dalfopristina; I o R a vancomicina	R a oxacilina
<i>Staphylococcus</i> , coagulasa negativo	I o R a linezolid; I o R a vancomicina	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R a fluoroquinolona; I o R a linezolid; I o R a vancomicina	R a penicilina; R a cefalosporinas de tercera generación
<i>Streptococcus</i> , grupo viridans	I o R a linezolid; I o R a vancomicina	I o R a penicilina
<i>Streptococcus</i> , β -hemolítico	I o R a penicilina o ampicilina; I o R a las cefalosporinas de tercera generación; I o R a linezolid; I o R a vancomicina	
Cualquier microorganismo	Resistente a todos los agentes evaluados	

* Todas estas situaciones están sometidas a cambio a medida que se desarrollan y extienden los nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos. Adaptado de las referencias^{17,218}.
R, resistente; I, intermedio; S, sensible.

menos) caen en el intervalo de sensibilidad intermedia.¹⁴ Por lo tanto, si un laboratorio tiene un alto porcentaje de comunicaciones con resultados intermedios, está indicado reevaluar el procedimiento.

Las pautas de interpretación de las pruebas de difusión en disco (véase cuadro 17-18) permiten al usuario determinar valores aproximados de la CIM para cada uno de los antibióticos enumerados (últimas dos columnas), con diámetros de las zonas determinados mediante la técnica de difusión en disco. Estas correlaciones no están destinadas a equipararse con los valores críticos para la sensibilidad y la resistencia establecidos mediante las pruebas de dilución, pero brindan una apreciación del significado del informe. Por ejemplo, un microorganismo que muestra una zona de 11 mm de inhibición contra ampicilina sería considerado resistente con una concentración mayor de 32 $\mu\text{g/mL}$.

Sin embargo, si la infección se encuentra en las vías urinarias bajas, se logran concentraciones muy altas de ampicilina y el microorganismo podría ser tratable incluso en presencia de un resultado de aparente resistencia. Puede ser necesaria una prueba de dilución para obtener un resultado más preciso.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se debe efectuar cada vez que se utiliza un nuevo lote de discos o agar. En el ínterin, se deben evaluar los controles cada día que se realiza un procedimiento a menos que se cumplan criterios estrictos para las evaluaciones semanales. El CLSI ha establecido límites sobre los tamaños de las zonas que son aceptables para las cepas de control de calidad (cuadro 17-21); estos límites proporcionan un medio por el cual se mide la exactitud de la prueba.

LIMITACIONES

La prueba de Bauer-Kirby, modificada por el CLSI, ha sido aceptada en los Estados Unidos como la técnica estándar para realizar las pruebas de sensibilidad por difusión con discos y ofrece información útil en la mayoría de los casos. Sin embargo, existen algunas limitaciones definidas. La prueba sólo se debe aplicar a especies bacterianas que han sido cuidadosamente evaluadas. Las bacterias que crecen en forma lenta, que necesitan nutrientes especiales o que requieren CO_2 o condiciones anaerobias para el crecimiento no deben ser evaluadas, a menos que se haya documentado la validez del procedimiento.¹⁴⁴

Recuadro 17-5 Elección de los antibióticos que se deben comunicar

1. Si el uso de los agentes más costosos o tóxicos está controlado por el personal de la farmacia o los médicos consultores, el laboratorio puede comunicar los resultados de todos los fármacos evaluados. El control sobre el uso inapropiado llega en el momento en que se ordena el fármaco.
2. El laboratorio puede comunicar los resultados de los antibióticos más adecuados y comunicar otros fármacos sólo si existe resistencia a un agente preferido o si un médico solicita específicamente el resultado. Por ejemplo, los resultados de la sensibilidad para las cefalosporinas de tercera generación sólo se comunican si el aislamiento es resistente a los antibióticos de primera generación.
3. Si los recursos son limitados, se pueden evaluar los antibióticos más adecuados y se los comunica en primer lugar, seguidos de otros antibióticos si el médico lo solicita. El personal médico debe mantenerse informado de los antibióticos adicionales que no son evaluados de rutina, pero que se encuentran en el laboratorio para su evaluación.
4. Algunos laboratorios publican el costo del antibiótico además del resultado de la sensibilidad. El motivo para esta política es obvio, pero no se ha documentado la eficacia de mostrar los costos. La reiteración permanente de datos de costos podría lograr que el médico revisor los tenga presentes, pero también podría propiciar que se desatienda la información.
5. La decisión acerca de cuál costo se debe incluir en la comunicación no es clara: ¿costo para la farmacia?, ¿costos para el paciente?, ¿por dosis? ¿por día? ¿Se deben incluir los gastos auxiliares como la administración y las pruebas de laboratorio para la monitorización? Los gastos sobre costos pueden parecer muy diferentes según el enfoque adoptado.



Figura 17-11 Ilustración de prueba de sensibilidad a los antibióticos por dilución en caldo en la cual se diluye en forma seriada el antibiótico por examinar en un intervalo entre 100 $\mu\text{g/mL}$ y 0,4 $\mu\text{g/mL}$. El tubo número 10 sirve como control positivo.

Las ventajas del método de microtubos son que se utilizan pequeños volúmenes de reactivo y que se pueden evaluar grandes cantidades de bacterias en forma simple y económica contra un panel de antibióticos (protocolo 17-2). El intenso trabajo que supone la preparación de placas con múltiples pocillos fue un impedimento importante para su uso sistemático.

Una gran ventaja de las pruebas por microdilución en caldo provino del desarrollo de instrumentos que distribuyan alícuotas exactamente reproducibles de tubos en los cuales se habían preparado grandes volúmenes del antibiótico. Se combinó la precisión de la dilución en grandes volúmenes con la facilidad de la prueba en placas de microtítulos. El instrumento Autospense® (Sandy Spring Technologies, Gaithersburg, MD) (antes Quickspense®) se puede conseguir en el comercio y se utiliza en algunos laboratorios de hospitales. Si se cuenta con los recursos, la producción local de placas permite el uso de un panel ajustado de antibióticos; los usuarios pueden cambiar el panel a voluntad. En la figura 17-22 se muestra una primera versión del instrumento Quickspense. Se preparan las diluciones en grandes volúmenes, luego de lo cual el líquido se dis-

Antibiograma por microdilución en caldo

Junto con el desarrollo de una prueba útil de difusión con discos, otros investigadores intentaron simplificar la prueba de dilución en caldo. El procedimiento de microdilución en caldo es similar en principio al método del macrodilución, salvo en que la sensibilidad a los antibióticos se determina en una serie de pocillos microtubulares moldeados en una placa de plástico. Cada placa puede contener 80, 96 o más pocillos, según la cantidad y la concentración de los antibióticos que van a ser incluidos en el panel de pruebas de sensibilidad.

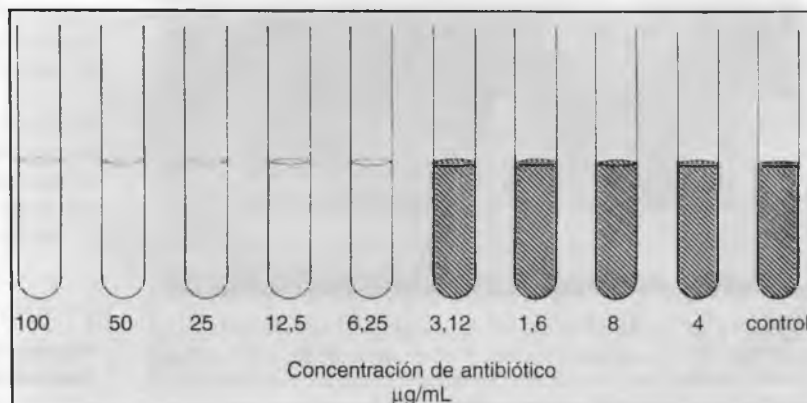


Figura 17-12 Dibujo de líneas de la prueba de sensibilidad por dilución en caldo que se muestra en la figura 17-11. La CIM para la prueba que se muestra aquí es de 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

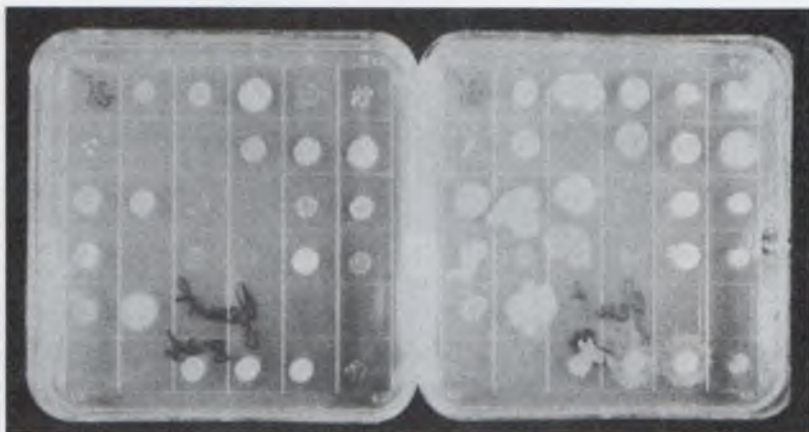


Figura 17-13 Placas de sensibilidad a los antibióticos por dilución en agar que han sido inoculadas con varias especies de bacterias de un replicador de Steers. Los microorganismos sensibles son inhibidos por una concentración de antibiótico contenida en la placa y no se aprecia ningún crecimiento en los puntos de inoculación; los microorganismos resistentes aparecen como colonias definidas de crecimiento bacteriano.

pensa en forma automática en las bandejas de microtítulos. Después de completar la preparación de las diluciones, se pueden distribuir rápidamente las soluciones de los antibióticos en gran cantidad de placas. Estos instrumentos combinan la precisión de la preparación de diluciones en grandes volúmenes con la conveniencia y la economía de los sistemas de microtítulos.

Las placas que contienen antibióticos deben ser congeladas a -20°C o menos hasta su utilización. Las placas preparadas y congeladas se pueden obtener de varias fuentes comerciales. El almacenamiento de gran cantidad de microplacas congeladas puede ser difícil en algunos laboratorios. En este caso, se pueden adquirir placas que contienen antibióticos liofilizados, el equivalente de laboratorio del café instantáneo. La rehidratación de las celdas agrega otro paso al procedimiento, pero la vida de estante ampliada de las placas desecadas por congelamiento es útil, sobre todo para los laboratorios en los cuales se realizan pequeñas cantidades de pruebas. Tanto los sistemas por dilución en caldo congelados como liofilizados, han rendido bien en comparación con los métodos de referencia.^{99,250,280} Como podría esperarse, la reproducibilidad entre los laborato-

rios de los sistemas comerciales que utilizan lotes estandarizados de volumen muy grande ha sido mayor que la de las placas locales, aun cuando las placas fueran preparadas para uso experimental.⁹⁹ Algunos de los sistemas comerciales no han rendido bien en ciertas situaciones especiales, como se explica más adelante.

Las pautas de interpretación sugeridas por el CLSI, que deben ser comunicadas junto con los valores reales de las CIM o en lugar de ellos, se mencionan en el cuadro 17-16. El CLSI ha publicado pautas separadas para la interpretación de las especies de *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Las pautas para el control de calidad son similares a aquellas para la prueba por difusión con discos (cuadro 17-22).

En general, los parámetros se definen con facilidad (fig. 17-23). El examen de microplacas se ve facilitado por el uso de un espejo visualizador (fig. 17-24). En ocasiones, se puede inhibir el crecimiento en un pocillo adyacente a otros con crecimiento no inhibido (pocillo omitido). Si se omite un solo pocillo y no se afecta el resultado, el omitido puede ignorarse. Si se omiten

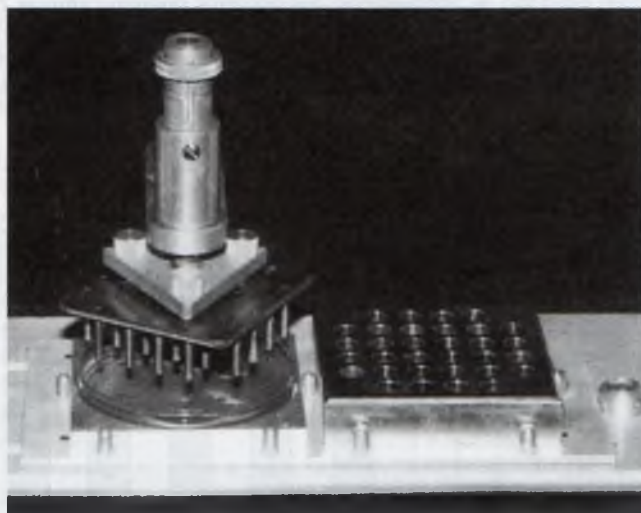


Figura 17-14 Replicador de Steers: el cabezal de inoculación y las puntas están fijas. Una bandeja deslizante coloca alternativamente un molde que contiene el inóculo y una placa de agar debajo del cabezal. Las partes pueden ser desarmadas para la esterilización en autoclave.

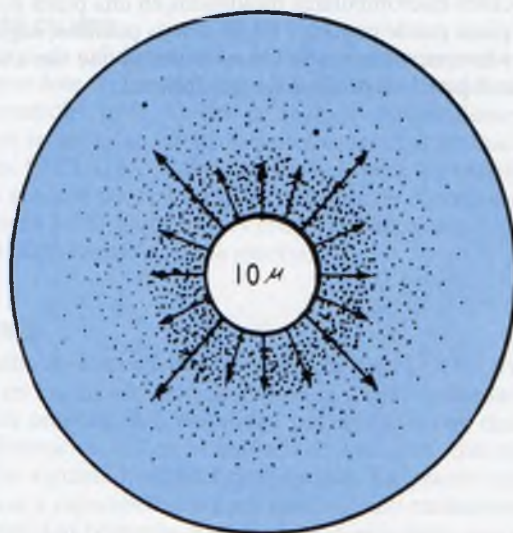


Figura 17-15 Principio de la difusión del antibiótico en el agar. La concentración del antibiótico disminuye a medida que aumenta la distancia desde el disco.

múltiples pocillos, si el omitido ocurre con una dilución que es fundamental para determinar la sensibilidad del aislamiento o si múltiples aislamientos demuestran el fenómeno, se debe investigar el problema y repetir la prueba.

Los resultados de las pruebas del control de calidad pueden dar indicios sobre la naturaleza del problema. Ciertos errores son particularmente frecuentes. Algunos de los posibles problemas y explicaciones se resumen en el cuadro 17-23. El CLSI ha proporcionado pautas para el examen en situaciones clínicas especiales, que se muestran en el cuadro 17-24.

Sistemas comerciales

VITEK® (BIOMÉRIEUX VITEK, HAZELWOOD, MO) Y MICROSCAN® (DADE INTERNATIONAL, WEST SACRAMENTO, CA)

El instrumento Vitek utiliza un análisis computarizado del crecimiento en tarjetas plásticas para calcular una CIM. En algunos casos, el cálculo de la CIM depende de la identificación bacteriana. La exactitud adicional provista por la correlación computarizada del patrón de crecimiento y la identificación es contrabalanceada por la incertidumbre acerca del resultado de la sensibilidad si no se conoce aún la identificación o si el sistema no puede proporcionarla con una certeza suficiente.

Los productos MicroScan se basan sobre los métodos de CIM tradicionales. La línea recorre toda la gama de las placas—congeladas o liofilizadas— que son interpretadas manualmente en un extremo hasta un instrumento semiautomático, el "Walkaway[®]" en el otro. Se incorporan reactivos bioquímicos para la identificación de las bacterias en las mismas placas de microtúbulos. Se utiliza la incubación tradicional durante toda la noche para la mayoría de los productos MicroScan. Sin embargo, el sistema Walkaway incorpora un método de detección por fluorescencia que proporciona una identificación y pruebas de sensibilidad en el mismo día para algunos microorganismos. Existen otros distintos sistemas semiautomáticos, así como varias elecciones para adquirir placas de microdilución comerciales, congeladas o liofilizadas. En general, los sistemas funcionan bien. Los dos sistemas principales generalmente han rendido bien en comparación contra los métodos de referencia,^{175,179,250} aunque se observó un número problemático de errores menores en un informe.²⁹⁷ Además, el instrumento Vitek resultó tan preciso como el método de dilución cuando se realizaron pruebas de sensibilidad directas en el material extraído de frascos de hemocultivos positivos.²⁵⁸

De vez en cuando se comunican problemas con cada uno de estos sistemas. Las fórmulas o los sistemas que producen los resultados más rápidos parecen ser más propensos al error. Como ejemplo de los problemas actuales, el instrumento Vitek produjo más errores de los esperados cuando se evaluaron aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística¹⁴³ y cuando una especie fue evaluada contra carba-penémicos (imipenem y meropenem).²⁹⁵ La historia indica que todas las compañías controlan estos informes con cuidado y más rápidamente para tratar los problemas.

El control de calidad de los resultados automatizados ha sido difícil y en gran parte poco satisfactorio. Para la mayoría de las combinaciones fármacos-microorganismo, las cepas de control estándares producen resultados que están en los extremos del parámetro medido y no se pueden cuantificar con precisión.¹⁶¹

PRUEBA DEL EPSILÓMETRO (ETEST®, AB BIODISK, SUECIA)

Un agregado útil al arsenal diagnóstico es el Etest, que consiste en bandas impregnadas con antibióticos que se colocan sobre la superficie del agar (protocolo 17-3). El principio es

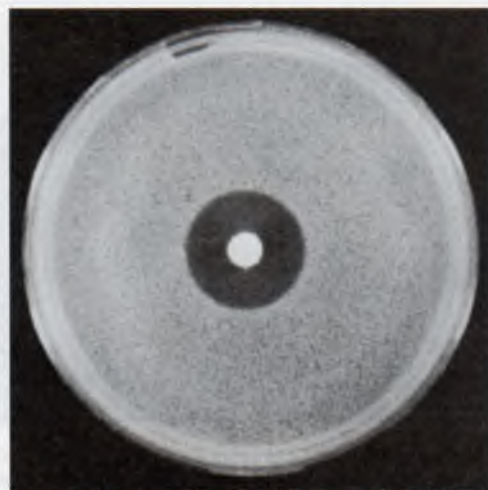


Figura 17-16 Placa para evaluar la sensibilidad a los antibióticos con discos que muestra el mismo principio que en la figura 17-15. En el área donde la concentración de antibiótico es insuficiente para evitar el crecimiento bacteriano, se puede ver un margen definido.

Recuadro 17-6 Interpretación correcta de los antibióticos: situaciones especiales

1. Los microorganismos móviles como *Proteus mirabilis* o *P. vulgaris* pueden ascender cuando crecen en las superficies del agar, lo que conduce a un velo delgado que puede penetrar en las zonas de inhibición que rodean los discos de sensibilidad a los antibióticos (fig. 17-17). Esta zona de movimiento ascendente debe ser ignorada; se debe medir el margen externo, que suele estar claramente señalado. Asimismo, con los discos de sulfamidas, es posible que el crecimiento no sea totalmente inhibido en el margen externo, lo que conduce a un velo débil, donde el 80% o más de los microorganismos son inhibidos. La zona clara de alrededor del 80% de inhibición debe ser leída como el diámetro de la zona.
2. El fenómeno que se muestra en la figura 17-18 debe ser interpretado de modo diferente del que se muestra en la figura 17-17. Obsérvese que se presentan colonias definidas dentro de la zona de inhibición. Esto no representa movimiento ascendente. Más bien, estas colonias son mutantes que son más resistentes al antibiótico que la mayor porción de la cepa bacteriana por evaluar o el cultivo no es puro y las colonias separadas son de una especie diferente. El aislamiento, la identificación y las pruebas de sensibilidad de las colonias resistentes pueden ser necesarios para resolver este problema. Si se determina que las colonias separadas representan una variante de una cepa mutante, las especies bacterianas por evaluar deben considerarse mutantes, aun cuando se puede presentar una zona amplia de inhibición por el resto del crecimiento.
3. La figura 17-19 demuestra la dificultad para medir el diámetro de una zona cuando existe superposición con las zonas de los antibióticos adyacentes, o cuando la zona se extiende más allá del borde de la placa de Petri. Se pueden presentar zonas ovaladas o elípticas y es difícil determinar si hay que medir los diámetros cortos o largos. A menos que las zonas sean muy anchas y el microorganismo por evaluar sea obviamente sensible, la prueba se debe repetir con la colocación más cuidadosa de los discos del antibiótico de modo que no ocurra la superposición.
4. La figura 17-20 muestra una placa mal preparada. Las líneas de la siembra en estría son irregulares y dejan espacios entre las colonias adyacentes. Los bordes de las zonas son poco claros, lo que hace difícil recoger los puntos exactos en los cuales se deben hacer las mediciones. No se debe intentar realizar lecturas sobre una placa poco inoculada como ésta y la prueba debe repetirse.

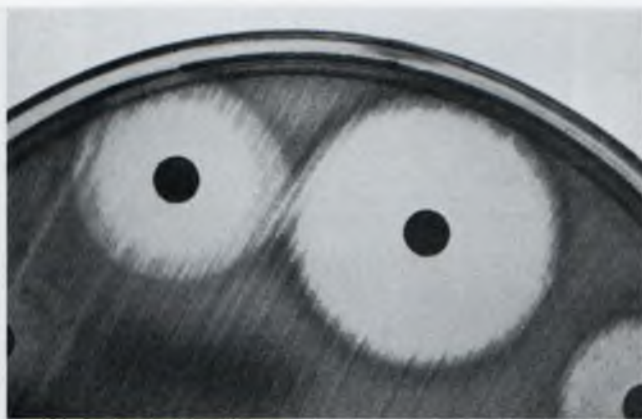


Figura 17-17 Fotografía de una placa para sensibilidad a los antibióticos que utiliza una especie de *Proteus* como microorganismo de prueba. Obsérvese el movimiento en la zona de inhibición en los márgenes periféricos. Se debe utilizar la segunda zona externa de inhibición del crecimiento cuando se mide el ancho de la zona.

una expansión del antibiograma por difusión con discos y el protocolo para preparar el inóculo es el mismo. Se gradúa el contenido del antibiótico de las bandas, y la concentración se imprime linealmente a lo largo de la banda (fig. 17-25). Después de la incubación, la CIM se lee a partir del punto en la banda donde pasa la zona de inhibición del crecimiento. Si se colocan las bandas sobre el agar con la parte superior hacia abajo (sin que el lado impregnado entre en contacto con el agar), es probable que ocurran determinaciones erróneas de la CIM.¹¹⁷ Sin embargo, el fabricante indica que una banda con la parte de arriba hacia abajo puede ser reubicada sin problemas si el error se reconoce de inmediato.

Los mismos factores que influyen en las pruebas de sensibilidad por difusión con discos se aplican a su "hijastro", el Etest.

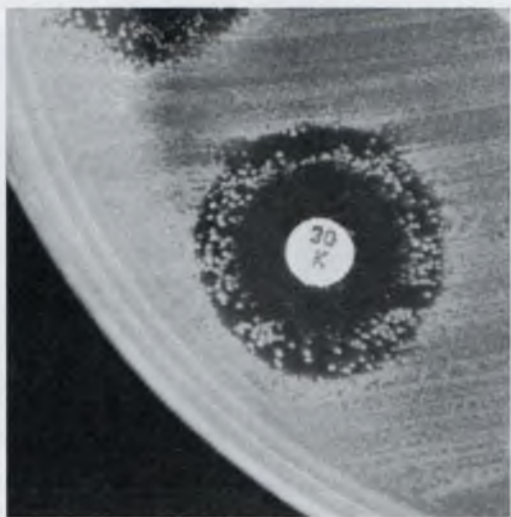


Figura 17-18 Placa para sensibilidad a los antibióticos en la cual están creciendo colonias resistentes a la kanamicina dentro de la zona de inhibición: se deben realizar pruebas bioquímicas para determinar si la cepa resistente es una mutante de los microorganismos que se están examinando o si representa una segunda especie que crece en cultivo mixto.

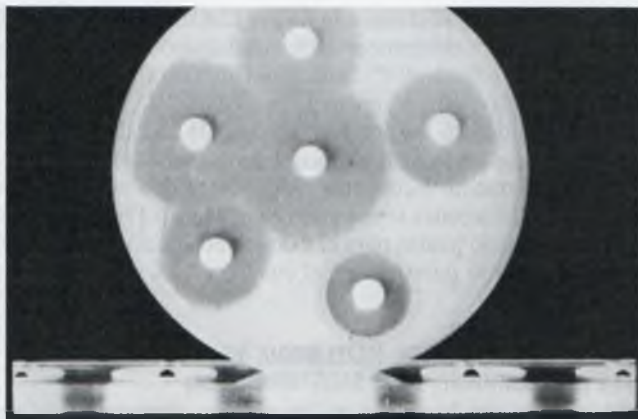


Figura 17-19 Placa para sensibilidad a los antibióticos mal preparada que muestra una superposición objetiva de las zonas de inhibición del crecimiento desde discos adyacentes.

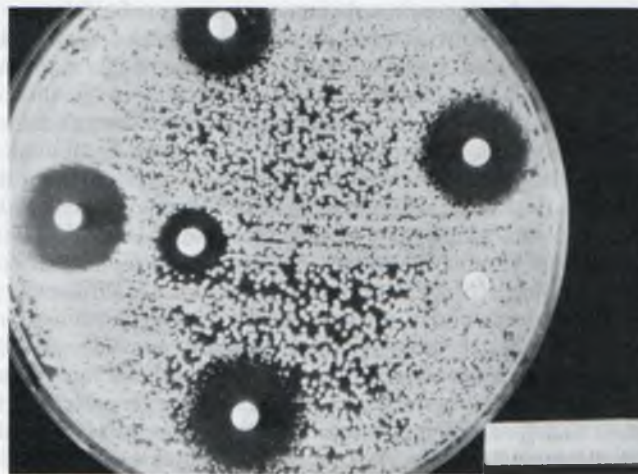


Figura 17-20 Placa para sensibilidad a los antibióticos mal sembrada que muestra un crecimiento irregular. Los márgenes de la zona son indefinidos, lo que compromete una medición precisa.

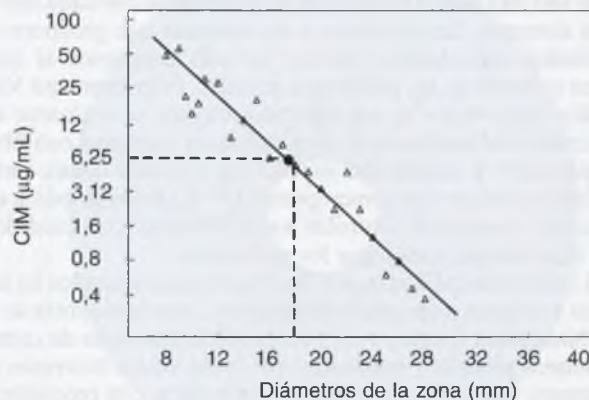


Figura 17-21 Curva de regresión prototipo que compara las CIM en microgramos por mililitro con el tamaño de la zona en milímetros. Cada triángulo representa la CIM (eje vertical) y la zona inhibitoria (eje horizontal) de una cepa única. El diámetro de 18 mm de una zona se corresponde con el punto de corte de la CIM de 6,25 µg/mL, una correlación que, en teoría, se podría hacer para la prueba que se muestra en las figuras 17-11 y 17-12.

Cuadro 17-21 Límites de control de calidad para las pruebas por difusión con discos

ANTIBIÓTICO	CONTENIDO DEL DISCO	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 25922) ^b	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (ATCC 25923)	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (ATCC 27853)	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 35218) ^y
Amikacina	30 µg	19-26	20-26	18-26	—
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10 µg	18-24	28-36	—	17-22
Ampicilina	10 µg	16-22	27-35	—	6
Ampicilina-sulbactam	10/10 µg	19-24	29-37	—	13-19
Azitromicina	15 µg	—	21-26	—	—
Azlocilina	75 µg	—	—	24-30	—
Aztreonam	30 µg	28-36	—	23-29	—
Carbenicilina	100 µg	23-29	—	18-24	—
Cefaclor	30 µg	23-27	27-31	—	—
Cefamandol	30 µg	26-32	26-34	—	—
Cefazolina	30 µg	21-27	29-35	—	—
Cefdinir	5 µg	24-28	25-32	—	—
Cefditoren	5 µg	22-28	26-28	—	—
Cefepima	30 µg	31-37	27-29	24-30	—
Cefetamet	10 µg	24-29	—	—	—
Cefixima	5 µg	23-27	—	—	—
Cefmetazol	30 µg	26-32	25-34	—	—
Cefonicida	30 µg	25-29	22-28	—	—
Cefoperazona	75 µg	28-34	24-33	23-29	—
Cefotaxima	30 µg	29-35	25-31	18-22	—
Cefotetán	30 µg	28-34	17-23	—	—
Cefoxitina	30 µg	23-29	23-29	—	—
Cefpodoxima	10 µg	23-28	19-25	—	—
Cefprozilo	30 µg	21-27	27-33	—	—
Ceftazidima	30 µg	25-32	16-20	22-29	—
Ceftibutén	30 µg	27-35	—	—	—
Cefitroxima	30 µg	30-36	27-35	12-17	—
Ceftriaxona	30 µg	29-35	22-28	17-23	—
Cefuroxima	30 µg	20-26	27-35	—	—
Cefalotina	30 µg	15-21	29-37	—	—
Cloranfenicol	30 µg	21-27	19-26	—	—

(Continúa)

Cuadro 17-21 Límites de control de calidad para las pruebas por difusión con discos (*cont.*)

ANTIBIÓTICO	CONTENIDO DEL DISCO	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 25922) ^a	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (ATCC 25923)	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (ATCC 27853)	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 35218) ^f
Cinoxacina	100 µg	26-32	—	—	—
Ciprofloxacina	5 µg	30-40	22-30	25-33	—
Claritromicina	15 µg	—	26-32	—	—
Clinafloxacina	5 µg	31-40	28-37	27-35	—
Clindamicina	2 µg	—	24-30	—	—
Daptomicina ^d	30 µg	—	18-23	—	—
Diritromicina	15 µg	—	18-26	—	—
Doxiciclina	30 µg	18-24	23-29	—	—
Enoxacina	10 µg	28-36	22-28	22-28	—
Ertapenem	10 µg	29-36	24-31	13-21	—
Eritromicina	15 µg	—	22-30	—	—
Fleroxacina	5 µg	28-34	21-27	12-20	—
Fosfomicina ^e	200 µg	22-30	25-33	—	—
Garenoxacina	5 µg	28-35	30-36	19-25	—
Gatifloxacina	5 µg	30-37	27-33	20-28	—
Gemifloxacina	5 µg	29-36	27-33	19-25	—
Gentamicina ^g	10 µg	19-26	19-27	16-21	—
Grepafloxacina	5 µg	28-36	26-31	20-27	—
Imipenem	10 µg	26-32	—	20-28	—
Kanamicina	30 µg	17-25	19-26	—	—
Levofloxacina	5 µg	29-37	25-30	19-26	—
Linezolida	30 µg	—	25-32	—	—
Lomefloxacina	10 µg	27-33	23-29	22-28	—
Loracarbef	30 µg	23-29	23-31	—	—
Mecilinam	10 µg	24-30	—	—	—

ATCC, American Type Culture Collection.

La difusión de los antibióticos comienza inmediatamente después de la colocación de la banda que, por lo tanto, no puede ser extraída una vez que la superficie impregnada ha tocado el agar. Una placa con pocas estrías puede producir una zona irregular de inhibición en el punto de la CIM. El arremolinamiento de las especies de *Proteus* y la aparición de colonias mutantes dentro de la zona de inhibición pueden ser problemáticos con el Etest, como sucede con la difusión con discos.

El Etest ha resultado eficaz para uso general.⁸ Su costo hace difícil justificar el examen de múltiples antibióticos contra microorganismos que crecen bien en uno de los procedimientos de dilución o difusión con discos. Sin embargo, es invaluable para la evaluación de antibióticos muy seleccionados contra microorganismos con requerimientos nutricionales especiales que no crecen bien en las otras pruebas (p. ej., *Streptococcus pneumoniae*¹⁶³ o estreptococos viridans²⁷²).

En el protocolo 17-3 se explica el procedimiento para realizar una prueba de sensibilidad por las bandas Etest. Además de las cuestiones generales comunes a todas las pruebas de sensibilidad, en el recuadro 17-7 se resumen las sugerencias específicas para resolver los problemas del Etest.

Problemas especiales con las pruebas de sensibilidad

β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas bacterianas heterogéneas que escinden el anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas para inactivar el antibiótico. Las β -lactamasas se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas grampositivas y gramnegativas. Las enzimas producidas por las especies de *Staphylococcus*, especies de *Haemophilus*, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* y *Neisseria gonorrhoeae* han sido las de mayor importancia clínica. La importancia de las enzimas convencionales producidas por muchas bacterias entéricas es menos clara y estas bacterias no deben ser evaluadas para β -lactamasa. Sin embargo, la aparición de β -lactamasas con un espectro amplio en bacterias gramnegativas ha concentrado mayor atención sobre este mecanismo de resistencia.

La presencia de muchas β -lactamasas se puede detectar en forma rápida y confiable, lo que proporciona un indicio claro de que un aislamiento no responderá a los antibióticos β -lactámicos en cuestión. No obstante, las enzimas estafilocócicas y las enzimas de amplio espectro/espectro ampliado de las bacterias gramnegativas presentan problemas especiales, como se explica más adelante.

La prueba de las cefalosporinas cromógenas, que utilizan nitrocefina (Cefinase®; BD Diagnostic System, Sparks, MD) es la más sensible. Existen en el comercio discos de papel de filtro impregnados con nitrocefina. Se hace un frotis sobre el disco de un puñado de una colonia y se lo coloca en una placa de Petri cerrada para evitar la rápida desecación. Los microorganismos que contienen β -lactamasa cambian el color del disco de amarillo a rojo. En general, la reacción ocurre dentro de los 30 segundos, pero las pruebas se leen finalmente después de 15 minutos.

Es menos costoso realizar pruebas acidimétricas, pero son menos sensibles que el ensayo de nitrocefina. La apertura del anillo β -lactámico produce ácido peniciloico, que es más ácido que la penicilina. El cambio de pH se detecta mediante la observación visual de un colorante indicador, rojo fenol. Se ajusta una suspensión de rojo fenol y penicilina G con NaOH a pH 8,5 (punto en el cual el color cambia a violeta) y se almacena a -20°C hasta durante una semana.⁷ En el momento de la

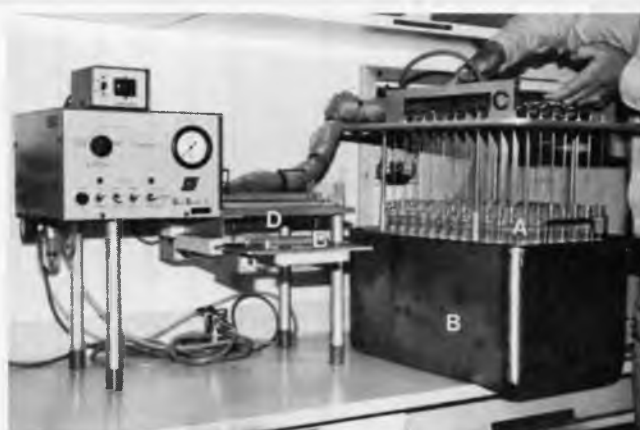


Figura 17-22 Instrumento Quickspense para distribuir líquido en placas de microtítulos. Las diluciones de los antibióticos se preparan en grandes volúmenes, utilizando un conjunto de 96 macrotubos calibrados (A). Los tubos se colocan en una cámara dispensadora hermética (B), cuya parte superior contiene una cánula para cada macrotubo (C). Estas cánulas están conectadas por medio de una tubuladura plástica a un conjunto de 96 agujas (D), a través de la cual se gotean las soluciones antibióticas en una placa de microtítulo (E). Se distribuye un volumen medido mediante la introducción por presión en la cámara dispensadora.

prueba, se sumerge un tubo capilar en la solución de rojo fenol hasta que se llene 1 cm del tubo. El extremo que se llenó se raspa a través de una colonia de bacterias para que tapone el tubo, luego se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos. Un cambio en el indicador rojo fenol a amarillo indica la presencia de β -lactamasa.

En todos los casos la prueba de nitrocefina ha sido el método más sensible y específico para medir β -lactamasas. Se debe utilizar cuando se evalúa *Moraxella catarrhalis*. Existen pocas razones para utilizar uno de los otros métodos cuando la prueba de nitrocefina sirve a todos los propósitos.

ESPECIES DE *STAPHYLOCOCCUS*

Las β -lactamasas de los estafilococos son inducidas por la exposición a las penicilinas y son responsables de la mayor parte de la resistencia a la penicilina G y los compuestos relacionados, pero no son activas contra las cefalosporinas o las penicilinas resistentes a las penicilinasas, como meticilina y naftilina, a menos que se produzcan en grandes cantidades. La detección de estas enzimas es muy difícil con la prueba por microdilución en caldo, porque las bacterias en el inóculo relativamente pequeño utilizado en esta prueba pueden ser destruidas antes de que se induzca la enzima.

Si la CIM de una cepa de estafilococo para la penicilina es mayor de $0,25\ \mu\text{g/mL}$, se puede inferir la presencia de una β -lactamasa. Las cepas con una CIM para la penicilina inferior a $0,03\ \mu\text{g/mL}$ se consideran no productoras de β -lactamasa y sensibles. Los aislamientos para los cuales la CIM cae entre los límites ($0,06$ o $0,12\ \mu\text{g/mL}$) deben ser evaluados para detectar la presencia de β -lactamasa antes de que se comuniquen los resultados. El uso de la proliferación bacteriana de un pocillo que contiene un fármaco de la clase de la penicilina o del borde de una zona de inhibición alrededor de un disco que contiene un compuesto penicilínico puede inducir actividad y aumentar la detección de la enzima. Los resultados de las pruebas de la penicilina pueden ser extrapolados a la ampicilina.

Cuadro 17-22 Límites de control de calidad para las pruebas de sensibilidad por dilución

ANTIBIÓTICO	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (ATCC 29213) ^a	<i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> (ATC 29212)	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 25922)	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (ATCC 27853)	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 35218) ^b
Amikacina	1-4	64-256	0,5-4	1-4	—
Amoxicilina-ácido clavulánico	0,12/0,06-0,5/0,25	0,25/0,12-1,0/0,5	2/1-8/4	—	4/2-16/8
Ampicilina	0,5-2	0,5-2	2-8	—	—
Ampicilina-sulbactam	—	—	2/1	—	8/4-32/16
Azitromicina	0,5-2	—	—	—	—
Azlocilina	2-8	1-4	8-32	2-8	—
Aztreonam	—	—	0,06-0,25	2-8	—
Carbenicilina	2-8	16-64	1-16	16-64	—
Cefaclor	1-4	—	1-4	—	—
Cefamandol	0,25-1	—	—	—	—
Cefazolina	0,25-1	—	—	—	—
Cefdinir	0,12-0,5	—	0,12-0,5	—	—
Cefditoren	0,25-2	—	0,12-1	—	—
Cefepima	1-4	—	0,016-0,12	1-8	—
Cefetamet	—	—	0,25-1	—	—
Cefixima	8-32	—	0,25-1	—	—
Cefmetazol	0,5-2	—	0,25-2	> 32	—
Cefonicida	1-4	—	0,25-1	—	—
Cefoperazona	1-4	—	0,12-0,5	2-8	—
Cefotaxima	1-4	—	0,03-0,12	8-32	—
Cefotetán	4-16	—	0,06-0,25	—	—
Cefoxitina	1-4	—	2-8	—	—
Cefpodoxima	1-8	—	0,25-1	—	—
Cefprozilo	0,25-1	—	1-4	—	—
Ceftazidima	4-16	—	0,06-0,25	1-4	—
Cefitubén	—	—	0,12-0,5	—	—

Cefitizoxima	2-8	—	0,03-0,12	16-64	—
Ceftriaxona	1-8	—	0,03-0,12	8-64	—
Cefuroxima	0,5-2	—	2-8	—	—
Cefalotina	0,12-0,5	—	4-16	—	—
Cloranfenicol	2-8	4-16	2-8	—	—
Cinoxacina	—	—	2-8	—	—
Ciprofloxacina	0,12-0,5	0,25-2	0,004-0,016	0,25-1	—
Claritromicina	0,12-0,5	—	—	—	—
Clinafloxacina	0,008-0,06	0,03-0,25	0,002-0,016	0,06-0,5	—
Clindamicina	0,06	4-16	—	—	—
Daptomicina ^c	0,25-1	1-8	—	—	—
Diritromicina	1-4	—	—	—	—
Doxiciclina	—	—	0,5-2	—	—
Enoxacina	0,5-2	2-16	0,06-0,25	2-8	—
Ertapenem	0,06-0,25	4-16	0,004-0,016	2-8	—
Eritromicina	0,25-1	1-4	—	—	—
Fleroxacina	0,25-1	2-8	0,03-0,12	1-4	—
Fosfomicina ^d	0,5-4	32-128	0,5-2	2-8	—
Garenoxacina	0,004-0,03	0,03-0,25	0,004-0,03	0,5-2	—
Gatifloxacina	0,03-0,12	0,12-1,0	0,008-0,03	0,5-2	—
Gemifloxacina	0,008-0,03	0,016-0,12	0,004-0,016	0,25-1	—
Gentamicina ^e	0,12-1	4-16	0,25-1	0,5-2	—
Grepafloxacina	0,03-0,12	0,12-0,5	0,004-0,03	0,25-2	—
Imipenem	0,016-0,06	0,5-2	0,06-0,25	1-4	—
Kanamicina	1-4	16-64	1-4	—	—
Levofloxacina	0,06-0,5	0,25-2	0,008-0,06	0,5-4	—
Linezolid	1-4	1-4	—	—	—
ATCC, American Type Culture Collection.					

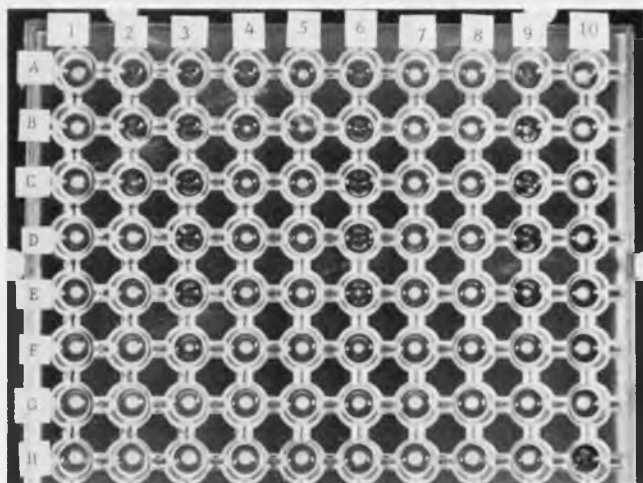


Figura 17-23 Placa para sensibilidad a los antibióticos por microdilución en caldo. Los números en la parte superior indican los diferentes antibióticos que se evalúan dentro de cada columna vertical; las letras a lo largo del borde izquierdo reflejan la concentración de antibióticos contenida dentro de cada pocillo. La aparición de un botón de crecimiento bacteriano en cualquier pocillo indica resistencia a esa concentración de antibiótico.

Los antibióticos β -lactámicos como las cefalosporinas de primera generación y las penicilinas resistentes a la penicilinas (metecilina, nafcilina, oxacilina, dicloxacilina, etc.) tienen un anillo β -lactámico modificado que resiste la digestión enzimática por las β -lactamasas estafilocócicas. Sin embargo, si una cepa produce una pequeña cantidad de enzima, puede inactivar a estos antibióticos *in vitro*. En general, estas cepas muestran una resistencia límite a la oxacilina (CIM, 4 $\mu\text{g/mL}$) y sensibilidad a otros antibióticos de uso frecuente. Por el contrario, las cepas que son resistentes a la oxacilina por medio de una

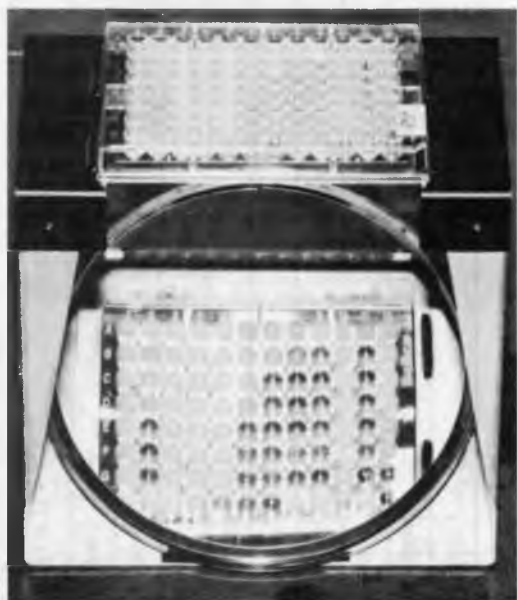


Figura 17-24 Espejo visualizador para la visualización del crecimiento bacteriano en la prueba por microdilución en caldo.

alteración en las proteínas de unión a penicilina suelen tener niveles más altos de resistencia a la oxacilina y resistencia a otros diversos antibióticos, como se explica luego. La importancia clínica de estas cepas no ha sido clara. Sin embargo, Kernodle y cols. describieron un grupo de estas cepas de *Staphylococcus aureus* de cierto tipo de fago que causaron infecciones de heridas de importancia clínica.¹⁶⁴

ESPECIES DE *HAEMOPHILUS*

Hasta el 20-40% de las cepas de *Haemophilus influenzae* tipo B aisladas en infecciones graves producen β -lactamasas.⁶⁶ La detección de las enzimas se debe realizar cuando un microorganismo aislado se considera patógeno. Algunas cepas tienen una resistencia demostrada a la penicilina por otros mecanismos, de modo que una cepa no productora de enzima también debe ser evaluada contra ampicilina mediante una prueba de sensibilidad por difusión o dilución, al menos para las bacterias que han sido aisladas en sitios estériles y están produciendo infecciones de importancia clínica.¹⁷

NEISSERIA GONORRHOEA

Los gonococos productores de penicilinas fueron detectados inicialmente en el Lejano Oriente pero ahora se encuentran ampliamente distribuidos. Todas las cepas deben ser evaluadas para detectar β -lactamasa. Como sucede con las especies de *Haemophilus*, se han identificado ahora algunas cepas que son resistentes a la penicilina por medios no enzimáticos,²⁶⁷ de modo que también se debe realizar una prueba de sensibilidad si el tratamiento fracasa o si la frecuencia de la resistencia es alta en la población.

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS

En los últimos años se ha reconocido a *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* como causa importante de infección respiratoria y de infección intrahospitalaria de las vías respiratorias bajas. La mayoría de las cepas producen β -lactamasas, que son de dos tipos. La enzima más frecuente (tipo Ravasio) es cromosómica, constitutiva, se encuentra altamente asociada con las células y es bloqueada por los inhibidores de las β -lactamasas, como clavulanato y sulbactam.^{60,81} Una segunda enzima menos frecuente (tipo 1908) difiere en varios aspectos importantes. Es producida con una frecuencia 10 a 100 veces menor que el tipo Ravasio. En consecuencia, la prueba de sensibilidad cuantitativa puede estar en el intervalo de sensibilidad en presencia de una prueba de β -lactamasa positiva. En ausencia de buenos datos clínicos, es probable que estas cepas deban considerarse resistentes. Existen pocas razones para realizar cualquier prueba de rutina fuera de la β -lactamasa sobre *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* porque la sensibilidad del microorganismo a otros antibióticos es predecible.⁶⁹ Doern y cols. observaron que la prueba del tubo de nitrocefina o la prueba con discos eran los medios más eficaces para detectar β -lactamasa.^{64,68} El tema ha sido revisado por Doern y Jones.⁶⁴

ESPECIES DE *ENTEROCOCCUS*

Se han identificado cepas de enterococos que producen β -lactamasas.²¹³ Esta resistencia de alto nivel a la penicilina puede detectarse con la prueba de la nitrocefina. La β -lactamasa, que se asemeja a los estafilococos, es transportada sobre un plásmido,²¹⁴ pero los plásmidos propiamente dichos de enterococos

Cuadro 17-23 Detección de problemas en el control de calidad en las pruebas de sensibilidad*		
OBSERVACIÓN	DIAGNÓSTICO	PRUEBAS CORRECTORAS*
CIM demasiado grande o tamaño de la zona demasiado pequeño (aislamientos demasiado resistentes)	1. Inóculo demasiado alto 2. Deterioro del antibiótico 3. Cambio en la cepa de control de calidad 4. Agar demasiado profundo 5. Lectura incorrecta de los resultados	1. Controlar y ajustar el inóculo si fuera necesario 2. Controlar la potencia de los discos o el polvo; probar un nuevo lote 3. Evaluar nueva reserva de cepas de control de calidad 4. Controlar la profundidad del agar 5. Repetir con diversos observadores
CIM demasiado pequeña o tamaño de la zona demasiado grande (aislamientos demasiado sensibles)	1. Inóculo demasiado bajo 2. Antibiótico demasiado potente 3. Cambio en la cepa de control de calidad 4. Agar demasiado delgado 5. Lectura incorrecta de los resultados	1. Controlar y ajustar el inóculo si fuera necesario 2. Controlar la potencia de los discos o el polvo; probar un nuevo lote 3. Evaluar nueva reserva de cepas de control de calidad 4. Controlar la profundidad del agar 5. Repetir con diversos observadores
Resultados de <i>Pseudomonas</i> y aminoglucósidos fuera de control	Contenido incorrecto de cationes	Utilizar caldo con suplemento de cationes o probar un lote diferente de agar
Aminoglucósidos y macrólidos demasiado resistentes; tetraciclina demasiado sensible	Medio demasiado ácido	Controlar el pH de los medios
Aminoglucósidos y macrólidos demasiado sensibles; tetraciclina demasiado resistente	Medio demasiado alcalino	Controlar el pH de los medios
CIM de trimetoprim demasiado grande o tamaño de la zona demasiado pequeño; resultados difíciles de leer	Exceso de timidina en el medio	Evaluar el medio con <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212); agregar timidina fosforilasa o sangre de caballo hemolizada
General	1. Turbidez estándar espirada, almacenamiento incorrecto, no elaborado hasta el estándar o mezclado en forma insuficiente antes de la prueba 2. Materiales o reactivos utilizados después de la fecha de espiración o almacenados incorrectamente 3. Temperatura de la incubadora o atmósfera establecidos incorrectamente 4. Otro equipamiento (p. ej., pipetas) que funciona en forma incorrecta 5. Placas almacenadas a temperatura incorrecta 6. Cepa control mutada o contaminada 7. Suspensiones del inóculo ajustadas en forma incorrecta 8. Inóculo preparado a partir de una placa que tenía más de 24 horas de antigüedad	1. Controlar el estándar de turbidez; preparar nuevo estándar si fuera necesario 2. Controlar la fecha de espiración y la temperatura de almacenamiento de los medios y reactivos 3. Controlar los registros de las incubadoras 4. Controlar el equipamiento; revalidar si fuera necesario 5. Controlar el almacenamiento de las placas y los registros de la temperatura de la localización del almacenamiento 6. Obtener una cepa control fresca y volver a evaluar 7. Revisar la preparación de las suspensiones con el personal 8. Revisar los estándares para las fuentes del inóculo
* Además de las acciones sugeridas en el cuadro, los resultados que se hallan fuera de control requieren una repetición de la prueba y suspender los resultados hasta que el control de calidad esté nuevamente controlado (véase cuadro 17-15).²¹⁷⁻²²⁰ ATTC, American Type Culture Collection.		

Cuadro 17-24 Resumen de los métodos de prueba para microorganismos seleccionados

MICROORGANISMO	MÉTODO	MEDIO	INÓCULO	INCUBACIÓN	COMENTARIOS
Especies de <i>Staphylococcus</i>	Microdilución en caldo; dilución en agar	Caldo de Mueller-Hinton ajustado por cationes (CAMHB) o agar de Mueller-Hinton (MHA); CAMHB o MHA más NaCl al 2% para oxacilina, metilicina y nafcilina	Suspensión directa de las colonias (DCS), equivalente a un estándar de McFarland de 0.5	35 °C; aire ambiente; 16 a 20 horas; 24 horas para oxacilina, nafcilina y metilicina	Considerar las pruebas moleculares para el gen <i>mecA</i> o las pruebas fenotípicas múltiples; considerar la detección en agar para vancomicina si se utilizan sistemas comerciales automatizados; confirmar las cepas de sensibilidad intermedia o resistentes a la vancomicina
	Prueba de detección en agar-oxacilina-sales	Agar de Mueller-Hinton (MHA) con NaCl al 4%	DCS	35 °C; aire ambiente; 24 horas	
	Difusión con discos	MHA	DCS	35 °C; aire ambiente; 16 a 20 horas; 24 horas para oxacilina, nafcilina, metilicina y vancomicina	Considerar la confirmación de los resultados de la vancomicina con una prueba de CIM, sobre todo para las cepas resistentes a la oxacilina; no se detecta bien la resistencia de bajo nivel
	Difusión por gradiente (Etest®)	MHA; MHA con NaCl al 2% para oxacilina, metilicina y nafcilina	DCS en caldo	35 °C; aire ambiente; 16 a 20 horas; 24 horas para oxacilina, nafcilina y metilicina y vancomicina	Incubar la placa durante 48 horas para detectar estafilococos coagulasa negativos resistentes a la oxacilina
Especies de <i>Enterococcus</i>	Microdilución en caldo; dilución en agar	CAMHB; NHA	Método de crecimiento o DCS	35 °C; aire ambiente; 16 a 18 horas; 24 horas para vancomicina	Confirmar las cepas resistentes a la vancomicina; realizar una prueba para β -lactamasa
	Difusión con discos	MHA	Método de crecimiento o DCS	35 °C; aire ambiente; 16 a 18 horas; 24 horas para vancomicina	
	Difusión por gradiente	MHA	DCS en caldo	35 °C; aire ambiente; 16 a 18 horas; 24 horas para vancomicina	
Especies de <i>Enterococcus</i> . Resistencia de alto nivel a la gentamicina	Microdilución en caldo; dilución en agar	Caldo o agar de infusión de cerebro y corazón (NHI); gentamicina 500 µg/mL	Método de crecimiento o DCS; inóculo por microdilución estándar; gotas de 10 µL sobre la superficie del agar	35 °C; aire ambiente; 24 horas	Realizar sólo sobre aislamientos en infecciones sistémicas graves
Especies de <i>Enterococcus</i> . Resistencia de alto nivel a la estreptomycinina	Microdilución en caldo; dilución en agar	Caldo o agar BHI; estreptomycinina 1 000 µg/mL (caldo) o 2 000 µg/mL (agar)	Método de crecimiento o DCS; inóculo por microdilución estándar; gotas de 10 µL sobre la superficie del agar	35 °C; aire ambiente; 24 horas; reincubar otras 24 horas si es sensible	Realizar sólo sobre aislamientos en infecciones sistémicas graves

Especies de <i>Enterococcus</i> . Resistencia de alto nivel a aminoglucósidos	Difusión con discos	MHA; disco de 120 µg (gentamicina); disco de 300 µg (estreptomicina)	Método de crecimiento o DCS	35 °C; aire ambiente; 16 a 18 horas	Confirmar los resultados inmediatos con una prueba de CIM
Especies de <i>Enterococcus</i> . Resistencia de alto nivel a aminoglucósidos	Difusión por gradiente	MHA; tiritas de gentamicina y altas dosis de estreptomicina	Suspensión en caldo hasta estándar de McFarland de 0,5-1,0	35 °C; aire ambiente; 48 horas	
Especies de <i>Enterococcus</i> . Resistencia a vancomicina	Dilución en agar	Agar NHI; vancomicina 6 µg/mL	Método de crecimiento o DCS; inóculo para microdilución estándar; 1-10 µL manchados en la superficie del agar	35 °C; aire ambiente; 24 horas	
Especies de <i>Haemophilus</i>	Microdilución en caldo	Caldo de medio de prueba para <i>Haemophilus</i> (HTM)	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20 a 24 horas	
	Difusión con discos	Medio de prueba para <i>Haemophilus</i> (HTM)	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20 a 24 horas	
	Difusión por gradiente	HTM o MHA con hemoglobina al 1% e Isovitalex (BBL) al 1% si es validado contra NCCLS	DCS en caldo	35 °C; aire ambiente; 24 horas	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Dilución en agar	Base de agar GC y suplemento de crecimiento definido al 1% (véase el texto)	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	Realizar la prueba de la β-lactamasa
	Difusión con discos	Base de agar GC y suplemento de crecimiento definido al 1% (véase el texto)	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	No se necesita un medio sin cisteína; realizar la prueba de la β-lactamasa
	Difusión por gradiente	Base de agar GC y suplemento de crecimiento definido al 1% (véase el texto)	DCS en caldo	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Microdilución en caldo	CAMHB más sangre de caballo hemolizada v/v al 2-5%	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 16-20 horas	
	Dilución en agar	MHA más sangre de carnero v/v al 5%	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 16-20 horas	Utilizar sangre de caballo hemolizada v/v al 2-5% en lugar de la sangre de carnero si se evalúan las sulfamidas
	Difusión con discos	No validado			
	Difusión por gradiente	MHA más sangre de carnero al 5% o MHA más hemoglobina al 1% e Isovitalex al 1% (BBL)	DCS en caldo	35 °C; CO ₂ al 5%; 18-24 horas	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Microdilución en caldo	CAMHB con sangre de caballo hemolizada al 2-5% (v/v)	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	Se puede realizar un examen de detección con discos de oxacilina para determinar la sensibilidad a la penicilina como prueba preliminar

(Continúa)

Cuadro 17-24 Resumen de los métodos de prueba para microorganismos seleccionados (cont.)

MICROORGANISMO	MÉTODO	MEDIO	INÓCULO	INCUBACIÓN	COMENTARIOS
	Difusión con discos	MHA con sangre de carnero al 5%	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	No se cuenta con pruebas en disco confiables para algunos antibióticos; se recomienda la prueba de CIM para los aislamientos del LCR
	Difusión por gradiente	MHA con sangre de carnero al 5%	DCS en caldo	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	Si el césped bacteriano es demasiado escaso, repetir utilizando un estándar de McFarland 1.0
Especies de <i>Streptococcus</i> distintas de <i>S. pneumoniae</i>	Microdilución en caldo	CAMHB con sangre de caballo hemolizada v/v al 2-5%	DCS	35 °C; aire ambiente; 20-24 horas	
	Dilución en agar	MHA con sangre de carnero v/v al 5%	DCS	35 °C; aire ambiente; 20-24 horas; CO ₂ si es necesario para el crecimiento	Utilizar sangre de caballo hemolizada en lugar de sangre de carnero si se evalúa una sulfamida
	Difusión con discos	No validada			
	Difusión por gradiente	MHA con sangre de carnero al 5%	DCS	35 °C; CO ₂ al 5%; 20-24 horas	Equipar el inóculo con un estándar de McFarland 1.0 para las cepas mucoides
<i>Vibrio cholerae</i>	Microdilución en caldo; dilución en agar	CAMHB; MHA	Método de crecimiento o DCS	35 °C; aire ambiente; 16-20 horas	
	Difusión con discos	MHA	Método de crecimiento o DCS	35 °C; aire ambiente; 16-18 horas	
Especies de <i>Listeria</i>	Microdilución en caldo	CMHB más sangre de caballo hemolizada v/v al 2-5%	DCS	35 °C; aire ambiente; 16-20 horas	Para ampicilina y penicilina ≤ 2 µg/mL = sensibles (no se caracterizan las cepas resistentes)
Adaptado de hojas de aplicación del Etest®, AB Biodisk, Solna, Suecia y de las referencias ^{217,218} .					

y estafilococos no son homólogos.³³¹ Las cepas de *Enterococcus faecalis* que producen β -lactamasa y también muestran resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos se han vuelto epidémicas en algunas instituciones.³⁴¹ Si la prueba con discos de nitrocefina no se realiza sobre los aislamientos, es posible que no se reconozca la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. En un estudio de los laboratorios de New Jersey realizado por Tenover y cols. una cepa productora de β -lactamasa de *E. faecalis* fue reconocida como resistente a la penicilina sólo por el 66% de 76 participantes y a la ampicilina por un alarmante 8% de los laboratorios. Sólo 3 de los 76 laboratorios reconocieron que la cepa producía β -lactamasa, lo que señala la importancia de realizar una prueba de β -lactamasa en los enterococos, sobre todo si han sido aislados en sitios estériles.³¹⁴ Una combinación de piperacilina y tazobactam es eficaz contra los enterococos productores de β -lactamasas²³⁴ y es posible que esta combinación proporcione sinergia con aminoglucósidos para dichas cepas.

β -LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO

Se puede sospechar la presencia de β -lactamasas de espectro ampliado si una cepa de *Klebsiella pneumoniae* o de *Escherichia coli* demuestra resistencia a uno o más de los antibióticos β -lactámicos indicadores, pero sensibilidad a otras cefalosporinas de tercera generación. Lamentablemente no existe ningún antibiótico indicador único que funcione en todas las situaciones. Las β -lactamasas de espectro ampliado se presentan en otras enterobacterias, como especies de *Enterobacter* y de *Citrobacter*, pero la detección es más difícil debido a la aparición frecuente de otros tipos de β -lactamasas, sobre todo enzimas AmpC, en estas especies. El CLSI ha proporcionado recomendaciones, que se resumen en el cuadro 17-25, sólo para *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Una vez que se ha sugerido la posibilidad de una β -lactamasa de espectro ampliado mediante las pruebas iniciales, es necesario realizar una prueba confirmatoria, sobre la base del hecho de que estas enzimas casi siempre son bloqueadas por inhibidores de la β -lactamasa. En el cuadro 17-26 se resumen las pruebas actualmente disponibles.

Los criterios del CLSI para el cribado y la confirmación de la producción de β -lactamasas de espectro ampliado en *Escherichia coli* y especies de *Klebsiella* han probado ser confiables, aunque existe una posibilidad de omitir ciertas cepas si el inóculo es demasiado bajo.²⁶⁰ Aunque las β -lactamasas de espectro ampliado se encuentran en otras especies, en este momento no es útil aplicar los criterios del CLSI a estos microorganismos.²⁸¹

Estas enzimas son transportadas por plásmidos que a menudo median la resistencia a otros antibióticos, como aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfamidas, de modo que la aparición de patrones de resistencia inusuales también puede servir como indicio de que se presentan enzimas de espectro ampliado.^{84,160} Se han sugerido varios métodos para aumentar la detección de este mecanismo de resistencia. Una prueba de sinergia con doble disco con discos de cefotaxima y amoxicilina-clavulanato colocados con 30 mm de separación de un centro a otro fue eficaz para detectar resistencia mediada por enzimas de tipo EBS-B1a.¹⁴¹ Thomson y Sanders evaluaron dos métodos para detectar resistencia.³¹⁷ Se realizó una prueba de doble disco con discos de ampicilina-clavulanato rodeados por discos de aztreonam y cefalosporinas de tercera generación (separados por 30 mm centro a centro). La distorsión de los tamaños de las zonas en forma sinérgica (fig. 17-29C) indicó la producción de enzi-

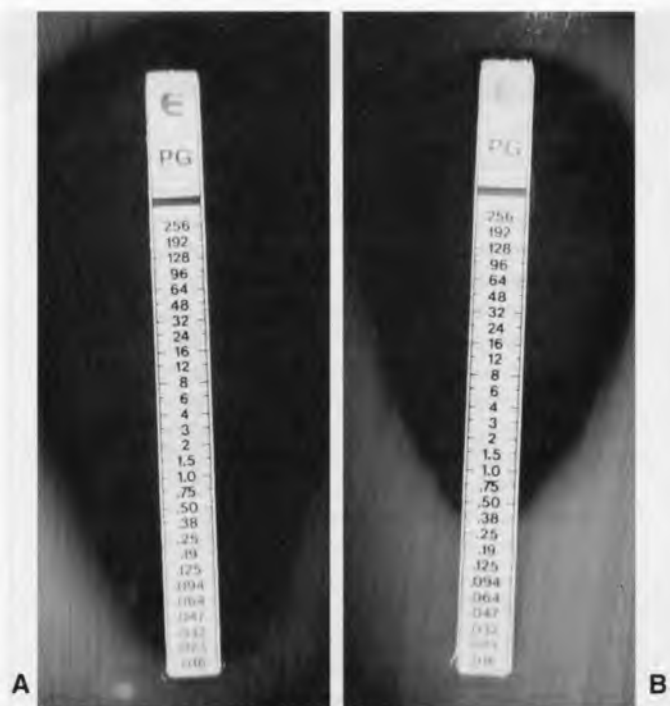


Figura 17-25 Etest® para *Streptococcus pneumoniae* en agar de Mueller-Hinton con sangre. Las placas han sido preparadas como para la prueba de difusión con disco, después de lo cual se han aplicado las tiras de la prueba. La CIM de la cepa aislada se lee donde la línea de inhibición del crecimiento cruza la tira. (A) Cepa totalmente sensible con una CIM de 0,016 µg/mL. (B) Cepa con una sensibilidad intermedia y una CIM de 0,38 µg/mL.

ma. Este método detectó verdadera resistencia en 22 de 28 cepas (79%). El segundo método fue una prueba tridimensional en la cual se recortó un hoyo circular en el agar inmediatamente por dentro de la posición final de los discos de antibióticos. El hoyo se llenó con inóculo bacteriano. Por otra parte, el procedimiento siguió el protocolo estándar de difusión con discos. La distorsión de los tamaños de las zonas en el punto del corte en el agar indicó la presencia de la enzima. La prueba tridimensional detectó resistencia en 26 de 28 aislamientos (93%), pero la técnica y la interpretación son rigurosas.

Especies de *Staphylococcus* ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS (ESPECIES DE *STAPHYLOCOCCUS* RESISTENTES A LA OXACILINA)

Durante varias décadas los antibióticos penicilínicos estables a las β -lactamasas (penicilinasas) constituyeron la piedra fundamental del tratamiento antibiótico contra *Staphylococcus aureus*; por el contrario, la gran mayoría de los estafilococos coagulasa negativos siempre han sido resistentes a estos compuestos. Desde el punto de vista clínico, meticilina y nafcilina son los fármacos más utilizados de esta clase, y los aislamientos suelen describirse como *S. aureus* resistente a la meticilina o *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina. Es particularmente difícil detectar esta resistencia en el laboratorio. Los estafilococos son heterorresistentes; es decir, sólo una pequeña fracción de las bacterias en un cultivo expresan resistencia, una característica que está mediada por cromosomas. La unión de la meticilina a la proteína de unión a meticilina 2a se relaciona con la resistencia al antibiótico.⁴³ Las células resistentes crecen más lentamente que las bacterias sensibles, a

Recuadro 17-7 Detección de problemas en las pruebas de sensibilidad Etest®

1. Colocar el Etest sobre la superficie del agar, el cual ha sido sembrado en estría con el inóculo. No mover la tira una vez que la superficie impregnada con antibiótico ha tocado el agar. Si se coloca accidentalmente la tira con la parte superior hacia abajo (el lado no impregnado con antibióticos en contacto con el agar), se puede retirar la tira y colocarla correctamente.
2. Si el crecimiento es insuficiente como para ver una elipse claramente definida de inhibición después de la incubación inicial, continuar la incubación dentro de los límites definidos del procedimiento. Si la incubación se debe prolongar más allá de los límites recomendados, no se pueden utilizar los puntos de corte publicados sin una evaluación.
3. Leer la CIM donde la elipse cruza la escala de la tira. El punto de intersección es la inhibición completa de todo crecimiento, que incluye las zonas esfumadas ("nubosas") y las colonias aisladas.
 - a. Si se presentan microcolonias en la zona de inhibición, controlar la pureza del cultivo (como para la prueba por difusión con discos); no ignorar estas colonias al determinar la CIM.
 - b. Inclinar las placas para visualizar las colonias puntiformes y las zonas esfumadas, sobre todo para enterococos, neumococos y especies de *Stenotrophomonas*. Como alternativa, se puede utilizar una lupa para detectar microcolonias (a diferencia de lo que se permite en la prueba de difusión con discos).
 - c. Incluir una zona esfumada como crecimiento cuando se determina la inhibición, pero ignorar la acumulación producida por las especies de *Proteus*.
 - d. Cuando se examinan bacterias β -hemolíticas, evaluar la zona de inhibición e ignorar la hemólisis.
 - e. Si ocurre un efecto paradójico (inhibición con baja CIM y nuevo crecimiento con una CIM mayor), leer la CIM como la zona de inhibición completa final.
 - f. Los agentes bacteriostáticos, como trimetoprim-sulfametoxazol, pueden producir crecimiento con un borde rizado y difuso; leer la CIM con una inhibición del 80% (como para la prueba por difusión con disco).
 - g. Cuando se evalúan combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de las β -lactamasas, el inhibidor puede tener actividad intrínseca y producir una elipse ampliada en las CIM más bajas. Extrapolar la elipse superior de inhibición para determinar la CIM.
 - h. Se puede observar un efecto de "inmersión" en la CIM cuando se presenta resistencia inducible a los macrólidos, lo que produce una elipse con una prominencia en el extremo. Extrapolar la curvatura de la elipse primaria para determinar la CIM.
 - i. Ignorar una línea delgada de crecimiento a lo largo de la porción inferior de la tira, fenómeno producido por los microorganismos que crecen en un túnel de agua a lo largo de la tira.
4. Si la zona de inhibición cruza la tira entre dos marcas, leer el valor más alto. Asimismo, si la zona cruza la tira en forma ligeramente diferente en los dos lados, leer el valor más alto.
5. Si la CIM producida por la tira se encuentra entre dos números del esquema clásico de dilución doble (sobre el cual se basan todas las recomendaciones estándares), redondear la "respuesta" hasta la siguiente dilución doble. Por ejemplo, una CIM de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ se comunicaría como 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

menos que sean incubadas a temperatura reducida. El inóculo relativamente bajo utilizado en la prueba de microdilución en caldo puede comprometer la detección de la pequeña fracción de células resistentes. Se han comunicado variaciones en la capacidad de diferentes lotes de agar de Mueller-Hinton para detectar heteroresistencia.¹²⁵ Estos aislamientos, que expresan PBP 2a, son clínicamente resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos, pero la resistencia se detecta más fácilmente con oxacilina en el laboratorio. Serán denominados estafilococos resistentes a la oxacilina, pero todos los antibióticos penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos deben ser comunicados como resistentes (cuadro 17-12).

En un estudio de 975 aislamientos clínicos, Varaldo y cols. encontraron 122 cepas de *S. aureus* (12,5%) que tenían una sensibilidad límite a las penicilinas resistentes a las penicilinasas.³²⁹ Existen cuatro posibles mecanismos para este resultado. Al principio, McDougal y Thornsberry comunicaron que la hiperproducción de β -lactamasa es el mecanismo por el cual algunas cepas de *S. aureus* con sensibilidad límite expresan resistencia a la oxacilina y ésta parece ser la explicación más frecuente.¹⁹⁸ Las cepas hiperproductoras pueden detectarse realizando una prueba de CIM con una combinación de un inhibidor de la β -lactamasa y un antibiótico β -lactámico (fig. 17-30). Chang y cols. observaron que en las cepas de *S. aureus* con una CIM $< 64 \mu\text{g/mL}$, la CIM se redujo de 4 a 32 veces si se agregaban 4 $\mu\text{g/mL}$ de sulbactam u 8 $\mu\text{g/mL}$ de tazobactam.⁴⁴ El agregado de un inhibidor a las cepas con una CIM de oxacilina $> 64 \mu\text{g/mL}$ no alteró la CIM, aunque estas cepas también produjeron β -lactamasa. El mecanismo para una sensibilidad límite no siempre es la hiperproducción de β -lactamasa convencional.⁹ Se describió una β -lactamasa que hidroliza específicamente la meticilina.¹⁹⁴ Un tercer mecanismo es la modificación de la unión del antibiótico a las proteínas de unión a penicilina normales.³²² Por último, algunas cepas que tienen una sensibilidad límite poseen el gen *mecA* y producen proteína de unión a penicilina 2a en un bajo nivel.¹⁰¹ Con estas cepas límite puede ser útil una variante de la prueba por difusión con discos o la demostración de una proteína de unión alterada.⁸³

En general, las cepas límites hiperproductoras tienen una CIM de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$. A diferencia de las cepas heteroresistentes, que demuestran resistencia a múltiples fármacos, estas cepas suelen ser sensibles a otros antibióticos. Las pruebas experimentales a partir de un modelo animal de endocarditis sugieren que estas cepas sensibles límites deben responder al tratamiento con oxacilina como lo hacen las cepas completamente sensibles.³¹⁵ Algunos estudios clínicos limitados indican lo mismo.^{118,193} Si existe alguna duda acerca de la respuesta clínica, la administración de vancomicina es el tratamiento conservador adecuado.

Es probable que ningún procedimiento fenotípico aislado detecte resistencia del estafilococo a la oxacilina con absoluta confiabilidad. Algunas manipulaciones aumentan la probabilidad de que se demuestre resistencia (recuadro 17-8). Sin embargo, también es probable que algunas manipulaciones, como la incubación prolongada de las pruebas de sensibilidad, puedan generar falsas estimaciones de resistencia.⁴⁹ Es probable que el más confiable de los métodos fenotípicos sea la evaluación por dilución en agar con 6 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina. Swenson y cols. investigaron las condiciones óptimas para este enfoque fenotípico.³⁰³ El método de referencia (*gold standard*), que aún no se encuentra ampliamente disponible, es la detección del gen *mecA* por la amplificación de ácidos nucleicos.

Cuadro 17-25 Pruebas de detección para las β -lactamasas de espectro ampliado

ANTIBIÓTICO ^a	PUNTO DE CORTE DE LA CIM	DISCO Y PUNTO DE CORTE DE LA ZONA	COMENTARIOS ^b
Cefpodoxima	4 $\mu\text{g/mL}$	10 μg ; ≤ 17 mm	Parece ser el indicador general más sensible; ³¹⁸ no es útil para <i>K. oxytoca</i> ; ³¹⁶ puede dar resultados positivos falsos con <i>E. coli</i> ³¹²
Ceftazidima	1 $\mu\text{g/mL}$	30 μg ; ≤ 22 mm	Las cepas con resistencia de alto nivel no pueden ser evaluadas en el ensayo confirmatorio de ceftazidima; ²⁹⁶ es posible que no detecte resistencia en <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i>
Aztreonam	1 $\mu\text{g/mL}$	30 μg ; ≤ 27 mm	
Cefotaxima	1 $\mu\text{g/mL}$	30 μg ; ≤ 27 mm	
Ceftriaxona	1 $\mu\text{g/mL}$	30 μg ; ≤ 25 mm	Las cepas muy sensibles no pueden ser evaluadas en el ensayo confirmatorio de ceftriaxona ²⁹⁶
Cefipima	1 $\mu\text{g/mL}$	ND	No incluido en los documentos del CLSI; puede ser útil para diferenciar las enzimas AmpC de las especies de <i>Enterobacter</i> y las especies de <i>Serratia</i> . ^{296,316}
Cefoxitina	Puntos de corte del NCCLS	Puntos de corte del NCCLS	No está incluido en los documentos del CLSI; la resistencia puede indicar un productor de AmpC ⁵⁰ o puede diferenciar entre los mecanismos de resistencia distintos de las β -lactamasas de espectro ampliado ²⁹⁶

^a La sensibilidad de detección y la facilidad de la interpretación aumentan si se utiliza más de un antibiótico indicador.

^b Obsérvese que las indicaciones actuales del CLSI pueden diferir de las aplicables en el momento en que se realizaron los estudios de referencia.

ND, no disponible.

Adaptado de las referencias^{217,218}.

La detección de resistencia es muy aguda con los estafilococos coagulasa negativos. En un intento por corregir la caracterización inapropiada de las cepas como sensibles a la oxacilina, el CLSI ha modificado el valor crítico de sensibilidad para las cepas coagulasa negativas de 2 $\mu\text{g/mL}$ a 0,25 $\mu\text{g/mL}$.^{217,218} Esta modificación mejoró la situación para *S. epidermidis*, la especie aislada más frecuente, pero en el proceso, las cepas de algunas especies menos aisladas, como *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*, fueron clasificadas en forma inadecuada como resistentes cuando carecían del gen *mecA*.^{85,110}

Por fortuna, el único mecanismo para la verdadera resistencia de los estafilococos a la oxacilina es la alteración de las PBP 2. Dada la insistente solicitud de caracterización fenotípica, la solución obvia es la detección genotípica de resistencia. De hecho, la prueba de referencia es la detección del gen para la proteína alterada mediante un método de amplificación, como PCR.^{186,188} En este punto, estas pruebas están limitadas a los laboratorios de especialidad, pero es probable que la técnica esté más difundida en el futuro cercano. Mientras tanto, se pueden conseguir pruebas comerciales simplificadas para la detección del gen o del producto genético y sirven a este propósito.^{129,140} Aunque en teoría son más convenientes que las pruebas fenotípicas, el conjunto actual de ensayos fenotípicos también presenta dificultades metodológicas, de modo que probablemente sea prudente usar una combinación de pruebas, ya sea de rutina o selectivas.³⁰⁴ Para los agentes antibióticos distintos de los β -lactámicos sigue siendo necesario utilizar las pruebas fenotípicas.

Como se mencionó, es difícil detectar resistencia a las cefalosporinas entre los estafilococos. Existen pruebas clínicas de que las cepas de *S. aureus* resistentes a la oxacilina no responden in vivo al tratamiento con cefalosporinas; también se ha sucedido el mismo fenómeno para *S. epidermidis*.^{218,219} Si se

demuestra resistencia a nafcilina, oxacilina o metilicina, la cepa bacteriana debe ser comunicada como resistente a otros antibióticos β -lactámicos, incluidas todas las cefalosporinas, como cefazolina o cefalotina y el antibiótico carbapenémico imipenem (véase cuadro 17-12).

VANCOMICINA

Una cepa de *S. haemolyticus* que desarrolló resistencia a la vancomicina durante el tratamiento de un paciente con episodios recurrentes de peritonitis, descrita en 1987,²⁸² fue el presagio de la pesadilla de todos: la aparición de una resistencia similar en *S. aureus*. La producción en el laboratorio de aislamientos de *S. aureus* con una disminución de cuatro veces en la sensibilidad a la vancomicina fue una advertencia de que sólo era cuestión de tiempo.⁵³ El cambio en la sensibilidad se relacionó con la presencia de una proteína citoplasmática de 39 kDa. Más aún, se pudieron transferir en el laboratorio genes enterocócicos para resistencia a la vancomicina a *S. aureus*.²³⁰

Por fortuna, llevó una década que las cepas clínicas expresaran resistencia. El primer aislamiento, que expresó una sensibilidad reducida más que una resistencia completa a la vancomicina, fue registrado en Japón,² pero pronto se aislaron cepas similares en pacientes de otras partes del mundo, incluidos los Estados Unidos.³¹⁰ Las cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina o con resistencia intermedia a este antibiótico reciben la designación de VRSA y VISA, respectivamente, por sus siglas en inglés.²⁹⁴ Aunque la vancomicina es el único antibiótico glucopéptido utilizado comúnmente en los Estados Unidos, el problema también concierne a otros glucopéptidos (en inglés GISA o, por extensión, GRSA).

La resistencia a la vancomicina puede ser expresada en forma homogénea por los estafilococos pero, como sucede con

Cuadro 17-26 Pruebas confirmatorias para las β-lactamasas de espectro ampliado			
MÉTODO	CRITERIOS PARA β-LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO	COMENTARIOS	ILUSTRACIÓN
Prueba de doble disco	Aumento de la zona de inhibición que enfrenta al disco que contiene el inhibidor de la β-lactamasa	La colocación de los discos es fundamental; puede ser necesaria la separación de los centros de los discos tanto por 20 mm como por 30 mm	Figura 17-26
Comparación de la CIM o la zona de inhibición alrededor del disco en presencia o ausencia de un inhibidor de las β-lactamasas	Disminución en la CIM ≥ 8 veces (tres diluciones de duplicación) o aumento ≥ 5 mm en el tamaño de la zona en presencia del inhibidor de la β-lactamasa	El CLSI recomienda el uso de ceftazidima como de cefotaxima con ácido clavulánico y sin él	Figura 17-27
Prueba para β-lactamasas de espectro ampliado Vitek®	Disminución en la CIM calculada en presencia del inhibidor de la β-lactamasa	Resultado calculado mediante software	No se muestra
Etest®	Tira de doble extremo con un β-lactámico en un extremo y la combinación de β-lactámico e inhibidor de la β-lactamasa en el otro	Reducción en la CIM ≥ 8 veces en presencia del inhibidor de la β-lactamasa	Figura 17-28
Prueba tridimensional	Agujero circular recortado en el agar entre la posición de los discos; luego llenado con inóculo bacteriano; la distorsión del tamaño de la zona en el punto de corte indica β-lactamasas de espectro ampliado	Método más sensible, pero de realización técnica más exigente	No se muestra

la oxacilina, las cepas pueden ser heterorresistentes (lo que se expresa en una pequeña porción de las células bacterianas).²⁹⁴ La detección de cepas heterorresistentes puede ser problemática y los CDC han establecido recomendaciones para las pruebas del laboratorio (recuadro 17-9). La difusión con disco y los métodos en los cuales se reduce el tiempo de incubación son problemáticos.

Desde el punto de vista clínico, el problema de la resistencia se torna más complejo por tres factores: 1) los estafilococos, sobre todo *S. aureus*, son los principales patógenos; 2) la vancomicina ha sido la red de seguridad terapéutica durante muchos años y 3) las cepas a menudo expresan resistencia a diversos antibióticos, entre ellos oxacilina y quinupristina-dalfopristina (un antibiótico antiestafilocócico recién desarrollado).³⁴²

MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS

La resistencia a los macrólidos entre los estafilococos está mediada por la salida activa de antibióticos desde las células bacterianas (*msrA*) o por la modificación de los dianas ribosómicos (habitualmente *ermA* o *ermC*).¹⁷⁶ La modificación ribosómica puede ser expresada constitutivamente o puede ser inducible.²⁷¹ La resistencia a la eritromicina se detecta con mayor facilidad que la resistencia a la clindamicina. Las cepas sensibles a la eritromicina son confiablemente sensibles a la clindamicina, pero lo opuesto no siempre es cierto. La nomenclatura para los mecanismos de resistencia para este grupo de antibióticos ha sido revisada por Roberts y cols.²⁷¹

Las cepas de estafilococos que expresan una resistencia constitutiva a la eritromicina y la clindamicina presentan poca dificultad, porque serán detectadas como resistentes in vitro.

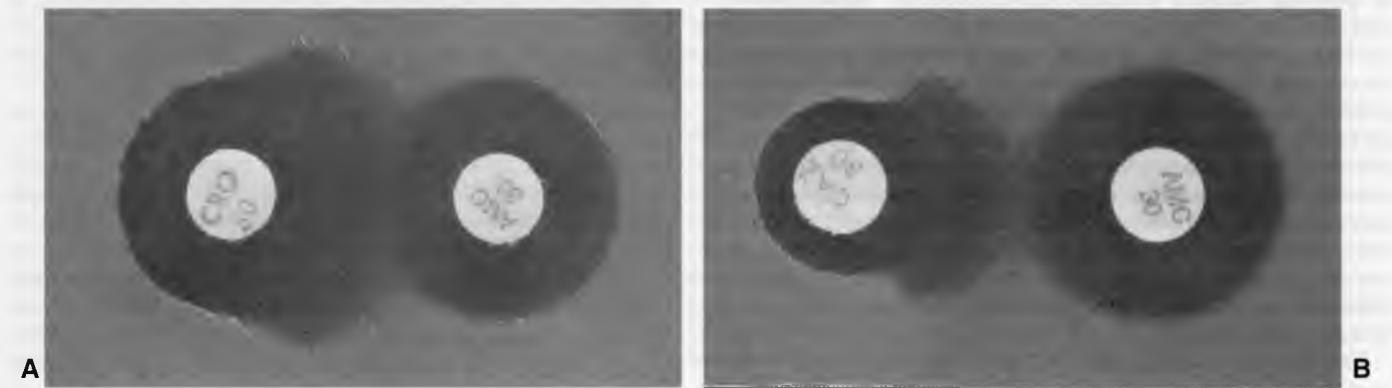


Figura 17-26 Prueba de doble disco para la producción de β-lactamasas de espectro ampliado en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*. (A) La zona que rodea a un disco de ceftriaxona (CRO) está distorsionada y ensanchada del lado que enfrenta un disco que contiene ácido clavulánico (AMC). (B) Se demuestra un fenómeno similar con un disco que contiene ceftazidima (CAZ) adyacente a un disco que contiene ácido clavulánico (AMC).

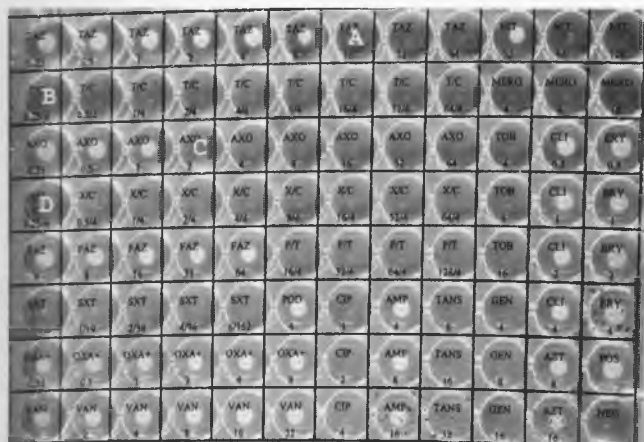


Figura 17-27 Prueba de la CIM para la producción de β -lactamasas de espectro ampliado en un aislamiento de *Escherichia coli*. La CIM de este aislamiento para ceftazidima es de 16 $\mu\text{g/mL}$ (A); cuando se combina con ácido clavulánico la CIM es $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ (B). La CIM del aislamiento para ceftriaxona es 2 $\mu\text{g/mL}$ (C); en presencia de ácido clavulánico la CIM es $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ (D). Por lo tanto, en cada caso existe una reducción > 4 veces de la CIM en presencia de ácido clavulánico, lo que demuestra la presencia de una β -lactamasa de espectro ampliado.

Sin embargo, cuando la resistencia es inducible puede existir una disociación entre los resultados. La resistencia a los macrólidos de 14 miembros y de 15 miembros, como la eritromicina, se induce más fácilmente que la resistencia a los macrólidos de 16 miembros y las lincosamidas, como la clindamicina. Existen pruebas de que la resistencia inducible a la clindamicina tiene importancia clínica.^{237,288} Cuando una cepa de *S. aureus* expresa resistencia disociada, se debe realizar una prueba de inducción antes de que se comunique una prueba como sensible a la clindamicina. El método más simple es aprovechar

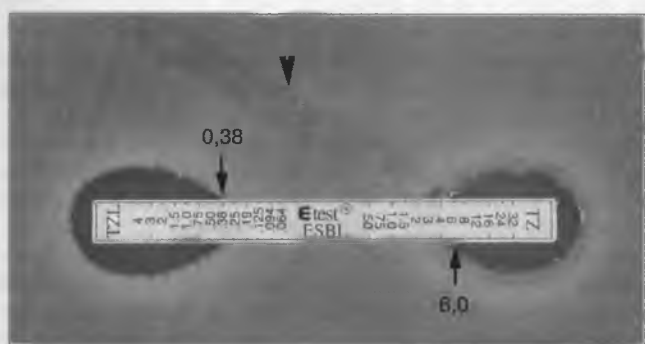


Figura 17-28 Banda de Etest para la demostración de producción de β -lactamasa de espectro ampliado en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*. La CIM del aislamiento para ceftazidima (TZ) es de 6 $\mu\text{g/mL}$. (Obsérvese que la zona de inhibición interseca la banda más próxima a los 4 $\mu\text{g/mL}$ del lado inferior, pero la intersección es en los 6 $\mu\text{g/mL}$ del lado superior; se registra el valor más alto). En el otro extremo de la banda la CIM del aislamiento para ceftazidima en presencia de ácido clavulánico es de 0,38 $\mu\text{g/mL}$. La reducción de la CIM es > 4 veces, lo que indica la presencia de una enzima β -lactamasa de espectro ampliado en la cepa. Obsérvese la impresión sobre el césped de bacterias de la banda (punta de flecha), que inicialmente se dejó caer de arriba hacia abajo sobre la placa; como el lado que estaba impregnado con antibiótico no tocó el agar, era aceptable recolocar la banda y continuar la prueba.

A AUTONOMÍA B ANTAGONISMO

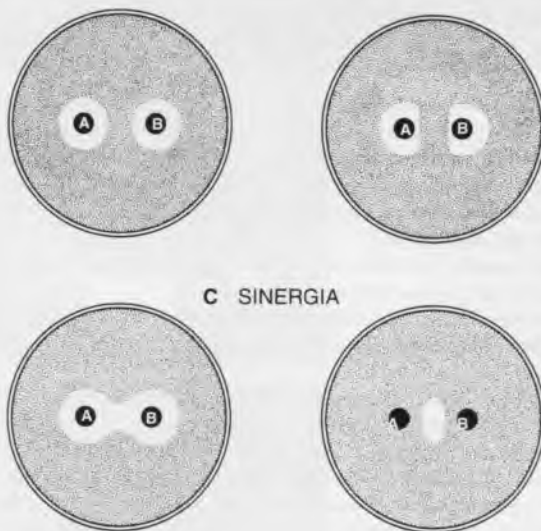


Figura 17-29 Diagrama de las interacciones potenciales en la prueba por difusión con discos para la sinergia bacteriana. Se han colocado los discos que contienen antibióticos A y B en placas de agar de Mueller-Hinton que han sido inoculadas con un aislamiento bacteriano. (A) Efectos aditivos o indiferentes: cada antibiótico produce una zona de inhibición que no es afectada por el antibiótico adyacente. (B) Efectos antagonistas, en los cuales las zonas inhibitorias de cada antibiótico están disminuidas en presencia del otro antibiótico. (C) Dos manifestaciones posibles de interacciones sinérgicas. A la izquierda, aparece una zona de inhibición agrandada donde se encuentran los dos antibióticos. A la derecha, ninguno de los antibióticos es inhibitorio por sí solo, pero el crecimiento bacteriano está inhibido donde los dos antibióticos se difunden juntos.

la tendencia de la eritromicina a inducir resistencia al realizar una prueba de doble disco.^{86,237} Si se colocan discos que contienen eritromicina y clindamicina en proximidad y la eritromicina induce resistencia, se distorsiona la zona de inhibición que rodea al disco de clindamicina. El aplanamiento resultante de la zona de inhibición produce una forma en D que es similar a la producida por los antibióticos antagonistas en la figura

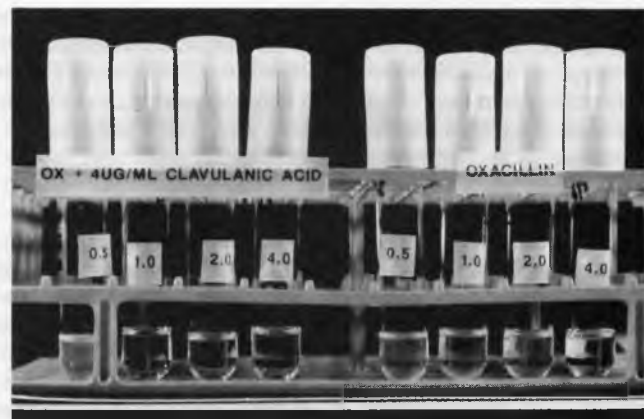


Figura 17-30 Se ha evaluado un aislamiento de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad limítrofe a la oxacilina con el agregado de ácido clavulánico, un inhibidor de la β -lactamasa, o sin él. En ausencia del inhibidor, la CIM de la cepa es de 4 $\mu\text{g/mL}$. Después del agregado de ácido clavulánico la CIM es de 1 $\mu\text{g/mL}$. La resistencia de esta cepa deriva de la hiperproducción de β -lactamasa.

Recuadro 17-8 Aumento al máximo de la detección de estafilococos resistentes a la meticilina

1. Para *S. aureus*, es más probable que la oxacilina detecte resistencia cruzada entre las penicilinas resistentes a la penicilinas que otros compuestos. No se debe utilizar cloxacilina ni dicloxacilina, porque es posible que no detecten resistencia a la oxacilina.²¹⁷ Coudron y cols. han sugerido que la meticilina puede detectar resistencia en *S. epidermidis* mejor que la oxacilina.⁴⁹
2. El agregado de NaCl al 2% al caldo o el agar para las pruebas de dilución aumenta la detección de resistencia.²¹⁸
3. El inóculo debe ser preparado por el método directo alternativo, utilizando colonias de una placa fresca durante toda la noche (véase protocolo 17-1).
4. Los cultivos deben ser incubados a 35 °C durante 24 horas completas.
5. Si se utiliza el procedimiento de difusión con discos, se debe examinar con cuidado el borde de la zona aparente de inhibición. El borde es definido y claro cuando se evalúan microorganismos sensibles a la oxacilina. El crecimiento de microorganismos resistentes a la oxacilina "se vuelve horizontal" o "se va apagando" a medida que se aproxima al disco de modo que puede ser difícil detectar el borde interior de crecimiento (fig. 17-31).
6. Si la sensibilidad de una cepa de *S. aureus* a la oxacilina no es clara, realizar una prueba para el gen *mecA* (véase el texto) o una prueba de detección en agar con oxacilina-sales. Para la prueba de detección, utilizar agar de Mueller-Hinton con NaCl v/v al 4% y 6 µg/mL de oxacilina por mililitro. Realizar una suspensión directa de las colonias hasta una densidad comparable a un estándar de McFarland 0.5. Utilizando un ansa de 1 µL, colocar la suspensión en un área que tenga 10 a 1 mm de diámetro. Como alternativa, realizar una mancha en un área similar o sembrar en estría un cuadrante con un hisopo que ha sido sumergido en la suspensión. Incubar la placa a 35 °C en aire ambiente durante 24 horas. Examinar con luz transmitida para > 1 colonias o una película clara de crecimiento.²¹⁸

17-29B. Este patrón indica una resistencia inducible; la cepa debe ser comunicada como resistente a la clindamicina. En ausencia de resistencia –ya sea intrínseca o inducible– la cepa puede ser comunicada como sensible a la clindamicina.

Aunque la mayor parte de la atención se ha concentrado sobre los estafilococos, también puede hallarse resistencia inducible a la clindamicina en los estreptococos y, más rara vez, los enterococos. Al parecer, la prueba del disco doble detecta este fenómeno en los estreptococos y en los estafilococos. (Véase la explicación de un caso de infección por estreptococos del grupo B en el sitio web de los CDC –https://www.phppo.cdc.gov/dls/master/view_document.aspx?id=2).

FLUOROQUINOLONAS

Las fluoroquinolonas, que al principio constituyeron una alternativa terapéutica potencialmente importante para los estafilococos resistentes a la meticilina, se hallan cada vez más comprometidas por la resistencia creciente. Operan dos mecanismos: 1) una mutación en la girasa que es el sitio diana de esta clase de antibióticos¹⁰⁹ y 2) una bomba de salida activa de sodio mediada por NorA, una proteína transportadora de múltiples fármacos.²²³ La resistencia a las fluoroquinolonas es más frecuente en las cepas resistentes a la meticilina (oxacilina) que en las cepas sensibles; se puede desarrollar con una rapidez preocupante cuando se utiliza esta clase de antibiótico sin restricción en los hospitales.⁵

Especies de *Haemophilus*

Los microorganismos *Haemophilus* requieren hemina (factor X) o nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (factor V) para el crecimiento. Se ha establecido la validez de agregar suplementos tanto a los medios de sensibilidad por dilución como de difusión. Jorgensen y cols. han sugerido un suplemento para las pruebas de sensibilidad de *Haemophilus*.¹⁵⁴ El NCCLS ha adoptado el medio de prueba para *Haemophilus*, que puede contener suplemento de cationes si fuera apropiado. Las ventajas del medio incluyen claridad visual y confiabilidad de las pruebas con trimetoprim-sulfametoxazol.¹⁵⁴ Sin embargo, algunos investigadores han experimentado problemas con el rendimiento del medio de prueba para *Haemophilus* tanto de preparación local como comercial.²⁰³

La preparación correcta del inóculo es muy importante para evaluar las especies de *Haemophilus*. Se debe utilizar el método directo alternativo para estandarizar la suspensión bacteriana de un cultivo durante toda la noche (véase protocolo 17-1).

Jorgensen y cols. encontraron una buena relación entre el Etest y las pruebas estandarizadas de microdilución para *Haemophilus influenzae*.¹ Un estudio reciente de métodos de examen de la sensibilidad para *H. influenzae* documentó un rendimiento generalmente aceptable entre los métodos de uso frecuente.¹⁰² Los procedimientos y las interpretaciones creados para *H. influenzae* pueden aplicarse también a otras especies de *Haemophilus*.^{150,151}

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *H. influenzae* han sido revisadas por Doern y Jones.⁶⁴

PENICILINAS

Doern y cols. documentaron una prevalencia del 15,2% para la producción de β-lactamasas en *Haemophilus influenzae*. La frecuencia de la degradación enzimática de ampicilina fue del 21% para las cepas encapsuladas de *H. influenzae* tipo b y del 12% para las cepas no encapsuladas de *H. influenzae*.^{64,66} La probabilidad de que una bacteria aislada produjera β-lactamasa era mayor si era aislada en lactantes y niños pequeños que en adultos y si era aislada de sangre y líquido cefalorraquídeo más que en otros líquidos o tejidos.

La incidencia de producción de β-lactamasa en un estudio cooperativo nacional fue del 20%, pero otra vez hubo una dicotomía entre las cepas encapsuladas y no encapsuladas.⁶⁷ La prevalencia de la enzima β-lactamasa fue del 31,7% en las cepas tipo b y del 15,6% en las cepas no encapsuladas de *H. influenzae*. Se detectó resistencia a la ampicilina, no mediada por β-lactamasa, sólo en el 0,1% de las cepas.

Un estudio repetido un año más tarde, limitado a los aislamientos respiratorios, documentó una prevalencia del 16,5% para la producción de β-lactamasa por *H. influenzae*. La frecuencia de resistencia en las cepas tipo b encapsuladas y en cepas no encapsuladas fue del 29,5% y del 15%, respectivamente.¹⁴⁷

Todos los aislamientos de especies de *Haemophilus* que son agentes etiológicos de infecciones graves deben ser evaluados para producción de β-lactamasa, preferentemente con el procedimiento de la nitrocefina. Los aislamientos en sitios corporales estériles que no producen la enzima deben ser evaluados para resistencia intrínseca siempre que sea posible. Aunque la resistencia intrínseca ha sido rara, existen pruebas de diseminación clonal de estas cepas en algunos hospitales.¹⁵⁶ En cualquier caso, los aislamientos deben ser derivados a un laboratorio

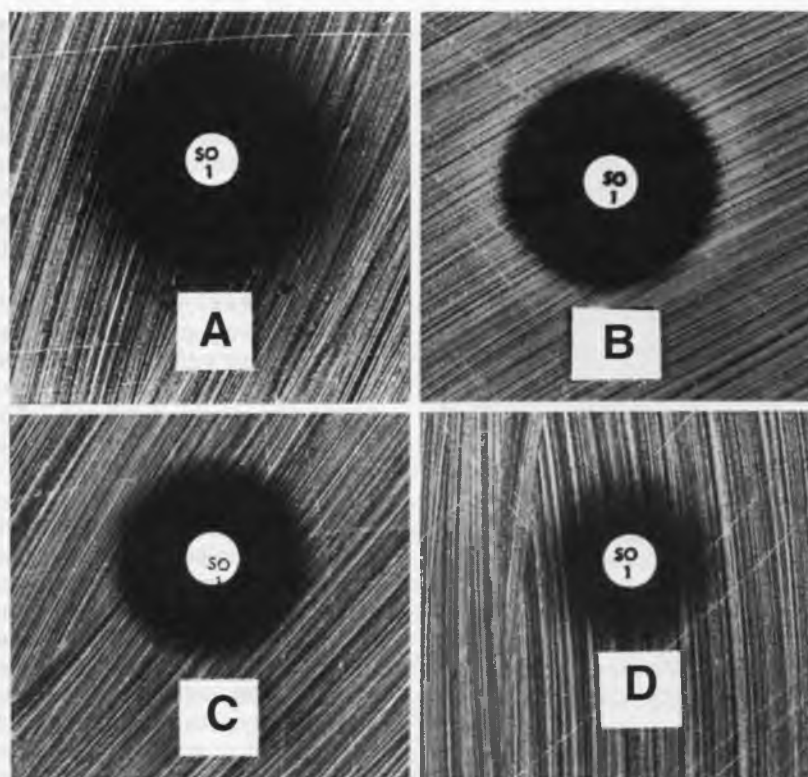


Figura 17-31 Se muestra el efecto de la sal sobre la expresión de resistencia de los estafilococos a la oxacilina. Se evaluó una cepa sensible contra un disco de oxacilina de 1 µg en agar de Mueller-Hinton que no tenía un suplemento de sal (A) o que contenía NaCl al 4% (B). La zona de inhibición bacteriana no fue afectada por el agregado de sal. También se evaluó una cepa resistente a la oxacilina en agar de Mueller-Hinton sin (C) el agregado de NaCl al 4% y con él (D). Sin sal, se produjo una zona clara de inhibición (C) y el aislamiento sería considerado sensible. En presencia de sal hubo un crecimiento gradualmente decreciente o “esfumado” inmediatamente arriba del disco; este microorganismo debe ser considerado resistente a la oxacilina y a otras penicilinas resistentes a la penicilinasas.

rio de referencia si existe alguna duda acerca de la correlación de los resultados del laboratorio y clínicos.

CLORANFENICOL

Durante años el fármaco de refuerzo para las infecciones graves por *Haemophilus* fue el cloranfenicol. Si bien es infrecuente, también se ha desarrollado resistencia a este antibiótico. La frecuencia de resistencia al cloranfenicol entre los aislamientos de *H. influenzae* fue del 0,5% en un estudio cooperativo nacional.⁶⁷ En casi todos los casos la resistencia está mediada por degradación enzimática.⁹⁷ Doern y cols. han hallado una prueba en tubo significativamente más precisa que una modificación en disco del ensayo rápido para la cloranfenicol acetiltransferasa.⁶²

CEFALOSPORINAS

Las cefalosporinas de primera generación son poco eficaces contra *Haemophilus influenzae* y no deben ser evaluadas. Las cefalosporinas de segunda generación, como cefamandol y cefuroxima, son eficaces contra las especies de *Haemophilus* in vitro, pero lo son menos cuando se las necesita más: para las cepas que producen β-lactamasa.¹⁴⁸ Se describieron fracasos terapéuticos con las cefalosporinas de segunda generación. Las cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona, son uniformemente eficaces contra *H. influenzae*.

TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

Se puede detectar resistencia de *Haemophilus influenzae* a trimetoprim-sulfametoxazol en menos del 1% de las cepas.¹⁴⁷ Aunque no es el fármaco de elección para la enfermedad sistémica grave, el tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol ha sido exitoso para las infecciones pulmonares.

Streptococcus pneumoniae

PENICILINA Y OTROS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS

Durante muchos años, la penicilina fue el tratamiento estándar para las infecciones neumocócicas y las pruebas de sensibilidad no estaban indicadas. El surgimiento de cepas que son resistentes a múltiples antibióticos, incluida la penicilina, ha abierto una brecha incluso en este bastión de la antibioticoterapia. Las cepas que tienen CIM entre 0,1 y 1 µg/mL se consideran relativamente resistentes a la penicilina; aquellas con CIM mayores de 1 µg/mL son designadas como resistentes. Lamentablemente, la frecuencia de cepas que son relativa o totalmente resistentes a la penicilina está aumentando en los Estados Unidos.^{63,319,344} Sin embargo, sigue existiendo variación geográfica en la frecuencia de la resistencia.³¹⁹ Parte de esta razón para esta distribución geográfica irregular puede ser la aparente diseminación de una pequeña cantidad de clones neumocócicos resistentes.²⁷⁰

El mecanismo de la resistencia del neumococo a la penicilina es la alteración en las proteínas de unión a penicilina.⁴² *Streptococcus pneumoniae* no produce β-lactamasas. Diver-

Recuadro 17-9 Detección de resistencia a la vancomicina en los estafilococos

1. Los métodos cuantitativos (CIM) han sido validados por los CDC para la detección de *S. aureus* de sensibilidad intermedia a la vancomicina y *S. aureus* resistente a la vancomicina. Se evaluaron tanto los métodos de microdilución como de dilución en agar. Los sistemas comerciales estudiados incluyeron paneles para CIM MicroScan Conventional (Dade MicroScan, West Sacramento, CA), los sistemas Vitek y Vitek 2 (BioMérieux, Hazelwood, MO), Sensititer System (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH), los paneles Pasco Microdilution (BD, Franklin Lakes, NJ) y el Etest utilizando un estándar de McFarland 0.5 para preparar la suspensión del inóculo (AB Biodisk, Piscataway, NJ). Algunos sistemas automáticos no pudieron detectar todas las cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina, de modo que se recomienda realizar pruebas adicionales con una placa para detección sistemática en agar.
2. La prueba de detección sistemática en agar con vancomicina utiliza infusión de cerebro y corazón que contiene 6 µg/mL de vancomicina. Se siembra en estría o se realiza una mancha con un inóculo de 1 a 10 µL de una suspensión de McFarland 0.5 (concentración final de las bacterias, 10^5 a 10^6 UFC/mL) en la superficie del agar. El crecimiento de más de 1 colonia después de una incubación durante 24 horas indica resistencia. Las cepas control, que se deben utilizar en cada día de la prueba, son *S. aureus* (ATCC 25923, sensibles) y *E. faecalis* (ATCC 51299, resistentes).
3. Se ha acumulado una cantidad insuficiente de cepas no sensibles para establecer los tamaños de las zonas puntos de corte para la prueba por difusión en disco. Una zona de al menos 15 mm se considera sensible; si las zonas son más pequeñas, se debe realizar una prueba de dilución o se debe enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia.
4. Los aislamientos con una CIM de 4 µg/mL u 8 µg/mL (*S. aureus* de sensibilidad intermedia a vancomicina o de sensibilidad intermedia a otros glucopéptidos) no son detectados en forma confiable por la prueba por difusión con discos. Por lo tanto, si se utiliza este método, se debe emplear un procedimiento adicional, como la prueba de detección en agar con vancomicina. Las pruebas se deben realizar en todos los aislamientos; como alternativa, se pueden seleccionar cepas que son resistentes a la oxacilina, ya que la mayoría de las cepas que son resistentes a la vancomicina también son resistentes a la oxacilina.
5. Las placas o las bandejas para la determinación de sensibilidad a la vancomicina en los estafilococos deben ser incubadas en aire ambiente durante 24 horas completas a 37 °C.
6. Las cepas de estafilococos que parecen tener una sensibilidad intermedia o ser resistentes a la vancomicina deben ser derivadas a un laboratorio de referencia o a un laboratorio de salud pública para otros análisis.

Referencia hallada en <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/lab/FactSheet/vrsa.htm>.

sas proteínas de unión participan en la adquisición de resistencia y producen una disminución escalonada de la sensibilidad. Es interesante señalar que el 70% de las cepas clínicas de neumococos resistentes a la penicilina muestran, además, una lisis defectuosa, propiedad que también aumentaría su supervivencia.²⁰⁸ Se postulan dos tipos de presión de los antibióticos sobre los neumococos como explicaciones para los fenómenos concordantes. Las cepas de neumococos resistentes a la penicilina pueden ser clonales, pero son posibles múltiples vías para la resistencia y han surgido cepas resistentes en forma independiente en diversas localizaciones geográficas. La resistencia a la penicilina puede ser transferida horizontalmente de una cepa de neumococo a otra, al parecer por

transformación.¹⁸⁹ Ocurre una variación considerable en los genes para las proteínas alteradas a partir de la reparación desequilibrada después de la transferencia. La resistencia a la penicilina ocurre con distintos serogrupos y entre diversas cepas que pueden ser diferenciadas mediante tipificación molecular,⁷⁴ pero parece que relativamente pocos clones constituyen la fuente dominante de cepas multirresistentes.²⁷⁰ Lamentablemente, muchas de las cepas resistentes pertenecen a serotipos que están incluidos en las vacunas neumocócicas de uso frecuente.¹³⁰

Los factores de riesgo para una infección grave por cepas resistentes incluyen el uso previo de antibióticos β-lactámicos, la edad inferior a 15 años, la infección de las vías respiratorias altas y el origen hospitalario de la infección.¹⁵ Además, la frecuencia con la cual se utilizan antibióticos β-lactámicos en la comunidad puede tener un efecto sobre la aparición de cepas neumocócicas resistentes.^{98,58}

Los neumococos resistentes a la penicilina también tienen menor sensibilidad a otros antibióticos β-lactámicos.¹⁷⁷ Imipenem, meropenem, cefotaxima, ceftriaxona y cefpirona son más activos in vitro que la penicilina. Ampicilina, cefdinir, cefuroxima, cefoperazona, azlocilina, mezlocilina, piperacilina, cefalotina y cefamandol muestran ligeramente menos actividad que la penicilina. Oxacilina, cefixima, ceftizoxima, cefetamet, cefaclor, ceftazidima, cefoxitina, cefonicid y latamoxef muestran muy poca actividad contra las cepas resistentes. Se ha sugerido que se puede utilizar la penicilina para predecir la sensibilidad a otros antibióticos β-lactámicos, porque las relaciones de las concentraciones inhibitorias mínimas son constantes.^{28,58} El mecanismo para la resistencia a estos otros antibióticos β-lactámicos también es una alteración en las proteínas de unión a penicilina.²¹⁰

Se puede agregar sangre de carnero al 5% al agar de Mueller-Hinton y sangre de caballo hemolizada al 2-5% a los medios de caldo para el crecimiento de *S. pneumoniae*. El control de calidad de estas pruebas debe incluir cepas neumocócicas resistentes conocidas, además de los microorganismos de control estándares. La incubación en CO₂ es aceptable si es necesaria para el crecimiento de la cepa. Se ha comunicado que el medio de prueba de *Haemophilus* descrito antes funciona bien para el apoyo del crecimiento de neumococos en pruebas de microdilución en caldo,¹⁵² aunque no ha funcionado bien en todos los laboratorios.

En la mayoría de los laboratorios, la prueba más simple para la detección de resistencia es una variante de la prueba de difusión con discos. Aunque se han utilizado discos de penicilina en algunos estudios, el procedimiento recomendado por el NCCLS para la detección de resistencia a la penicilina incorpora un disco de 1 µg de oxacilina. Las cepas que tienen un diámetro de la zona inferior o igual a 19 mm deben ser comunicadas provisoriamente como no sensibles a la penicilina (fig. 17-32); se debe disponer la confirmación mediante una prueba de sensibilidad por dilución. Swenson y cols. observaron que la oxacilina era mejor elemento de predicción de la sensibilidad a la penicilina que la meticilina.³⁰² La prueba de difusión con discos no diferencia las cepas que son relativamente resistentes (CIM, 0.1 a 1 µg/mL) de las que son resistentes (CIM, ≥ 2 µg/mL). Una cepa de *S. pneumoniae* que presumiblemente es resistente a la penicilina debe ser evaluada en una prueba de dilución en caldo confiable.

Los sistemas comerciales de pruebas de sensibilidad tienen un rendimiento variable para la detección de resistencia a la penicilina en los neumococos. El sistema Pasco y el Etest funcionaron mejor y produjeron resultados que fueron compara-

bles con los métodos de referencia para todos los antibióticos excepto para la combinación de Etest y trimetoprim-sulfametoxazol. Otros sistemas, que incluyen los paneles rápidos MicroScan, no resultaron tan buenos o su rendimiento fue escaso.³⁰⁹ Sin embargo, las evaluaciones ulteriores han documentado el mejor rendimiento de varios de los sistemas, incluidos los paneles MicroScan MICroSTREP[®].^{113,153}

El Etest ha sido evaluado en forma independiente en un estudio cooperativo, el cual documentó tasas bajas de errores menores con penicilina (9,5%) y cefotaxima (5,4%) (véase fig. 17-25).¹⁴⁹ La vancomicina es el tratamiento estándar para las cepas que producen una infección sistémica grave. Hashemi y cols. han observado que el Etest produce resultados más altos en la CIM que la prueba de microdilución en caldo, lo que plantea la preocupación de que puedan ocurrir informes de falsa resistencia.¹²⁰

Aunque las cepas relativamente resistentes han respondido al tratamiento penicilínico en la neumonía neumocócica,⁸⁷ es posible que la meningitis no sea tratada con éxito porque las concentraciones del antibiótico son más bajas en el líquido cefalorraquídeo.²³⁸ Las cepas que tienen una CIM mayor de 4 µg/mL es improbable que respondan al tratamiento con penicilina en cualquier situación clínica. El NCCLS tiene valores críticos diferenciados para cefalosporinas potencialmente eficaces, según que las cepas sean aisladas en el líquido cefalorraquídeo o en otros sitios.^{217,218}

RESISTENCIA MÚLTIPLE

Lamentablemente, muchas de las cepas neumocócicas que son resistentes a los antibióticos β-lactámicos también lo son a otras clases de antibióticos (cepas multirresistentes).^{63,319} Se han afectado macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y, en menor grado, fluoroquinolonas.^{167,339}

MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS

La resistencia de *S. pneumoniae* a los macrólidos ha ido aumentando durante muchos años. Se ha documentado una asociación entre la resistencia a los antibióticos y el uso de antibióticos.^{98,254} Existen dos clases de mecanismos de resistencia: 1) inactivación del antibiótico a nivel ribosómico por una metilasa (Erm) y 2) bombeado activo del antibiótico fuera de la célula bacteriana por un sistema de expulsión (Mef).²⁸⁷ La bomba de expulsión es el mecanismo más frecuente en las cepas aisladas en los Estados Unidos.²⁸⁷ La resistencia producida por este mecanismo es menos extensa que la producida por la inactivación ribosómica; además, las cepas ribosómicamente resistentes expresan también a menudo resistencia a la clindamicina.¹³⁵ Varios investigadores describieron pruebas en doble disco para evaluar la resistencia inducible a la clindamicina en cepas neumocócicas.^{207,330} Como sucede en el caso de los estafilococos, las cepas de neumococos que muestran resistencia inducible a la clindamicina deben ser comunicadas como resistentes; las cepas que carecen tanto de resistencia intrínseca como inducible a la clindamicina pueden ser comunicadas como sensibles.

La resistencia a otros macrólidos puede ser inferida a partir del resultado de la eritromicina.²¹⁸ Se ha sugerido que es posible que el nivel inferior de resistencia a la eritromicina conferido por el mecanismo Mef no tenga importancia clínica, pero varias comunicaciones han documentado fracasos terapéuticos con estas cepas.^{138,185}



Figura 17-32 Prueba de detección para resistencia de neumococos a penicilina, que utiliza un disco de oxacilina de 1 µg en agar de Mueller-Hinton con sangre de carnero. Una cepa sensible (A) muestra una zona grande de inhibición y puede ser comunicada como sensible sin otras pruebas. La segunda cepa (B) demuestra una zona muy pequeña de inhibición. Esta cepa podría ser sensible, intermedia o resistente (aunque la zona muy pequeña sugiere que no será sensible). Para determinar la interpretación correcta, se debe realizar una prueba de CIM.

Neisseria gonorrhoeae

Durante muchos años el gonococo fue uniformemente sensible a la penicilina y el enfoque terapéutico de la infección gonocócica era bastante sencillo. A mediados de la década de 1970 aparecieron cepas de *Neisseria gonorrhoeae* que producían β-lactamasa⁷⁸ y se propagaron con rapidez.²⁸⁹ Esta β-lactamasa se asemeja a la enzima TEM hallada en los bacilos entéricos y *Haemophilus influenzae*. Un segundo mecanismo de resistencia apareció algunos años más tarde cuando Dougherty y cols. describieron cepas resistentes que carecían de β-lactamasa pero contenían proteínas de unión a penicilina alteradas.⁷² Estas cepas han causado infección epidémica y esporádica.⁸²

Una segunda arma en el arsenal antigonocócico fue eliminada cuando apareció un plásmido que mediaba la resistencia de alto nivel a la tetraciclina en *N. gonorrhoeae*.⁶⁸ Se ha documentado resistencia a las quinolonas en muchas áreas y también se ha desarrollado resistencia a la azitromicina.^{40,305}

Las pruebas recomendadas por el NCCLS para la detección de la resistencia mediada cromosómicamente en *N. gonorrhoeae* son las pruebas de dilución en agar y de difusión en agar. El tema ha sido revisado por Doern y Jones.⁶⁴ El medio recomendado para las pruebas de dilución en agar es agar GC con el agregado después del tratamiento con autoclave de un suplemento para el crecimiento definido al 1% (1,1 g de L-cisteína, 0,03 g de HCl de guanina, 3 mg de HCl de tiamina, 13 mg de ácido para-aminobenzoico [PABA], 0,01 g de vitamina B₁₂, 0,1 g de coarboxilasa, 0,25 g de NAD, 1 g de adenina, 10 g de L-glutamina, 100 g de glucosa, 0,02 g de nitrato férrico en 1 L de H₂O). Se debe omitir la cisteína cuando se evalúan carba-penémicos o clavulanato.²¹⁹

Las pruebas de difusión en agar se realizan en una base de agar GC con el agregado de suplemento de crecimiento definido. No se necesita un medio sin cisteína para las pruebas en disco; no se recomienda el agar chocolate enriquecido.²²⁰ Las placas de sensibilidad para evaluar *N. gonorrhoeae* deben ser incubadas a 35 °C en CO₂. Una zona menor o igual a 26 mm en la prueba por difusión con discos para penicilina (disco de 10 µg) indica resistencia. Un tamaño de la zona menor o igual a

19 mm suele indicar la producción de β -lactamasa, pero se prefiere la prueba de la β -lactamasa para evaluar este mecanismo de resistencia. El NCCLS ha establecido criterios para la interpretación de espectinomicina y tetraciclina. Un aislamiento con un tamaño de la zona menor o igual a 19 mm alrededor de un disco de 30 μ g de tetraciclina es probable que tenga un mecanismo de resistencia mediado por plásmidos; estas cepas deben ser evaluadas con una prueba de dilución. No ha habido cepas gonocócicas resistentes a ciertas cefalosporinas, de modo que no se ha establecido el valor crítico de resistencia.²²⁰

Todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* deben ser evaluados para la producción de β -lactamasas, preferentemente utilizando el método de nitrocefina. Se deben realizar pruebas por dilución en agar o por difusión con discos en los aislamientos β -lactamasa negativos si la frecuencia de resistencia intrínseca a la penicilina o la prevalencia de resistencia a las tetraciclinas en la población es alta. Cualquier cepa aislada en fracasos terapéuticos debe ser evaluada localmente o derivada a un laboratorio de referencia. El Etest ha mostrado buena correlación con las técnicas por dilución en agar para las cepas no productoras de β -lactamasa,³²⁸ pero es posible que no se detecte resistencia en las cepas que producen β -lactamasa,³⁴⁷ lo que destaca la necesidad de realizar una prueba para la producción de β -lactamasa en todas las cepas.

Neisseria meningitidis

Se ha documentado la transferencia mediada por plásmidos de β -lactamasa a *Neisseria meningitidis*.⁵⁹ Además, se describieron cepas que son resistentes sobre la base de una alteración de las proteínas de unión a penicilina.³⁴⁹ Al parecer, las proteínas de membrana alteradas fueron transferidas a *N. meningitidis* desde especies comensales de *Neisseria*.²³ Se ha evaluado el Etest para el examen de *N. meningitidis* con resultados mixtos. Pascual y cols. han comunicado que este método exagera el grado de resistencia y sugieren que es necesaria una nueva evaluación de medios adecuados.²⁴⁰ Sin embargo, Marshall y cols. observaron una buena relación entre el Etest y los métodos de referencia, utilizando los criterios de la Food and Drug Administration.¹⁹² Las pruebas por difusión con discos no han resultado fiables para el examen de este microorganismo.^{22,220}

En ocasiones, se solicitan pruebas de sensibilidad de los meningococos a la rifampicina con fines epidemiológicos.²²² A menudo es difícil para el laboratorio generar un resultado a tiempo como para guiar la profilaxis, que debe comenzar en el momento en que se hace el diagnóstico clínico de la infección meningocócica.

Especies de *Enterococcus*

La base del tratamiento antibiótico de las infecciones enterocócicas graves ha sido el uso de combinaciones de β -lactámicos y aminoglucósidos.^{131,323} Las bases de este enfoque han sido socavadas seriamente en los últimos años.¹⁸⁷ El tema ha sido revisado por varios autores.^{124,174,276} En la figura 17-10 se muestran las interacciones entre antibióticos y mecanismos de resistencia. Más recientemente, también se ha detectado resistencia en los "antibióticos de último recurso", sobre todo en cepas de *E. faecium*.¹³⁴ Se han aplicado procedimientos estándares a los enterococos con éxito, aunque ocurrieron algunas dificultades con algunos antibióticos cuando se utilizaron pruebas de difusión con discos.⁴⁸ Los fabricantes han encarado rápidamente los problemas con los sistemas comerciales.

ANTIBIÓTICOS AMINOGLUCÓSIDOS

Existen tres mecanismos para la resistencia de los enterococos a los aminoglucósidos. Las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, que incluyen fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas y una acetiltransferasa, son producidas en forma constitutiva sobre los plásmidos.¹⁷⁴ Estas enzimas se asemejan a las halladas en los estafilococos más que a las producidas en los bacilos gramnegativos. Otros mecanismos son la modificación del sitio diana ribosómico⁷⁷ y la interferencia en el transporte del antibiótico. Existen pruebas de la transmisión de las cepas que son resistentes a la gentamicina de animales a seres humanos a través de suministro de alimentos.⁷¹

La detección de resistencia de alto nivel de los enterococos a los aminoglucósidos es importante porque estas cepas no son inhibidas en forma sinérgica por el tratamiento combinado con los antibióticos β -lactámicos. Se puede aceptar la resistencia de *E. faecium* a kanamicina, amikacina, netilmicina y tobramicina. La resistencia de estas especies a gentamicina y estreptomycinina y de *E. faecalis* a todos los aminoglucósidos se puede predecir mediante pruebas in vitro con grandes concentraciones de antibiótico en una prueba de dilución o mediante discos con un alto contenido de antibiótico. Se recomiendan como puntos de corte concentraciones de 1 000 μ g/mL de estreptomycinina por microdilución, 2 000 μ g/mL de estreptomycinina por dilución en agar y 500 μ g/mL de gentamicina por cualquiera de los métodos.^{218,301} El crecimiento de una sola colonia en placas de dilución en agar indica resistencia. Se recomiendan discos con 120 μ g de gentamicina o 300 μ g de estreptomycinina para las pruebas de difusión con discos. La resistencia está indicada por ≤ 6 mm (sin zona) y la sensibilidad por una zona ≥ 10 mm. Las cepas que presentan zonas de 7 a 9 mm deben ser evaluadas por métodos de dilución.²²⁰ Los problemas con la detección de esta resistencia por los sistemas comerciales de sensibilidad han sido encarados por los fabricantes. Un estudio reciente observó una concordancia casi completa entre los discos de alta potencia, los paneles de microdilución disponibles en el comercio y una placa comercial de "sinergia" por dilución en agar.²¹¹

ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Muchas cepas de enterococos, sobre todo *Enterococcus faecium*, son intrínsecamente resistentes a los antibióticos β -lactámicos porque tienen proteínas de unión con baja afinidad por estos fármacos. En particular, las cefalosporinas son uniformemente ineficaces contra los enterococos y no deben ser evaluadas. En general, la ampicilina es más eficaz que la penicilina in vitro. Al menos en un estudio las cepas de *E. faecium* que eran resistentes a la ampicilina fueron distintas por análisis molecular de las cepas sensibles.¹⁵⁵ Se ha explicado antes la aparición reciente de cepas de enterococos que producen β -lactamasa.

VANCOMICINA

El último recurso terapéutico para los enterococos fue la vancomicina hasta que Leclercq y cols. describieron cepas de *E. faecium* que contenían resistencia mediada por plásmidos a los antibióticos glucopéptidos vancomicina y teicoplanina.¹⁷³ También describieron aislamientos de *E. faecalis* resistentes a la vancomicina.²²⁴ La resistencia a los glucopéptidos parece ser transferida por la disseminación de un gen más que por un plásmido.⁷⁵ Se describieron tres mecanismos genéticos para la resistencia de los enterococos a los glucopéptidos.²⁷⁶ El com-

plejo genético *vanA* es inducible y es portado por una familia de plásmidos en *E. faecium* y *E. faecalis*. Este complejo codifica resistencia de alto nivel tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. *VanB* es un gen inducible en *E. faecium* que media la resistencia de bajo nivel sólo a la vancomicina por medio de una carboxipeptidasa. *VanC* es un gen cromosómico constitutivo que media la resistencia de bajo nivel en *E. gallinarum*, una cepa clínica inusual. La resistencia a la vancomicina, sobre todo la mediada por el gen *vanB*, no es detectada confiablemente por todos los métodos.

Lamentablemente, la resistencia de los enterococos a la vancomicina se ha instalado y estos microorganismos se han vuelto epidémicos en algunos hospitales y regiones.^{95,209} Las características de las cepas resistentes varían con el tiempo y con la localización geográfica. En un grupo de hospitales de Connecticut, la tasa media de resistencia de alto nivel a la gentamicina fue del 29%; a la ampicilina del 10% (todas las cepas aisladas fueron *E. faecium*); y a vancomicina del 8%, pero ningún aislamiento produjo β -lactamasa.²⁴² Los enterococos son patógenos en entrenamiento comparados con los estafilococos y los estreptococos, pero pueden causar infecciones graves y potencialmente mortales en los pacientes hospitalizados cuyas heces están colonizadas por cepas resistentes. Los factores de riesgo para la colonización y la enfermedad invasora incluyen enfermedad grave y recepción previa de antibióticos, como vancomicina y fármacos activos contra bacterias anaerobias.³⁷ La resistencia a la vancomicina en los enterococos ha sido asociada con episodios más frecuentes de bacteriemia recurrente, el aislamiento persistente de enterococos de sitios primarios de infección, una mayor frecuencia de infección endovascular y un aumento de la mortalidad.¹⁷⁸

La detección de resistencia de los enterococos a la vancomicina, sobre todo del fenotipo *vanB*, en los laboratorios clínicos no es óptima, sobre todo porque los sistemas comerciales de evaluación, que incluyen los dos métodos más utilizados —sistemas Vitek y distintos sistemas MicroScan— no recogen con eficacia la resistencia de nivel moderado y nivel intermedio.³¹³ En un estudio de los laboratorios de New Jersey, 96% de 76 laboratorios clínicos pudieron reconocer la resistencia en una cepa de *E. faecium* con resistencia de alto nivel a la vancomicina (CIM, 512 $\mu\text{g/mL}$), pero sólo 27% de los laboratorios comunicaron una cepa de *E. faecium* con una resistencia moderada (CIM, 64 $\mu\text{g/mL}$) como resistente.³¹⁴ Una cepa de *E. faecalis* con resistencia de bajo nivel (CIM, 32 $\mu\text{g/mL}$), un fenotipo *vanB* típico, sólo fue reconocida como resistente por el 16% de los laboratorios, y una cepa de *E. gallinarum* con un fenotipo *vanC* típico (CIM, 8 $\mu\text{g/mL}$) fue caracterizada correctamente por el 74% de los participantes. En un estudio comparativo de los Centers for Disease Control and Prevention, Tenover y cols. evaluaron 10 sistemas comerciales para la detección de resistencia a la vancomicina en enterococos.³¹³ Se utilizó un método de referencia por microdilución como estándar para la evaluación de 50 cepas de referencia. Una prueba de detección por dilución en agar, el Etest, y algunos sistemas comerciales por microdilución rindieron bien. Se observó una mayor cantidad de errores menores con la prueba por difusión con discos y otros sistemas comerciales de microdilución. El sistema Vitek produjo tasas de errores muy altas (10,3%) y el sistema MicroScan Rapid 20,7% el cual fue el único que produjo errores mayores (13,3%). Con las pruebas repetidas con el Vitek los errores muy importantes se redujeron hasta el 3,4%, mientras que los errores con el sistema MicroScan Rapid aumentaron hasta el 27,6%. Un informe reciente confirma la capacidad de los paneles Positive Breakpoint Combo® Tipo 6 convenciona-

les de MicroScan para detectar resistencia entre los enterococos a la ampicilina y la vancomicina.¹³⁶ Catorce de los 15 resultados incorrectos con vancomicina fueron en enterococos móviles, que son aislados con menor frecuencia en infecciones graves que *E. faecium* y *E. faecalis*. No hubo ninguna cepa productora de β -lactamasa entre los 132 aislamientos estudiados. Los problemas iniciales con el sistema Vitek fueron corregidos con modificaciones del software, y el nuevo sistema Vitek 2 ha probado ser confiable.^{175,327}

Una versión comercial de la prueba de detección en agar, Remel Synergy Quad Plate®, se compara bien con la prueba de referencia.⁹³ Esta prueba incorpora 6 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina en agar infusión de cerebro y corazón, como lo recomiendan Swenson y cols.²⁹⁹

Se puede solicitar a los microbiólogos clínicos que examinen las heces para detectar enterococos resistentes a la vancomicina y determinen la prevalencia de microorganismos resistentes en una institución o para que señalen a los pacientes con mayor riesgo de sufrir una infección invasora por enterococos. Se han recomendado varios métodos. Barton y Doern observaron que el agar azuro de bilis-esculina con suplemento de 8 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina era un medio útil para el examen de detección.¹² Landman y cols. compararon cinco medios selectivos y observaron que el caldo Enterococcosel® (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ), con suplemento de 64 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina y 60 $\mu\text{g/mL}$ de aztreonam, era el método más sensible.¹⁷⁰ El uso de agar azuro de bilis-esculina con un disco de 30 μg de vancomicina fue menos sensible, pero sería fácil implementarlo en la mayoría de los laboratorios. Los hisopados rectales y perirrectales dan resultados equivalentes.³³⁶ Para los laboratorios que trabajan con técnicas moleculares, la amplificación de ácidos nucleicos provee un método más sensible que el cultivo para detectar colonización.²⁴³

Los factores de riesgo de la colonización por enterococos resistentes a la vancomicina son similares a aquellos para la adquisición de *Clostridium difficile*. En consecuencia, no es sorprendente que la detección de pacientes con toxina de *C. difficile* en sus deposiciones sea un procedimiento de vigilancia útil en la búsqueda de enterococos resistentes a la vancomicina en las heces.¹¹⁴ Este enfoque no reemplazará a la vigilancia sistemática, porque todos los pacientes colonizados no habrán sido evaluados para *C. difficile*.

Si se desea hacer el cribado de las cepas enterocócicas en las placas primarias para evaluar la resistencia a la vancomicina sin realizar pruebas de sensibilidad, se puede utilizar el agar CAMPY.²⁸⁶ Se deben evaluar medios provenientes de diferentes fabricantes y tal vez de distintos lotes para un rendimiento aceptable.

La batalla entre químicos y bacterias continúa. Se han creado nuevos agentes para el tratamiento de las bacterias grampositivas. Además de la teicoplanina (otro glucopéptido), se han introducido en el mercado la linezolid (un antibiótico oxazolidinónico) y la quinupristina-dalfopristina (una combinación de estreptograminas);⁷⁶ aunque la mayoría de las veces son eficaces contra los enterococos, comienzan a aparecer informes de resistencia. No sorprende que el mayor riesgo de adquisición de una cepa resistente a la linezolid se asocie con el uso del antibiótico y con la duración del tratamiento.²³⁶

El tema de la resistencia a la vancomicina en los enterococos ha sido revisado en forma amplia.^{41,103,212} Es importante recordar que las superficies inanimadas en el laboratorio de microbiología pueden estar contaminadas con bacterias resistentes, que incluyen enterococos resistentes a la vancomicina, al igual como lo están las superficies en las áreas clínicas.⁴⁷

Listeria monocytogenes

Las pruebas por microdilución en caldo pueden realizarse en caldo de Mueller-Hinton con suplemento de cationes con sangre de caballo hemolizada de 2-5%. *Listeria monocytogenes* proporciona un buen ejemplo de los cuidados necesarios al extrapolar los criterios del tamaño de zona en la prueba por difusión con discos a las bacterias que no han sido evaluadas. La prueba por difusión parece ser satisfactoria para la evaluación de *L. monocytogenes*, pero los participantes en programas de pruebas de eficiencia no determinaron en forma adecuada las sensibilidades a la penicilina y la ampicilina hasta que el NCCLS aclaró los tamaños de las zonas que se debían utilizar para establecer los puntos de corte.¹⁴⁴

Streptococcus pyogenes (Streptococcus β-hemolítico del grupo A) PENICILINA

En ocasiones, se solicita al laboratorio la realización de pruebas de sensibilidad a los antibióticos de un aislamiento de *Streptococcus* β-hemolítico del grupo A. Estas pruebas son adecuadas para fármacos alternativos, como eritromicina, si el paciente es alérgico a la penicilina. Los fracasos terapéuticos son el resultado de una penetración insuficiente del antibiótico en las criptas amigdalinas y el tejido adenoideo, donde las bacterias pueden ocultarse. En ausencia de resistencia documentada y sin un método estandarizado y validado para las pruebas, es mucho más probable que la realización de éstas produzca problemas a que los resuelva. Si se cree que están indicadas las pruebas, cualquier resultado de resistencia debe ser validado por un laboratorio de referencia.

Si las pruebas se realizan mediante el procedimiento de difusión con discos, se pueden utilizar discos de penicilina o de ampicilina para predecir la sensibilidad; no se recomienda el uso de discos de oxacilina, como para los neumococos.²²⁰

ERITROMICINA

Aunque la penicilina sigue siendo uniformemente eficaz,²⁶³ la resistencia global a la eritromicina y la tetraciclina ha aumentado en forma constante.^{18,133} La resistencia a la eritromicina está mediada tanto por el fenotipo de macrólido M (un mecanismo de expulsión)¹⁸ como por un mecanismo recién descrito, denominado tipo fenómeno NR (también un mecanismo de expulsión).¹⁵⁸ Menos a menudo el mecanismo MLS_B fue responsable de la resistencia. En una serie de 573 cepas de Suecia se observó el fenotipo NR en el 82%; un fenotipo MLS_B inducible, en el 17% y un fenotipo MLS_B constitutivo, en el 0,4%.¹⁵⁸ Las cepas que contienen un mecanismo MLS_B inducible y son sensibles a la clindamicina pueden ser evaluadas mediante la prueba del doble disco (prueba D), como se describe para los estafilococos (antes en este capítulo). Si no se documenta resistencia intrínseca ni inducible, la cepa puede ser comunicada como sensible a la clindamicina.

Existen muchos clones diferentes de cepas que son resistentes a la eritromicina y no están limitadas a localizaciones geográficas específicas.^{157,159} La probabilidad de resistencia a la eritromicina en las cepas aisladas en niños con faringitis está inversamente relacionada con la edad del paciente.²⁸⁵

FLUOROQUINOLONAS

Además, se describieron aislamientos con resistencia elevada a las fluoroquinolonas.²⁶⁹ Por lo tanto, en los pacientes que son alérgicos a la penicilina, la elección terapéutica puede vol-

verse cada vez más limitada. No se describió resistencia a la vancomicina.

Streptococcus agalactiae (Streptococcus β-hemolítico del grupo B)

Como sucede en el caso de *Streptococcus pyogenes*, no se ha demostrado una sensibilidad reducida a la penicilina,²⁶³ pero existe resistencia a los macrólidos. El mecanismo más frecuente de resistencia es mediante una metilasa ribosómica (ermA o ermB), pero una minoría de cepas pueden expresar resistencia a través de un mecanismo de expulsión activa, ya sea aislado o combinado con la metilasa.^{54,57} No se describió resistencia a la vancomicina.

Si se realizan pruebas mediante el procedimiento de difusión con discos, se pueden utilizar discos de penicilina o de ampicilina para predecir la sensibilidad; no se recomienda el uso de discos de oxacilina, como para los neumococos.²²⁰

Se ha recomendado adosar un comentario al informe cuando se aísla *S. agalactiae* en sitios de importancia clínica (que incluyen cultivos rectovaginales en mujeres embarazadas) para indicar que se puede aceptar sensibilidad a los antibióticos β-lactámicos, pero que el laboratorio debe ser consultado para el examen de eritromicina o de clindamicina si el paciente presenta una alergia grave a la penicilina. Como sucede con los estafilococos y otros estreptococos, algunas cepas pueden tener resistencia inducible a la clindamicina. En este caso se debe realizar una prueba de inducción.

Streptococcus viridans

Aunque son patógenos menos frecuentes que los neumococos, los estreptococos viridans causan endocarditis y otras infecciones graves. Las alteraciones en las proteínas de unión a penicilina han producido resistencia a múltiples antibióticos β-lactámicos entre varias de las especies, entre ellas *S. mitis*,⁸⁰ *S. sanguis*³⁵⁰ y *S. oralis*.²⁶³

Al parecer la resistencia en los estreptococos viridans se originó en cepas neumocócicas resistentes a la penicilina.⁷³ Se puede hallar sensibilidad reducida a la penicilina hasta en el 25% de las cepas.¹⁴⁶ Como sucede con los neumococos, estas cepas suelen ser más sensibles a las cefalosporinas de tercera y de cuarta generación.²⁵¹ No se recomiendan las pruebas de difusión con discos para estreptococos viridans; se debe realizar una determinación de la CIM utilizando un método de dilución o de difusión de gradiente.²²⁰

En un estudio de estreptococos viridans aislados de la orofaringe normal, se documentó a menudo resistencia a eritromicina, tetraciclina y quinupristina-dalfopristina; las cepas expresaron resistencia a levofloxacina y moxifloxacina con mucha menor frecuencia.²⁸⁴ La distribución de los fenotipos para la resistencia a la eritromicina se asemejaba a la hallada en *S. pyogenes* y *S. agalactiae*.

Hasta ahora estas cepas resistentes han seguido siendo sensibles a la vancomicina. En el laboratorio, los resultados de la sensibilidad obtenidos con el Etest® se han correlacionado bien con la dilución en agar para penicilina y cefalosporinas, pero no tan bien con vancomicina.²⁷² En cualquiera de los casos, una cepa que se determine que es resistente a la vancomicina debe ser derivada a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Otras bacterias grampositivas

La resistencia a la vancomicina suele hallarse comúnmente en cepas de *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*.³⁰⁰

Estos géneros son patógenos pocas veces, pero en ocasiones producen bacteriemia¹⁹⁵ y septicemia.¹⁰⁷ La resistencia a la vancomicina puede ser un dato útil para la identificación correcta, porque los estreptococos con los cuales se pueden confundir estos géneros son uniformemente sensibles a la vancomicina.

***Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* en pacientes con fibrosis quística**

Los aislamientos de esta especie constituyen un problema especial tanto para los médicos como para los laboratorios de microbiología, sobre todo las cepas que expresan un fenotipo mucoso. Las cepas mucoides a menudo crecen en forma insuficiente como para determinar un resultado válido. Cuando se comparó la prueba por difusión con discos con un método de referencia, se observó una baja correlación cuando se evaluaron algunos antibióticos con cepas mucoides. Sin embargo, la categoría interpretativa concordó bien entre los dos métodos.³² El Ettest (AB Biodisk, Solna, Suecia) se correlacionó bien con el método de referencia, tanto para las cepas mucoides como no mucoides.³² Por el contrario, los dos sistemas comerciales dominantes, Vitek y MicroScan WalkAway produjeron una frecuencia inaceptablemente alta de resultados erróneos cuando se compararon con un método de referencia.³¹

Cabe señalar que las pacientes con fibrosis quística presentan un problema incluso para los métodos de referencia. Smith y cols. no pudieron encontrar una correlación entre los resultados de la sensibilidad para tobramicina y ceftazidima, utilizando un método de dilución de referencia y la respuesta clínica.²⁹⁰ Aunque la microdilución en caldo se comparó bien con la técnica de dilución en agar para *Pseudomonas aeruginosa*, se observaron resultados discordantes con una frecuencia significativamente mayor en los aislamientos en pacientes con fibrosis quística que en otros pacientes.²⁷⁷

Muchos laboratorios no evalúan de rutina la sensibilidad de las cepas de *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* a los antibióticos. Ambos microorganismos siguen siendo en su mayor parte sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol, que es el tratamiento clínico de elección.^{38,56} Además, la correlación de los resultados clínicos con los resultados de la sensibilidad in vitro es inadecuada y los resultados de las pruebas pueden ser en realidad engañosos.²¹⁸ No se recomienda el método de difusión con discos para evaluar ninguno de estos microorganismos. Si no se efectúan pruebas, se debe adosar una nota que indique que las pruebas in vitro pueden ser poco útiles o engañosas, y que se debe considerar el tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol.

Pruebas de sensibilidad directa

En general, no se recomiendan las pruebas de sensibilidad directa porque el inóculo no está estandarizado y a menudo se presentan especies bacterianas mixtas. Las pruebas de sensibilidad directa de caldos de frascos de hemocultivos positivos se han correlacionado bien con las pruebas estándares de las colonias aisladas. Las pruebas han sido realizadas tanto con caldos no ajustados de los frascos⁵² como después del ajuste de la densidad del cultivo por comparación con un estándar de dilución McFarland de 0,5.¹⁶⁵ Además, la orina de pacientes con infecciones urinarias puede ser evaluada en forma directa si se presenta una única cepa bacteriana.⁵⁵

Actualización del capítulo. El suplemento de información más reciente del CLSI (M100-S15, enero de 2005) incluye 1) recomendaciones ampliadas para bacilos gramnegativos no fer-

mentadores (para cubrir especies de *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*); 2) criterios revisados para evaluar estafilococos, sobre todo las especies coagulasa negativas, que incluyen criterios separados para *Staphylococcus lugdunensis* y sugerencias para el uso de un disco de cefoxitina de 30 µg como alternativa para la oxacilina en la prueba por difusión con discos; 3) puntos de corte interpretativos para las pruebas por dilución de polimixina B (resultados aplicables también a colistina); 4) sugerencias para el examen de β-lactamasas de espectro ampliado de *Proteus mirabilis* y 5) recomendaciones para evaluación de calidad de la prueba de resistencia inducible a la clindamicina.

REFERENCIAS

1. World Health Organization: Standardization of methods for conducting microbe sensitivity test. World Health Organization Tech Rep Ser 1961;210.
2. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin-Japan, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997;46:624-626.
3. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940;146:837-837.
4. Ahmad MH, et al. Interaction between aminoglycoside uptake and ribosomal resistance mutation. Antimicrob Agents Chemother 1980;18:798-806.
5. Aldridge, KE, et al. The rapid emergence of fluoroquinolone-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a community hospital: an in vitro look at alternative antimicrobial agent. Diagn Microbiol Infect Dis 1992;15:601-608.
6. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Phil Trans R Soc Lond B 1980;789:321-331.
7. Anhalt JP, Washington JA II. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2nd Ed. New York: Springer-Verlag, 1985.
8. Baker CN, et al. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing technique by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991;29:533-538.
9. Barg N, et al. Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1975-1979.
10. Barry AL. Procedure for testing antimicrobial agents in agar medium: theoretical considerations. In: Lorian, V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. 2nd Ed. Baltimore: William & Wilkins, 1986:1-26.
11. Barry AL, et al. Influence of inoculum growth phase on microdilution susceptibility tests. J Clin Microbiol 1983;18:645-651.
12. Barton AL, Doern GV. Selective media for detecting gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1995;23:119-122.
13. Bauer AW, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-496.
14. Bauer AW, et al. Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci. A M A Arch Intern Med 1959;104:208-216.
15. Bedos JP, et al. Epidemiological feature of and risk factors for infection by *Streptococcus pneumoniae* strains with diminished susceptibility to penicillin: findings of a French survey. Clin Infect Dis 1996;22:63-72.
16. Beekmann SE, et al. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. J Clin Microbiol 2003;41:3119-3125.
17. Bell SM, Plowman D. Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from respiratory French Lancet 1980;1:279-280.
18. Betriu C, et al. Incidence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*: a 10-year study. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;33:255-260.
19. Bishop RE, Weiner JH. Hypothesis: coordinate regulation of murein peptidase activity and AmpC beta-lactamase synthesis in *Escherichia coli*. FEBS Lett 1992;304:103-108.
20. Hlaque J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. Clin Infect Dis 2003;37:1201-1209.
21. Blazquez J, et al. Single amino acid replacement at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1995;36:145-149.
22. Block C, et al. Unreliability of disc diffusion test for screening for reduced penicillin susceptibility in *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 1998;36:3103-3104.
23. Bowler LD, et al. Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. J Bacteriol 1994;176:333-337.
24. Boyce JM, et al. Spurious oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* because of defective oxacillin disks. J Clin Microbiol 1988;26:1425-1427.
25. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-951.
26. Hradlford PA, et al. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-I, a plasmid-mediated AmpC β-lactamase and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:563-569.

27. Brook I. Penicillin failure and copathogenicity in streptococcal pharyngotonsillitis. *J Fam Pract* 1994;38:175-179.
28. Brueggemann AB, et al. Use of penicillin MICs to predict *In vitro* activity of other beta-lactam antimicrobial agent against *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2001;39:307-369.
29. Bryan LE, Kwan S. Role of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:835-845.
30. Burns JL, et al. A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:40-54.
31. Burns JL, et al. Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan-WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:257-260.
32. Burns JL, et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:1818-1822.
33. Bush K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:109-123.
34. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998;27:Suppl 53.
35. Bush K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32:1085-1089.
36. Bush K, et al. A functional classification scheme for beta-lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1213.
37. Carmeli Y, et al. Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Emerg Infect Dis* 2002;8:803-807.
38. Carroll KC, et al. Comparison of various *in vitro* susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:229-235.
39. Carroll KC, et al. Susceptibility of beta-hemolytic streptococci to nine antimicrobial agents among four medical centers in Salt Lake City, Utah, USA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;27:123-128.
40. Center for Disease Control and Prevention. Fluoroquinolone-resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Hawaii, 1999, and decreased susceptibility to azithromycin in *N. gonorrhoeae*-Missouri 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:833-837.
41. Cetinkaya Y, et al. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:686-707.
42. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* 1999;179:Suppl 9.
43. Chambers HF, Sachdeva M. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1990;161:1170-1176.
44. Chang SC, et al. Influence of beta-lactamase inhibitors on the activity of oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:81-84.
45. Chow JW, Shluc DM. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1991;28:499-504.
46. Collat E, et al. Molecular evolution of ubiquitous beta-lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer beta-lactam antibiotics. *Mol Microbiol* 1990;4:1615-1620.
47. Collin SM, et al. Contamination of the clinical microbiology laboratory with vancomycin-resistant enterococci and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: implications for hospital and laboratory workers. *J Clin Microbiol* 2001;39:3772-3774.
48. Cotter G, Adley CC. Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures. *J Clin Microbiol* 2001;39:3753-3756.
49. Coudron PE, et al. Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 1986;24:764-769.
50. Coudron PE, et al. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000;38:1791-1796.
51. Couralin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1447-1451.
52. Coyle MB, et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol* 1984;20:473-477.
53. Daum RS, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *Infect Dis* 1992;166:1066-1072.
54. De Mouy D, et al. Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2400-2402.
55. Dennstedt FE, et al. Rapid method for identification and susceptibility testing of *Escherichia coli* bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1983;18:150-153.
56. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:57-80.
57. Diekema DJ, et al. Molecular epidemiology of macrolide resistance in neonatal bloodstream isolates of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:2659-2661.
58. Diekema DJ, et al. Antimicrobial-drug use and changes in resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* 2000;6:552-556.
59. Dillon JR, et al. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmid from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983;1:779-781.
60. Doern GV. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Branhamella catarrhalis*. *Clin Microbiol Newsletter* 1988;10:1185-1187.
61. Doern GV, et al. Assessment of laboratory performance with *Streptococcus pneumoniae* antimicrobial susceptibility testing in the United States: a report from the College of American Pathologists Microbiology Proficiency Survey Program. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:285-289.
62. Doern GV, et al. *In vitro* chloramphenicol susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: Disk diffusion procedures and assays for chloramphenicol acetyltransferase. *J Clin Microbiol* 1987;25:1453-1455.
63. Doern GV, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1721-1729.
64. Doern GV, Jones RN. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1747-1753.
65. Doern GV, Jones RN. *In vitro* susceptibility test practices with *Haemophilus influenzae* among College of American Pathologists survey participants in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:61-65.
66. Doern GV, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*: a collaborative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:95-107.
67. Doern GV, et al. National collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:180-185.
68. Doern GV, Tubert TA. Detection of beta-lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different beta-lactamase assays. *J Clin Microbiol* 1987;25:1380-1383.
69. Doern GV, Tubert TA. *In vitro* activities of 39 antimicrobial agents for *Branhamella catarrhalis* and comparison of results with different quantitative susceptibility test methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:259-261.
70. Doern GV, et al. Clinical impact of rapid *in vitro* susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol* 1994;32:1757-1762.
71. Donabedian SM, et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 2003;41:1109-1113.
72. Dougherty TJ, et al. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;18:730-737.
73. Dowson, CG et al. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5858-5862.
74. Dunne WM Jr, et al. Comparison of results generated by serotyping, pulsed-field restriction analysis, ribotyping, and repetitive-sequence PCR used to characterize penicillin-resistant pneumococci from the United States. *J Clin Microbiol* 2001;39:1791-1795.
75. Dutka-Malen S, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1875-1879.
76. Eliopoulos GM. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clin Infect Dis* 2003;36:473-481.
77. Eliopoulos CM, et al. Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:398-399.
78. Elwell LP, et al. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:528-533.
79. Eng RHK, et al. Inoculum effect of new beta-lactam antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:42-47.
80. Farber BF, et al. Multiply resistant viridans streptococci: susceptibility to β -lactam antibiotics and comparison of penicillin-binding protein patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24:702-705.
81. Farmer TA, Reading C. Beta-lactamases of *Branhamella catarrhalis* and their inhibition of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;21:506-508.
82. Faruki H, et al. A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). *N Engl J Med* 1985;313:607-611.
83. Felten A, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefonitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2002;40:2766-2771.
84. Fernandez-Rodriguez A, et al. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2536-2538.
85. Ferreira RB, et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* 2003;41:3609-3614.
86. Fiebelkorn KR, et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:4740-4744.
87. File TM Jr. Appropriate use of antimicrobials for drug-resistant pneumonia: locus on the significance of beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2002;34:Suppl 26.
88. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929;110:226-236.
89. Fluit AC, et al. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-871.

90. Fontana R, et al. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. *Clin Infect Dis* 1992;15:486-489.
91. Fontana R, et al. Transition from resistance to hypersusceptibility to β -lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:678-683.
92. Fraimow HS, et al. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Ann Intern Med* 1994;121:22-26.
93. Free L, Sahn DF. Investigation of the reformulated Remel Synergy Quad plate for detection of high-level aminoglycoside and vancomycin resistance among enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1643-1645.
94. Fridkin SK, et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis* 2003;36:429-439.
95. Frieden TR, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* 1993;342:76-79.
96. Frere JM, Joris B. Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *CRC Crit Rev Microbiol* 1985;11:299-396.
97. Gaffney DF, Foster TJ. Chloramphenicol acetyltransferases determined by R plasmids from gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 1978;109:351-358.
98. Garcia-Rey C, et al. Importance of local variations in antibiotic consumption and geographical differences of erythromycin and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:159-164.
99. Gavan TL, et al. Evaluation of the Sensititre System for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing: a collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:464-469.
100. Gehrlein M, et al. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991;37:405-41.
101. Gerberding JL, et al. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2574-2579.
102. Giger O, et al. Comparison of five different susceptibility test methods for detecting antimicrobial agent resistance among *Haemophilus influenzae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;24:143-153.
103. Gold HS. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clin Infect Dis* 2001;33:210-219.
104. Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996;35:1445-1453.
105. Goldman RC, Capobianco JO. Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14- and 15-membered macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1973-1980.
106. Goldstein FW, et al. In vivo and in vitro emergence of simultaneous resistance to both beta lactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1983;134A:329-337.
107. Golledge CL, et al. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pedococcus acidilactici*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1678-1679.
108. Goodhart GL. In vivo v in vitro susceptibility of enterococcus to trimethoprim-sulfamethoxazole. *JAMA* 1984;252:2748-2749.
109. Gosvitz JJ, et al. Detection of gyrA gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1166-1169.
110. Gradeliski E, et al. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39:2961-2963.
111. Gruteice P, et al. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 2003;41:1161-1166.
112. Gunkel AG, et al. State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens* highly resistant to extended-spectrum beta-lactams. *J Gen Microbiol* 1991;137:243-252.
113. Guthrie LL, et al. Comparison of MicroScan M MICroSTREP, PASCO, and Sensititre MIC panels for determining antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:267-273.
114. Hacek DM, et al. Yield of vancomycin-resistant enterococci and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from stools submitted for *Clostridium difficile* testing compared to results from a focused surveillance program. *J Clin Microbiol* 2001;39:1152-1154.
115. Hackenbeck R, et al. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:553-558.
116. Halstead DC, et al. Reality of developing a community-wide antibiogram. *J Clin Microbiol* 2004;42:1-6.
117. Hamilton-Miller JMT, et al. Errors arising from incorrect orientation of E test strips. *Clin Microbiol* 1995;33:1966-1967.
118. Hansen SL, Walsh TJ. Detection of intrinsically resistant (heteroresistant) *Staphylococcus aureus* with the Sceptor and AutoMicrobic systems. *J Clin Microbiol* 1987;25:412-415.
119. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984;158:513-516.
120. Hashemi FB, et al. Discrepancies between results of E-test and standard microbroth dilution testing of *Streptococcus pneumoniae* for susceptibility to vancomycin. *J Clin Microbiol* 1996;34:1546-1547.
121. Hays RC, Mandell GL. pO₂, pH, and redox potential of experimental abscesses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;147:29-30.
122. Hechler U, et al. Overproduced beta-lactamase and the outer-membrane barrier as resistance factors in *Serratia marcescens* highly resistant to beta-lactamase-stable beta-lactam antibiotics. *J Gen Microbiol* 1989;135:1275-1290.
123. Hedge PJ, Spratt BG. Amino acid substitution that reduce the affinity of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* for cephalixin. *Eur J Biochem* 1985;151:111-121.
124. Herman W, Gerding DN. Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1-4.
125. Hindler JA, Inderlied CB. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1985;21:205-210.
126. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2000;31:Suppl 8.
127. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001;7:337-341.
128. Horne D, Tomaz A. Hypersusceptibility of penicillin-treated group B streptococci to bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:745-753.
129. Horstkotte MA, et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2001;39:3700-3702.
130. Hudpeth MK, et al. National Department of Defense surveillance for invasive *Streptococcus pneumoniae*: antibiotic resistance serotype distribution, and arbitrarily primed polymerase chain reaction analyses. *J Infect Dis* 2001;184:591-596.
131. Hunter TH. Use of streptomycin in treatment of bacterial endocarditis. *Am J Med* 1947;2:436-442.
132. Huovinen P. Trimethoprim resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1451-1456.
133. Huovinen P. Macrolide-resistant group A streptococcus-now in the United States. *N Engl J Med* 2002;346:1243-1245.
134. Huycke MM, et al. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998;4:239-249.
135. Hyde TO, et al. Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolate. *JAMA* 2001;286:1857-1862.
136. Iwen PC, et al. Revised approach for identification and detection of ampicillin and vancomycin resistance in *Enterococcus* species by using inen MicroScan panels. *J Clin Microbiol* 1996;34:1779-1783.
137. Jabses D, et al. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* 1989;159:16-24.
138. Jacob MR. In vivo veritas: in vitro macrolide resistance in systemic *Streptococcus pneumoniae* infections does result clinical failure. *Clin Infect Dis* 2002;35:565-569.
139. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-1704.
140. Jari AK, et al. Evaluation of a latex agglutination assay for rapid detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:57-59.
141. Jarher V, et al. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-878.
142. Jones RN. Method preferences and test accuracy of antimicrobial susceptibility testing: updates from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1285-1289.
143. Jones RN, et al. Evaluation of the Vitek system to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:107-110.
144. Jones RN, Edson DC. Antibiotic susceptibility testing accuracy: Review of the College of American Pathologists Microbiology Survey 1972-1983. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:595-601.
145. Jones RN, Edson DC. Antimicrobial susceptibility testing trends and accuracy in the United States: a review of the College of American Pathologists Microbiology Surveys 1972-1989. Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:429-436.
146. Jones RN, Wilson WR. Epidemiology laboratory detection and therapy of penicillin-resistant streptococcal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:453-459.
147. Jorgensen JH, et al. Antimicrobial resistance among respiratory isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2075-2080.
148. Jorgensen JH, et al. Susceptibility of multiply resistant *Haemophilus influenzae* o newer antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;9:27-32.
149. Jorgensen JH, et al. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test. *J Clin Microbiol* 1994;32:159-163.
150. Jorgensen JH, et al. Anomicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. *J Clin Microbiol* 1990;28:985-988.
151. Jorgensen JH, et al. Quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using tile E-test. *J Clin Microbiol* 1991;29:109-114.
152. Jorgensen JH, et al. Use of *Haemophilus* test medium for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:430-434.
153. Jorgensen JH, et al. Evaluation of the Dade MicroScan MiCROSTREP antimicrobial susceptibility testing panel with selected *Streptococcus pneumoniae* challenge strains and recent clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:788-791.

154. Jorgensen JH, et al. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 1987;25:2105-2113.
155. Jureen R, et al. Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. J Clin Microbiol 2003;41:2330-2336.
156. Karlowsky JA, et al. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. J Clin Microbiol 2002;40:1063-1066.
157. Kataja J, et al. Clonal-relationships among isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* of different geographical origin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:589-595.
158. Kataja J, et al. Clonal spread of group A streptococcus with the new type of erythromycin resistance: Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. J Infect Dis 1998;177:786-789.
159. Kataja J, et al. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins: the Macrolide Resistance Study Group. J Antimicrob Chemother 2000;46:789-792.
160. Katsanis GP, et al. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol 1994;32:691-696.
161. Kellogg JA. Inability to adequately control antimicrobial agents on automatic system gram-positive and gram-negative susceptibility cards. J Clin Microbiol 1985;21:454-456.
162. Kelly JA, et al. Penicillin target enzyme and the antibiotic binding site. Science 1982;218:479-481.
163. Kelly LM, et al. Comparison of agar dilution, microdilution, E-test, and disk diffusion methods for testing activity of cefditoren against *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1999;37:3296-3299.
164. Kernodle DS, et al. Association of borderline oxacillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* with surgical wound infections. J Clin Microbiol 1998;36:219-222.
165. Kiehn JR, Pratt RF. Comparison of direct and standard microtiter broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. J Clin Microbiol 1982;16:96-98.
166. Kirkpatrick BD, et al. An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. Clin Infect Dis 1999;29:1268-1273.
167. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 1990;3:171-196.
168. Knapp JS, et al. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. J Infect Dis 1987;155:819-822.
169. Knox JR, Pratt RF. Different modes of vancomycin and D-alanyl-D-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:1342-1347.
170. Landman D, et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1996;34:751-752.
171. Lawrence RM, Hoepfich PD. Totally synthetic medium for susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 1978;13:394-398.
172. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002;34:482-492.
173. Leclercq R, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988;319:157-161.
174. Leclercq R, et al. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. Clin Infect Dis 1992;15:495-501.
175. Ligozi M, et al. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. J Clin Microbiol 2002;40:1681-1686.
176. Lina G, et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1062-1066.
177. Linares J, et al. Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1992;30:279-288.
178. Linden PK, et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *K. faecium*. Clin Infect Dis 1995;22:663-670.
179. Ling TK, et al. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. J Clin Microbiol 2001;39:2964-2966.
180. Livermore DM. Permeation of beta-lactam antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and other gram-negative bacteria. Rev Infect Dis 1988;10:691-698.
181. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2046-2048.
182. Livermore DM. Determinants of the activity of beta-lactamase inhibitor combinations. J Antimicrob Ther 1993;31:9-21.
183. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002;34:634-640.
184. Livermore DM, Davy KW. Invalidity for *Pseudomonas aeruginosa* of an accepted model of bacterial permeability to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:916-921.
185. Lonics JR, et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 2002;35:556-564.
186. Louie L, et al. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2002;40:2786-2790.
187. Low DE, et al. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001;32:Suppl 45.
188. Maes N, et al. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. J Clin Microbiol 2002;40:1514-1517.
189. Maiden MC. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. Clin Infect Dis 1998;27:Suppl 20.
190. Malquin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 1986;30:1-5.
191. Mandell GL, Petri WA Jr. Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins, and other beta-lactam antibiotics. In: Hardman JG, Limbird LE, ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Ed. New York: McGraw-Hill, 1996;1073-1101.
192. Marshall SA, et al. Comparative evaluation of E-test for susceptibility testing *Neisseria meningitidis* with eight antimicrobial agents: an investigation using U.S. Food and Drug Administration regulatory criteria. Diagn Microbiol Infect Dis 1997;27:93-97.
193. Massanari RM, et al. Implications of acquired oxacillin resistance in the management and control of *Staphylococcus aureus* infections. J Infect Dis 1988;158:702-709.
194. Massidda O, et al. Evidence for a methicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. EEMS Microbiol Lett 1992;92:223-227.
195. Mastro TD, et al. Vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*: Nine cases of bacteremia. J Infect Dis 1990;161:956-960.
196. Mates SM, et al. Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:6693-6697.
197. Mayer KH. Review of epidemic aminoglycoside resistance worldwide. Am J Med 1986;80:56-64.
198. McDougal LK, Thornberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol 1986;23:832-839.
199. McMurry L, et al. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1980;71:3974-3977.
200. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generation of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24:S19-S45.
201. Medeiros AA, et al. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. J Infect Dis 1987;156:751-757.
202. Mendelman PM, et al. Cefuroxime treatment failure of nontypeable *Haemophilus influenzae* meningitis associated with alteration of penicillin-binding proteins. J Infect Dis 1990;162:1118-1123.
203. Mendelman PM, et al. Problems with current recommendations for susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:1480-1484.
204. Meyer KS, et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late generation cephalosporins. Ann Intern Med 1993;119:353-358.
205. Meyer RD. *Legionella* infections: a review of five years of research. Rev Infect Dis 1983;5:258-278.
206. Miller GH, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms: changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Clin Infect Dis 1997;24:S46-S62.
207. Montanari MP, et al. Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 2001;39:1311-1315.
208. Moreillon P, Tomasz A. Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. J Infect Dis 1988;157:1150-1157.
209. Morris JG Jr, et al. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. Ann Intern Med 1995;123:250-259.
210. Munoz R, et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1992;6:2461-2465.
211. Murdoch DR, et al. Comparison of microscan broth microdilution, synergy quad plate agar dilution, and disk diffusion screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* species. J Clin Microbiol 2003;41:2703-2705.
212. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med 2000;342:710-721.
213. Murray BE, et al. Comparison of two beta-lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1986;30:861-864.
214. Murray BE, et al. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. J Clin Invest 1986;77:289-293.
215. Nagarajan R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:605-609.
216. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data: approved guideline M39-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
217. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk diffusion: supplemental tables, M100-S13 (M2). Wayne, PA: NCCLS, 2003.
218. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S13 (M7) MIC testing: supplemental tables. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
219. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M7-A6 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6th Ed. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

220. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard (M2-A8). Wayne, PA: NCCLS, 2003.
221. Neu HC. The emergence of bacterial resistance and its influence on empiric therapy. *Rev Infect Dis* 1983;5:S9-S20.
222. Neumann MA, et al. New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: a practical guide. *Cumitech* 1991;6A:1-26.
223. Neyfakh AA, et al. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:128-129.
224. Nicas TI, et al. Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1477-1481.
225. Nicholas RA, Strominger JL. Relations between beta-lactamases and penicillin-binding proteins: beta-lactamase activity of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1988;10:733-738.
226. Nikaïdo H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1831-1836.
227. Nikaïdo H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998;27:Suppl 41.
228. Nikaïdo H, et al. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol* 1983;153:232-240.
229. Nikaïdo H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;49:1-32.
230. Noble WC, et al. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* Nt-TC 12201 to *Streptococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;72:195-198.
231. Nordmann P. Trends in beta-lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 1998;27:Suppl 6.
232. Nordmann P, et al. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-946.
233. Odeh R, et al. Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2002;35:140-145.
234. Okhyssen PC, et al. Susceptibility of beta-lactamase-producing enterococci to piperacillin with tazobactam. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:219-224.
235. Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica*. 5ª Ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 2002:291-312.
236. Pai MP, et al. Risk factors associated with the development of infection with linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 2002;35:1269-1272.
237. Panagea S, et al. Should clindamycin be used as treatment of patients with infections caused by erythromycin-resistant staphylococci? *J Antimicrob Chemother* 1999;44:577-582.
238. Paredes A, et al. Prolonged pneumococcal meningitis due to an organism with increased resistance to penicillin. *Pediatrics* 1976;58:378-381.
239. Parr TR Jr, Bryant LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:747-753.
240. Pascual A, et al. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:588-591.
241. Paterson DL, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infection due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;39:2206-2212.
242. Patterson JE, et al. An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore)* 1995;74:191-200.
243. Pauk SM, et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:4805-4807.
244. Payne DJ, et al. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:767-772.
245. Maskell R, Okubadejo OA, Payne RH, Pead L. Human infections with thymine-requiring bacteria. *J Med Microbiol* 1978;11:33-42.
246. Pechere JC. Why are carbapenems active against *Enterobacter cloacae* resistant to third generation cephalosporins? *Scand J Infect Dis Suppl* 1991;78:17-21.
247. Perl TM, et al. Effect of serum on the in vitro activities of 11 broad-spectrum antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;32:2234-2239.
248. Persing DH, Relman DA, Tenover FC. Genotypic detection of antimicrobial resistance. In: Persing DH, ed. *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1996:33-58.
249. Peter K, et al. Impact of the ampD gene and its product on beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev Infect Dis* 1988;10:800-805.
250. Petersen EM, et al. Evaluation of four anti-microbial susceptibility testing systems for gram-negative bacilli. *Am J Clin Pathol* 1986;86:619-623.
251. Pfärrer MA, Jones RN. In vitro evaluation of contemporary beta-lactam drugs tested against viridans group and beta-haemolytic streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;27:151-154.
252. Philippon A, et al. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1131-1136.
253. Phillips I, et al. Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance. A ten-year study. *Am J Med* 1986;80:48-55.
254. Pihlajamäki M, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and use of antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 2001;33:483-488.
255. Piroth L, et al. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis* 1998;27:76-80.
256. Pollock HM, et al. Selection of a reference lot of Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol* 1986;24:1-6.
257. Poole K, et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 1993;175:7363-7372.
258. Putnam LR, et al. Accuracy of the Vitek system for antimicrobial susceptibility testing *Enterobacteriaceae* bloodstream infection isolates: use of "direct" inoculation from Bactec 9240 blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:101-104.
259. Quale JM, et al. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 2002;35:834-841.
260. Queenan AM, et al. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol* 2004;42:269-275.
261. Quinn JP, et al. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 1986;154:289-294.
262. Raimondi A, et al. Mutation in *Serratia marcescens* AmpC beta-lactamase producing high-level resistance to ceftazidime and ceftipime. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2331-2339.
263. Reinen RR, et al. Nationwide German multicenter study on the prevalence of antibiotic resistance in streptococcal blood isolates from neutropenic patients and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin and eight other antimicrobials. *J Clin Microbiol* 2001;39:1928-1931.
264. Reller LB, et al. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. *J Infect Dis* 1974;130:454-462.
265. Ricci LB, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:362-367.
266. Rice LB, et al. In vivo efficacies of beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations against a TEM-26-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2663-2664.
267. Rice RJ, et al. Chromosomally mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: results of surveillance and reponing, 1983-1984. *J Infect Dis* 1986;153:340-345.
268. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973;9:31-88.
269. Richter SS, et al. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Clin Infect Dis* 2003;36:380-383.
270. Richter SS, et al. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis* 2002;34:330-339.
271. Roberts MC, et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2823-2830.
272. Rosser SJ, et al. E test versus agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:26-30.
273. Rottein OD, et al. Mechanisms of microbial synergy in polymicrobial surgical infections. *Rev Infect Dis* 1985;7:151-170.
274. Rubens CE, et al. Evolution of multiple-antibiotic-resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequences. *J Bacteriol* 1979;140:713-719.
275. Rusthoven JJ, et al. Clinical isolation and characterization of aminoglycoside-resistant small colony variants of *Enterobacter aerogenes*. *Am J Med* 1979;67:702-706.
276. Saha V, et al. Occurrence and mechanisms of glycopeptide resistance in gram-positive cocci. *Infect Agents Dis* 1992;1:310-318.
277. Saiman L, et al. Evaluation of reference dilution test method for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:2987-2991.
278. Sanders CC, et al. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:797-801.
279. Satta G, et al. Target for bacteriostatic and bactericidal activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* resides in different penicillin binding proteins (PBP). *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:812-818.
280. Schieven BC, et al. Comparison of America MICroScan dry and frozen microdilution trays. *J Clin Microbiol* 1985;22:495-496.
281. Schwalbe MJ, et al. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2004;42:294-298.
282. Schwalbe RS, et al. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 1987;316:927-931.
283. Scott JR. Sex and the single circle: conjugative transposition. *J Bacteriol* 1992;174:6005-6010.
284. Seppala H, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridans group streptococci from normal flora. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:636-644.
285. Seppala H, et al. Erythromycin resistance of group A streptococci from throat samples is related to age. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:651-656.
286. Shigei J, et al. Comparison of two commercially available selective media to screen for vancomycin-resistant enterococci. *Am J Clin Pathol* 2002;117:152-155.

287. Shortridge VD, et al. Prevalence of macrolide resistance mechanism in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin Infect Dis* 1999;29:1186-1188.
288. Siberry GK, et al. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis* 2003;37:1257-1260.
289. Siegel MS, et al. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: results of surveillance in the United States. *J Infect Dis* 1978;137:170-175.
290. Smith AL, et al. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest* 2003;123:1495-1502.
291. Spratt BG. Distinct penicillin binding proteins involved in the division elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2999-3003.
292. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994;264:88-393.
293. Spratt BG, Cromie KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:699-711.
294. Srinivasan A, et al. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:430-438.
295. Steward CD, et al. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test method for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:351-358.
296. Steward CD, et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standard extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2864-2872.
297. Steward CD, et al. Comparison of agar dilution, disk diffusion MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1999;37:544-547.
298. Strausbaugh LJ, Sande MA. Factors influencing the therapy of experimental *Proteus mirabilis* meningitis in rabbits. *J Infect Dis* 1978;137:251-260.
299. Swenson JM, et al. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:1700-1704.
300. Swenson JM, et al. Amimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;3:543-549.
301. Swenson JM, et al. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:3008-3018.
302. Swenson JM, et al. Screening pneumococci for penicillin resistance. *J Clin Microbiol* 1986;24:749-752.
303. Swenson JM, et al. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3781-3784.
304. Swenson JM, et al. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J Clin Microbiol* 2001;39:3785-3788.
305. Tanaka M, et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. *J Clin Microbiol* 2000;38:521-525.
306. Tanz RR, et al. Lack of influence of beta-lactamase-producing flora on recovery of group A streptococci after treatment of acute pharyngitis. *J Pediatr* 1990;117:859-863.
307. Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1-5.
308. Tenover FC. VRSA, VISA, and GISA: The dilemma behind the name game. *Clin Microbiol Newslett* 2000;22:49-53.
309. Tenover FC, et al. Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1996;34:10-14.
310. Tenover FC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36:1020-1027.
311. Tenover FC, et al. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2001;39:241-250.
312. Tenover FC, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* 2003;41:3142-3146.
313. Tenover FC, et al. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1524-1527.
314. Tenover FC, et al. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993;31:1695-1699.
315. Thauvin-Eliopoulos C, et al. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-hyperproducing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:702-705.
316. Thomson KS. Controversy about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-336.
317. Thomson KS, Sander CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877-1882.
318. Thomson KS, et al. Use of microdilution panels with and without beta-lactamase inhibitor as a phenotypic test for beta-lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1393-1400.
319. Thornsberry C, et al. Regional trend in antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program, 1949-2000. *Clin Infect Dis* 2002;34:Suppl S16.
320. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanine-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;54:1133-1141.
321. Tomas A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1979;33:113-137.
322. Tomas A, et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1869-1874.
323. Tompsett R, McDermott W. Recent advance in streptomycin therapy. *Am J Med* 1949;7:371-381.
324. Toro CS, et al. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1715-1719.
325. Tuomanen E, et al. Coordinate regulation of beta-lactamase induction and peptidoglycan composition by the amp operon. *Science* 1991;251:201-204.
326. Ubukata K, et al. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant S. aureus-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 1989;171:2882-2885.
327. Van den Braak N, et al. Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 2001;39:351-353.
328. Van Dyck E, et al. Comparison of E test with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1586-1588.
329. Varaldo PE, et al. Survey of clinical isolate of *Staphylococcus aureus* for borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:677-682.
330. Waite K, et al. Use of clindamycin disks to detect macrolide resistance mediated by ermB and mefE in *Streptococcus pneumoniae* isolates from adults and children. *J Clin Microbiol* 2000;38:1731-1734.
331. Wanger AR, Murray BE. Comparison of enterococcal and staphylococcal beta-lactamase plasmids. *J Infect Dis* 1990;161:54-58.
332. Washington JA. Discrepancies between in vitro activity of and in vivo response to antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:25-31.
333. Washington JA. Functions and activities of the area committee on microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:150-155.
334. Watanabe M, et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-151.
335. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1983;52:825-869.
336. Weinstein JW, et al. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:210-212.
337. Weinstein MP, et al. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults: II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:54-70.
338. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:577-585.
339. Weiss K, et al. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001;33:517-522.
340. Weldhagen GF, et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2385-2392.
341. Wells VD, et al. Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Ann Intern Med* 1992;116:285-292.
342. Werner G, et al. Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001;39:3586-3590.
343. White RL, et al. Pseudoresistance of *Pseudomonas aeruginosa* resulting from degradation of imipenem in an automated susceptibility testing system with predried panels. *J Clin Microbiol* 1991;29:398-400.
344. Whitney CG, et al. Increasing prevalence of multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: the Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. *N Engl J Med* 2000;343:1917-1924.
345. Wiener J, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999;281:517-523.
346. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:84-92.
347. Young H, et al. Penicillin susceptibility testing of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* by the E test: a need for caution. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:585-588.
348. Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:446-448.
349. Zhang Q, et al. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1523-1528.
350. Zito ET, Daneo Moore L. Transformation of *Streptococcus sanguis* to intrinsic penicillin resistance. *J Gen Microbiol* 1934:1237-1249.

Micoplasmas y ureaplasmas

Taxonomía de los micoplasmas y los ureaplasmas

Factores de virulencia de los micoplasmas humanos

Importancia clínica de los micoplasmas humanos

Mycoplasma pneumoniae

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum*

Mycoplasma genitalium

Mycoplasma fermentans

Mycoplasma penetrans

Mycoplasma pirum

Mycoplasma primatum

Mycoplasma spermatophilum

Infecciones humanas debidas a especies de *Mycoplasma* de origen animal

Especies hemotrópicas de *Mycoplasma*

Cultivos de micoplasmas humanos a partir de muestras clínicas

Consideraciones generales

Recolección de la muestra

Medios de transporte

Medios para el cultivo de micoplasmas

Aislamiento e identificación de *Mycoplasma pneumoniae*

Detección de *Mycoplasma pneumoniae* por procedimientos que no utilizan cultivos

Aislamiento e identificación de los micoplasmas genitales

Detección de micoplasmas genitales por procedimientos que no utilizan cultivos

Sistemas comerciales de cultivo para *Mycoplasma*

Aislamiento de micoplasmas en medios de cultivo habituales

Pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

Pruebas serológicas para micoplasmas genitales

Sensibilidad antimicrobiana y tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma*

Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por especies hemotrópicas de *Mycoplasma* en animales

Los micoplasmas y los ureaplasmas son microorganismos que difieren de otras bacterias porque carecen de pared celular rígida. Las células individuales están limitadas por una unidad de membrana trilaminar. Además, la cantidad de material genético que compone el genoma de estos microorganismos es bastante pequeña (peso molecular, $4,5 \times 10^8$ a 1×10^9 Da). Debido a su menor contenido genético, estos microorganismos presentan una capacidad biosintética limitada. Por consiguiente, el cultivo de los micoplasmas y los ureaplasmas requiere un medio enriquecido que contenga precursores para la biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Los precursores para los ácidos nucleicos y las proteínas los proveen sobre todo el medio peptonado basal enriquecido y el extracto de levadura, mientras que los lípidos lo provee el agregado de suero. De hecho, uno de los criterios principales utilizado en la clasificación taxonómica de estos microorganismos es el requerimiento por parte de ciertos micoplasmas y microorganismos similares del lípido complejo colesterol en el medio de crecimiento.^{427,454} Todas las especies de *Mycoplasma* producen adenosintrifosfato (ATP) por fosforilación a nivel de sustrato efectuada por la ácido fosfoglicérico cinasa y la piruvato cinasa, dos enzimas de la vía glucolítica desde glucosa a piruvato.³⁵⁰ Estas dos enzimas parecen ser la principal fuente de la mayor parte del ATP sintetizado por los miembros de la clase *Mollicutes*. Estos microorganismos son también mucho más pequeños que la mayoría de las bacterias, ya que miden de 0,2 a 0,3 μm ; por lo tanto, pueden atravesar los filtros bacteriológicos. La ausencia de una pared celular bacteriana típica que contenga peptidoglucano determina que estos microorganismos sean resistentes a los antimicrobianos que tienen la pared celular como sitio de acción, como las penicilinas y las cefalosporinas. Por esto, el aislamiento de estas bacterias a partir de muestras clínicas puede tener implicaciones terapéuticas importantes.

Los micoplasmas y los ureaplasmas han sido aislados en seres humanos, animales, aves, insectos y plantas y continuamente se siguen identificando y comunicando especies nuevas en la literatura taxonómica.⁴⁵⁴ Algunas especies también tienen una vida libre en el suelo y el agua. Los micoplasmas humanos pertenecen a los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*; este último contiene aquellos micoplasmas que pueden hidrolizar la urea. Varias especies del género *Mycoplasma* y dos especies del género *Ureaplasma*, *U. urealyticum* y *U. parvum*, se encuentran en muestras clínicas humanas.

Con excepción de *M. pneumoniae*, el papel de otros micoplasmas —específicamente *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*— en las enfermedades humanas es un tema de controversias. *M. pneumoniae* es una causa bien reconocida de neumonía atípica, mientras que *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum* se asocian sobre todo con colonización e infección genital en adultos, y colonización e infección respiratoria en recién nacidos.^{111,391} Estas especies se asocian y están implicadas como agentes causales en una amplia variedad de cuadros patológicos. Sin embargo, estas mismas especies también pueden aislarse en individuos asintomáticos, lo que sugiere que pueden comportarse sobre todo como patógenos oportunistas.^{289,291,292} *M. genitalium* ha sido aislado en los aparatos genital y respiratorio y en la actualidad se está dilucidando su papel como agente productor de uretritis no gonocócica y no clamidial (UNGNC) y de otras infecciones del aparato genital.^{20,458} Sin embargo, su presencia y comportamiento en el aparato respiratorio son claros. Otras especies de *Mycoplasma* se encuentran como parte de la flora normal de la boca, en especial en las zonas gingivales que rodean los dientes. A finales de

la década de 1980, se detectó otra especie “nueva”, denominada en ese momento “*M. incognitus*”, en muestras de autopsia de pacientes con SIDA, lo que sugiere que este microorganismo puede ser otra infección oportunista o un cofactor transmisible por vía sexual que influye en la progresión de la enfermedad.^{264,309} Este microorganismo fue identificado luego como una cepa de *M. fermentans*, una bacteria con requerimientos nutricionales especiales. Otros micoplasmas recientemente descritos se han aislado en pacientes infectados por HIV y estos descubrimientos determinaron un renovado interés en los factores de virulencia de los micoplasmas y en los métodos para su detección e identificación.⁴⁹¹ En este capítulo se tratarán los micoplasmas humanos, haciendo hincapié en la importancia clínica de *M. pneumoniae* y de los micoplasmas genitales (*M. hominis* y *U. urealyticum*) y los métodos utilizados para el aislamiento y la identificación de estas bacterias en el laboratorio clínico.

Taxonomía de los micoplasmas y los ureaplasmas

Los micoplasmas y los ureaplasmas se clasifican en la clase *Mollicutes* (recuadro 18-1). El nombre *mollicutes* significa “cáscara blanda”, referido a la falta de una pared celular bacteriana rígida. El análisis de las secuencias del RNA ribosómico (rRNA) reveló que estos microorganismos están más estrechamente relacionados con la subdivisión bacilos-lactobacilos-estreptococos de las eubacterias, entre los cuales los miembros más cercanos son los clostridios, los lactobacilos, los estreptococos y el género *Erysipelothrix*.^{343,371,495} La clase *Mollicutes* contiene cuatro órdenes: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* y *Anaeroplasmatales* (recuadro 18-1). El orden *Entomoplasmatales* se creó para contener a las familias *Entomoplasmataceae* y *Spiroplasmataceae*. Los géneros *Entomoplasma* y *Mesoplasma* de la familia *Entomoplasmataceae* se encuentran en insectos y plantas.⁴⁵⁵ El género *Entomoplasma* contiene especies que requieren esterol y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, mientras que el género *Mesoplasma* contiene especies que no requieren colesterol pero crecen mejor a 30 °C en medios sin colesterol ni suero suplementado con Tween 80 (0,04 %). La familia *Spiroplasmataceae* incluye el único género *Spiroplasma*, microorganismos con forma de espiral que requieren colesterol para su desarrollo y se encuentran en plantas e insectos. Los miembros del orden *Acholeplasmatales* no requieren esteroides para el crecimiento y se los encuentra sobre todo en plantas, animales e insectos.^{2,13,460} La presencia de estos microorganismos en tejidos animales está confirmada por la aparición de acholeplasmas como contaminantes en los medios de cultivo de tejido suplementados con suero animal.¹³ Dos especies, *Acholeplasma laidlawii* y *Acholeplasma oculi*, se aislaron en seres humanos.^{282,358,481} *A. laidlawii* se relaciona desde el punto de vista inmunitario con *M. pneumoniae* y *M. genitalium*.⁶⁵ Como no precisan compuestos con esteroides para su crecimiento, los acholeplasmas pueden cultivarse en medios que carecen de suero exógeno. El orden *Anaeroplasmatales* está compuesto por una única familia (*Anaeroplasmataceae*) que comprende dos especies, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma*.⁴⁵⁵ Estas dos especies son anaerobias estrictas en cuanto a su metabolismo. La especie *Anaeroplasma* requiere colesterol para el crecimiento, mientras que los miembros del género *Asteroleplasma* no lo necesitan. Ambas especies se encuentran en el rumen del ganado bovino y ovino. La familia *Mycoplasmataceae* incluye ahora a los micoplasmas hemotrópicos que antes

estaban clasificados en los géneros *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* (recuadro 18-1). Estos microorganismos parasitan la superficie de los eritrocitos de diversos animales.

Los miembros del orden *Mycoplasmatales* requieren esteroides, como colesterol, para el cultivo in vitro. La única familia del orden, *Mycoplasmataceae*, contiene dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. El género *Mycoplasma* está compuesto por más de 100 especies que habitan en una amplia variedad de plantas y animales, como mamíferos, insectos, aves y reptiles, y pueden existir como comensales, parásitos y patógenos.^{288,360,454,467} En el recuadro 18-2 se muestran las especies de *Mycoplasma* aisladas en seres humanos. *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. primatum*, *M. spermatophilum* y *M. penetrans* se aislaron en el aparato genital humano, mientras que *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*, *M. faucium* y *M. lipophilum* pueden aislarse en las vías respiratorias. *M. salivarium* se encuentra en los surcos gingivales y puede intervenir en ciertos tipos de enfermedad periodontal. *M. orale*, *M. faucium*, *M. buccale* y *M. lipophilum* se consideran parte de la flora normal del aparato respiratorio y no son patógenos. En los últimos años *M. genitalium* ha generado gran interés científico como agente etiológico de uretritis no gonocócica aguda y crónica, y otras diversas infecciones genitales.⁴⁶⁷ *M. fermentans* se aisló por primera vez en el aparato urogenital humano y se postula su participación en uretritis, artritis reumatoide y enfermedad progresiva relacionada con el HIV. Esta

especie es la misma que "*M. incognitus*", aislada en pacientes con SIDA (véase la descripción más adelante).³⁷⁶ *M. penetrans*, un agregado relativamente nuevo al género, se aisló en la orina de pacientes con SIDA y, como *M. fermentans*, puede actuar sobre todo como agente infeccioso oportunista en huéspedes inmunodeprimidos. El nicho ecológico de *M. pirum* en los seres humanos es incierto.

Como sucede con otras bacterias, los micoplasmas humanos aislados en muestras clínicas difieren en ciertas características fenotípicas que se aprovecha para su aislamiento e identificación (cuadro 18-1). *M. pneumoniae* fermenta la glucosa con la formación de productos finales ácidos, mientras que *M. hominis* utiliza arginina, con la formación de productos finales básicos. El cultivo de estos microorganismos depende del empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos especiales, enriquecidos con factores necesarios para el crecimiento de micoplasmas además de sustratos de crecimiento específicos, como glucosa y arginina. Desde el punto de vista antigénico, las cepas de *M. pneumoniae* son homogéneas, con una única serovariedad reconocida. Se desconoce el número de serovariedades diferentes de *M. hominis*. Los estudios de hibridación genética que emplean sondas de rRNA han apoyado los estudios serológicos, con cepas de *M. pneumoniae* recolectadas durante muchos años que muestran una composición de rRNA similar y cepas de *M. hominis* que muestran patrones de rRNA heterogéneos.^{34,64,503} Además de ciertas similitudes ultraestructurales, también se

Recuadro 18-1 Taxonomía del filo firmicutes, clase Mollicutes

Orden	Familia	Género	Requerimientos de esteroides para el crecimiento	Hábitat	Comentarios
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	Sí	Seres humanos, animales	Crecimiento óptimo a 35-37 °C; metaboliza la glucosa o la arginina o ambas
		<i>Ureaplasma</i>	Sí	Seres humanos, animales	Crecimiento óptimo a 35-37 °C; metaboliza la urea
		" <i>Eperythrozoon</i> " (ahora miembros del género <i>Mycoplasma</i>)		Animales, incluso primates	Bacterias parásitas sin pared celular, no cultivables, encontradas en las superficies de las membranas de los eritrocitos
		" <i>Haemobartonella</i> " (ahora miembros del género <i>Mycoplasma</i>)		Animales, seres humanos (?)	Bacterias parásitas sin pared celular, no cultivables, encontradas en las superficies de las membranas de los eritrocitos
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	Sí	Insectos, plantas	Crecimiento óptimo a 30 °C
		<i>Mesoplasma</i>	No	Insectos, plantas	Crecimiento óptimo a 30 °C; crece en medio sin suero con 0,04% de Tween 80
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	Sí	Insectos, plantas	Crecimiento óptimo a 30-37 °C
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	No	Animales, insectos, plantas	Crecimiento óptimo a 30-37 °C
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	Sí	Rumen de ganado bovino y ovino	Anaerobio
		<i>Asteroleplasma</i>	No	Rumen de ganado bovino y ovino	Anaerobio

Recuadro 18-2 Micoplasmas y ureaplasmas aislados en seres humanos

Especie	Sitios comunes de aislamiento	Comentarios (otros sitios de aislamiento, enfermedades asociadas)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Aparato respiratorio, aparato genital (muy raro), aspirados de líquido articular (muy raro)	Neumonía, bronquitis, bronquiolitis, faringitis, laringitis estridulosa; aislamiento ocasional en el aparato genital y aspirados de líquido articular
<i>Mycoplasma orale</i>	Orofaringe y nasofaringe	No se asocia con enfermedad; se aisló en médula ósea leucémica y ganglios linfáticos
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Orofaringe y nasofaringe	No se asocia con enfermedad, participación cuestionable en la enfermedad periodontal; aislamiento raro en el cuello uterino/vagina y articulaciones artríticas
<i>Mycoplasma buccale</i>	Orofaringe y nasofaringe	No se asocia con enfermedad
<i>Mycoplasma faucium</i>	Orofaringe y nasofaringe	No se asocia con enfermedad
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	Orofaringe y nasofaringe	No se asocia con enfermedad
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Cuello uterino, esperma	No se asocia con enfermedad
<i>Mycoplasma primatum</i>	Orofaringe y nasofaringe; uretra femenina	No se asocia con enfermedad; aislado en el sitio umbilical
<i>Mycoplasma hominis</i>	Aparato genitourinario femenino, orofaringe	Hemocultivos (septicemia posparto), vaginosis bacteriana y otras infecciones genitales, muestras de pulmón y derrame pleural; infecciones del trasplante de órgano y tejido; infecciones de las heridas quirúrgicas, infecciones asociadas con prótesis; infecciones neonatales; amnionitis
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Aparato genitourinario, orofaringe	Algunos casos de uretritis no gonocócica, no clamidial; papel desconocido en la infección respiratoria, presencia en líquido articular (raro) tal vez secundaria a bacteriemia y siembra de espacios articulares
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Aparato genitourinario, aparato respiratorio	Linfocitos en sangre periférica y orina en pacientes con SIDA; articulaciones artríticas; médula ósea: posible participación en la patogenia de la infección por HIV
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Aparato genitourinario, orina	Orina en pacientes con SIDA; posible participación en la patogenia del HIV; agente infeccioso oportunista
<i>Mycoplasma pirum</i>	Sangre (raro)	Linfocitos en sangre periférica; contaminante en células de cultivo de tejidos de origen humano; ¿papel en la patogenia del HIV?
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Aparato genitourinario; orofaringe, vías respiratorias bajas, tejidos placentarios	Vías respiratorias bajas, sangre (sepsis neonatal); líquido cefalorraquídeo; sitios quirúrgicos, posible participación en la uretritis no gonocócica, infecciones del aparato genital, infecciones neonatales
<i>Ureaplasma parvum</i>	Aparato genitourinario	Infecciones del aparato genital

Cuadro 18-1 Características para la identificación de especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* humanas

SITIO DE AISLAMIENTO ESPECIE	UTILIZACIÓN DE			pH ÓPTIMO	TIEMPO HASTA LA RECUPERACIÓN	CRECIMIENTO EN			SERO- VARIEDADES
	Glucosa	Arginina	Urea			Aerobiosis	CO ₂	Anaerobiosis	
Aparato respiratorio									
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	—	—	6,5–7,5	4–21 días	4 +	4 +	1 +	1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	—	+	—	6–7	2–5 días	2 +	ND	4 +	1
<i>Mycoplasma orale</i>	—	+	—	7	4–10 días	2 +	ND	4 +	1
Aparato genital									
<i>Mycoplasma hominis</i>	—	+	—	5,5–8	1–5 días	4 +	4 +	4 +	Desconocido
<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>U. parvum</i>	—	—	+	5,5–6,5	1–4 días	4 +	4 +	4 +	14
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	—	7	4–21 días	2 +	ND	4 +	1
Aparatos respiratorio/genital									
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	—	—	7	LENTO	2 +	3–4 +	1 +	Desconocido
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	+	—	—	6–8	1–5 días	4 +	4 +	4 +	1

+, positivo; —, negativo; ND, datos no disponibles.

describieron reactividades serológicas cruzadas y homologías genéticas entre *M. pneumoniae* y *M. genitalium*.^{65,254,504}

El género *Ureaplasma* incluye los micoplasmas que específicamente pueden hidrolizar la urea. En la actualidad, el género contiene siete especies: *U. urealyticum*, *U. parvum*, *U. diversum*, *U. gallorale*, *U. felinum*, *U. cati* y *U. canigenitalium*.^{16,148,149,173,228,394} A *Ureaplasma* se lo denominó micoplasmas "cepa T" por el tamaño muy pequeño ("T" por la palabra inglesa *tiny* {diminuto}) de sus colonias en medios sólidos.³⁹⁴ Antes de 1999, se habían descrito 14 serotipos de *U. urealyticum* en seres humanos, primates y otros animales, que se habían definido por la reactividad con un panel de anticuerpos policlonales.^{16,369} Estos serotipos se agruparon en dos biovariedades (biovares): la biovariedad 1 compuesta por los serotipos 1, 3, 6 y 14 y la biovariedad 2, por los serotipos 2, 4, 5 y 7 a 13.¹⁴⁷ Los miembros de estas dos biovariedades también mostraron diferencias en otras propiedades, como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, patrones de las proteínas de la célula entera en electroforesis en gel de poliacrilamida y sensibilidad a las sales de manganeso.^{16,147,357,369,420} Otros estudios con análisis de proteínas celulares y patrones de endonucleasas de restricción del DNA apoyaron la agrupación serológica de biovariedades separadas.³⁵⁹ También se observó que los microorganismos que pertenecen a la biovariedad 1 presentaban genomas más pequeños que los de la biovariedad 2, de modo que se los menciona como biovariedad "parvo" (pequeños).²⁰⁴ Dentro de las biovariedades, los análisis de rRNA con sondas de ácido nucleico mostraron una importante homología de secuencia de nucleótidos entre los serotipos constituyentes. El porcentaje de hibridación del DNA-DNA entre los serotipos 1, 3 y 6 de la biovariedad 1 fue del 91% al 92 %, mientras que entre los serotipos 2, 4, 5, 7 y 8 de la biovariedad 2 variaron del 69% al 97%. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales contra los serotipos de la biovariedad 1 también reaccionaron con cepas clínicas de la biovariedad 2 en técnicas de inmunotransferencia por Western blot, lo que indica reactividad antigénica cruzada considerable dentro de los serotipos definidos de modo policlinal.⁵⁸ Los análisis de inmunotransferencia de cepas clínicas de la biovariedad 1 con anticuerpos monoclonales mostraron patrones altamente variables entre sí y con cepas con serotipos de referencia específicos, lo que sugiere la existencia de variación antigénica de alto grado dentro de diversos serotipos y entre ellos. Se desarrollaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que detectan rRNA 16S específico de la biovariedad y se utilizaron para examinar cepas de referencia y aislamientos clínicos a fin de determinar relaciones entre biovariedades y enfermedades específicas asociadas con *U. urealyticum*.^{370,1444} En 1998, las biovariedades 1 y 2 de *U. urealyticum* se clasificaron formalmente como *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*, respectivamente.²²⁷

Las otras especies de *Ureaplasma* se encuentran exclusivamente en animales. *U. diversum* (tres serovariedades) se aisló en los aparatos respiratorio y genital del ganado vacuno y ovino; es el agente etiológico de infecciones maternas y fetales, como amnionitis, aborto, bajo peso de los animales recién nacidos, neumonía y muerte de las crías.¹⁷³ *U. gallorale* (una serovariedad) es una especie no patógena que se encuentra en el aparato respiratorio de pollos y otras aves.^{16,228} Dos especies, *U. felinum* y *U. cati*, se han aislado en el aparato respiratorio de gatos domésticos sanos.¹⁴⁸ *U. canigenitalium*, la última especie descrita, se aisló en cultivos de boca, cavidad nasal y prepucio de perros y comprende cuatro serovariedades.¹⁴⁹ Además de estas siete especies formalmente definidas se describieron otras especies aviares, porcinas, simianas, bovinas y caprinas/ovinas

diferenciadas por características genéticas y antigénicas, pero a las que no se les asignó una especie o epíteto definitivo.^{16,150}

Factores de virulencia de los micoplasmas humanos

No se han estudiado ampliamente los posibles factores de virulencia de los micoplasmas patógenos humanos, pero se describieron algunos de ellos como posibles candidatos. *M. pneumoniae* tiene un orgánulo de adherencia, que es una extensión delgada en un polo de la célula con un centro electrodens y un "botón" terminal.^{235,236,389} Estas estructuras forman parte del citoesqueleto del micoplasma, compuesto por una red de diversas proteínas. Agrupada en el extremo del orgánulo de adherencia se encuentra una proteína asociada con la membrana de 169 kDa denominada P1, que es la principal citoadhesina que determina la adherencia de *M. pneumoniae* a las células huésped.^{19,185} Estudios sobre mutantes no citoadherentes de *M. pneumoniae* han identificado varias proteínas accesorias adicionales (HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, P90, P65, P40, P30, P116) que son esenciales para la adherencia a los tejidos diana y se localizan y agrupan dentro del orgánulo de adherencia junto con P1.^{19,116,174,201,411,412,418,494} Como la citoadherencia es el primer paso necesario para la infección de las superficies mucosas susceptibles, estas proteínas representan verdaderos factores de virulencia en este microorganismo. Los individuos infectados por *M. pneumoniae* producen una respuesta de anticuerpos vigorosa contra la adhesina P1, lo que sugiere que las proteínas adhesinas purificadas pueden ser útiles en pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *M. pneumoniae*.^{102,184,185} También es numerosa la bibliografía sobre la inducción de diversas citocinas secundarias a la infección por *M. pneumoniae* y la función de éstas en la patogenia de la enfermedad por micoplasmas.⁵⁰¹

En *M. hominis* también se demostraron proteínas de citoadherencia que determinan el comienzo de la colonización y la infección. P50 y P100, dos polipéptidos situados en la superficie de *M. hominis*, actúan en la adherencia de esta especie a las células eucariontes.¹⁵⁷ *M. hominis* también se une a glucolípidos sulfatados de manera dependiente del tiempo, la temperatura y la dosis; esta unión puede inhibirse por la preincubación de los microorganismos con sulfato de dextrano de alto peso molecular.³²⁹ La unión a la proteína P50 recombinante a las células HeLa también es inhibida por dextranos de alto peso molecular, lo que indica que la proteína de citoadherencia P50 se une a sulfátidos ubicados en la membrana de la célula huésped.²²³ Los glucolípidos sulfatados y otros glucoconjugados están presentes en concentraciones elevadas en los aparatos genitales femenino y masculino, y la interacción específica de *M. hominis* con estas moléculas puede ayudar a explicar el tropismo por el tejido urogenital de esta especie. La lipoproteína de citoadherencia P100 de *M. hominis* también tiene un dominio de unión al sustrato para el transporte del péptido a través de la membrana celular.¹⁵⁸ Las cepas de *M. hominis* también poseen otra proteína asociada con la adherencia expuesta en la superficie denominada antígeno Vaa (variable asociado con la adherencia), que está codificado por seis tipos de genes *vaa* separados.^{38,39} La expresión de estos genes puede activarse o desactivarse; se ha postulado que esta capacidad estimula la diseminación del microorganismo de una célula a otra.⁵⁰⁹

U. urealyticum también produce varios factores asociados con la virulencia. Las cepas aisladas de *U. urealyticum* producen tres enzimas fosfolipasas (A₁, A₂ y C) ubicadas en la membrana citoplasmática.⁹⁷ Estas enzimas hidrolizan fosfolípidos, con la liberación de ácido araquidónico. Como *U. urealyticum* se asocia

con amnionitis y morbilidad perinatal (abortos espontáneos, prematuridad, parto de niño muerto), se ha postulado que la infección del aparato genital femenino puede iniciar una secuencia de cambios patológicos relacionados con la producción de fosfolipasa.¹¹¹ Es posible que la liberación de ácidos araquidónicos por las membranas amnióticas conduzca a la producción de prostaglandinas, que pueden activar un trabajo de parto prematuro.²⁶ También se ha visto que *U. urealyticum* induce la producción de citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral- α [TNF- α], interleucina-6 [IL-6]) en líneas celulares de macrófagos humanos y de ratas, y estimula la liberación de óxido nítrico por macrófagos alveolares cultivados.^{248,250} La amplia liberación de estas citocinas puede contribuir a la respuesta inflamatoria y a la patología de la enfermedad pulmonar crónica observada en los recién nacidos prematuros de muy bajo peso al nacer. También se ha demostrado que *U. urealyticum* induce apoptosis en células epiteliales y macrófagos pulmonares humanos; los anticuerpos monoclonales anti-TNF- α suprimen la muerte celular.²⁴⁹ Estos datos sugieren que la infección pulmonar por *U. urealyticum* en estos neonatos puede estar implicada en el deterioro crónico de los tejidos pulmonares, ya sea de modo directo o indirecto por la producción de citocinas inflamatorias que se sabe que participan en la enfermedad pulmonar crónica de recién nacidos prematuros.^{230,453} Las tres fosfolipasas descritas antes también pueden contribuir a la enfermedad pulmonar fetal vinculada con las infecciones respiratorias por *U. urealyticum*.³⁷⁹ *M. hominis* y *U. urealyticum* también producen proteasas para la inmunoglobulina A, que pueden facilitar la invasión a las mucosas al hidrolizar la IgA presente en ellas.²⁰⁶

M. fermentans (que incluye la cepa "incognitus" [véase más adelante]), *M. penetrans* y *M. pirum*, se han asociado con enfermedad en individuos sanos y en pacientes con SIDA. Estos microorganismos se han implicado como agentes oportunistas o como cofactores que contribuyen a la patología y la patogenia de la enfermedad relacionada con el HIV.³⁰⁹ Los mecanismos implicados en estas funciones comprenden la activación específica del sistema inmunitario celular, la producción de superantígenos que estimulan la liberación de diversas linfocinas y citocinas inmunomoduladoras y la generación de radicales libres que contribuyen al estrés oxidativo observado en la infección por HIV. Todos estos micoplasmas "asociados con el SIDA" utilizan la glucosa e hidrolizan la arginina. La arginina desaminasa de los micoplasmas puede causar la depleción de la arginina en los macrófagos infectados. La arginina es un precursor de una molécula que está directamente implicada en la citotoxicidad mediada por macrófagos; en consecuencia, la depleción de arginina por la infección por micoplasmas puede dar por resultado la disminución de la citotoxicidad mediada por los macrófagos. Los micoplasmas también liberan al medio de crecimiento nucleasas que degradan los ácidos nucleicos de las células huésped para generar precursores para la síntesis de sus propios ácidos nucleicos. *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pirum* también pueden invadir células y sobrevivir como patógenos intracelulares.⁷⁶ La asociación de estos microorganismos con localizaciones intracelulares en linfocitos y macrófagos ayuda a explicar su aislamiento, en especial de *M. fermentans*, en la sangre de pacientes con SIDA o sin él.

Importancia clínica de los micoplasmas humanos

Mycoplasma pneumoniae

M. pneumoniae es una de las causas del proceso neumónico conocido como neumonía atípica, junto con varios agentes

virales (p. ej., influenza, virus sincitial respiratorio, adenovirus), micóticos (p. ej., *Pneumocystis carinii*) y bacterianos (p. ej., *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*).^{37,69,121,252} *M. pneumoniae* se transmite mediante gotitas por el aire que contienen los microorganismos y es muy contagioso. Alrededor del 10% al 30% de las neumonías extrahospitalarias son causadas por *M. pneumoniae*; sin embargo, estos casos representan sólo del 3% al 10% de las infecciones por este microorganismo, ya que casi todos los individuos infectados manifiestan traqueobronquitis o infecciones menores de las vías respiratorias altas o permanecen asintomáticos.^{69,121} En poblaciones cerradas (p. ej., campamentos de verano, bases militares, escuelas), *M. pneumoniae* puede causar del 25% a más del 75% de las infecciones neumónicas. Por lo general, la enfermedad no es estacional y puede aparecer en cualquier momento del año, si bien su incidencia manifiesta suele ser máxima al final del otoño y en el invierno, cuando los jóvenes regresan a la escuela. La infección afecta a niños en edad escolar mayores de 5 años, adolescentes y adultos jóvenes. Sin embargo, la enfermedad endémica y epidémica puede manifestarse en niños más pequeños y en adultos mayores.¹⁷⁸ Las infecciones de las vías respiratorias altas tienden a afectar a los menores de 3 años, mientras que la traqueobronquitis o la neumonía afecta con más frecuencia a los niños mayores y a los adultos. Es interesante destacar que los estudios realizados en poblaciones pediátricas no demostraron la participación de *M. pneumoniae* en la miringitis aguda ni en la otitis media con derrame.^{231,415} Casi todas las infecciones causadas por *M. pneumoniae* son relativamente leves e incluyen faringitis, traqueobronquitis, bronquiolitis y crup; hasta la quinta parte de las infecciones presentan realmente síntomas y pueden representar reinfección.^{69,121} Las infecciones que requieren internación pueden afectar a pacientes ancianos e inmunodeprimidos y en algunas de estas situaciones pueden ocasionar la muerte.^{284,341}

Tras la exposición en huéspedes susceptibles, los microorganismos se adhieren a las células epiteliales del aparato respiratorio donde se multiplican; no atraviesan esas células sino que permanecen localizados. Los microorganismos pueden aislarse mediante cultivo durante el período de incubación y varias semanas durante y después de la enfermedad clínica, incluso en presencia de anticuerpos específicos. Luego de un período de incubación de 2 a 3 semanas, la presentación clínica de la neumonía por micoplasmas suele ser insidiosa, en lugar de abrupta, con comienzo gradual de síntomas generales y neumónicos que se asemejan a los de la gripe.⁶⁹ La mayoría de los pacientes presentan a los pocos días fiebre de 38,3 °C a 39 °C, con escalofríos, malestar general, cefaleas, odinofagia, congestión nasal y tos seca no productiva que aparece temprano en la evolución clínica. El recuento de leucocitos a menudo es normal o sólo está levemente elevado. En el 5% a 10% de los pacientes aparecen síntomas de las vías respiratorias bajas; el esputo se torna más mucoso o mucopurulento y en ocasiones aparece sangre.⁶⁹ Los frotis del esputo con tinción de Gram en este momento suelen revelar cantidades escasas a moderadas de células inflamatorias polimorfonucleares y ausencia de microorganismos. Con el comienzo de los síntomas neumónicos, los pacientes pueden sentirse como si padecieran un resfriado intenso pero pueden continuar con sus actividades normales; de ahí, la aplicación del término "neumonía ambulatoria" a esta enfermedad. El examen del tórax suele revelar roncus localizados y estertores aislados y las radiografías de tórax son compatibles con una bronconeumonía difusa, que suele afectar varios lóbulos del pulmón sin consolidación. En la neumonía por *M. pneu-*

moniae los patrones radiográficos presentan amplias variaciones y pueden mostrar infiltrados neumónicos peribronquiales, atelectasias, nódulos y linfadenopatías hiliares.⁶⁹ Los hallazgos radiológicos suelen ser más extensos de lo que podría sugerir el examen físico. Los derrames pleurales son relativamente raros en la neumonía por micoplasmas; aparecen en hasta el 20% de los pacientes. Otras complicaciones pleuropulmonares, como neumotórax y abscesos pulmonares, también son infrecuentes.

La neumonía por *M. pneumoniae* suele ser autolimitada, con resolución de la mayoría de los síntomas generales en 3 a 10 días sin antibioticoterapia.⁶⁹ Las alteraciones de las radiografías de tórax se resuelven con más lentitud y la resolución completa puede insumir de 10 días a 6 semanas. Si bien la antibioticoterapia con tetraciclina o eritromicina reduce de manera significativa la duración de los signos y los síntomas, y acelera la resolución de las alteraciones observadas en las radiografías de tórax, el microorganismo no suele erradicarse del aparato respiratorio con la farmacoterapia.⁶⁹ En un estudio se observaron cultivos de fauces para *M. pneumoniae* positivos aún a los 4 meses después de la resolución de la infección.¹²¹ A pesar de la antibioticoterapia adecuada pueden aparecer recurrencias y recidivas. Mediante el empleo de métodos serológicos y técnicas de detección molecular varios estudios han mostrado que *M. pneumoniae* puede desempeñar papeles importantes en el asma aguda y crónica en niños y adultos, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en especial entre adultos mayores, y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.^{30,120,234,297} Datos recientes también sugieren que *M. pneumoniae* puede estar implicado en el síntoma torácico agudo, una enfermedad similar a la neumonía en pacientes con drepanocitosis.³²²

Las complicaciones causadas por la infección por *M. pneumoniae* son raras, pero varían de acuerdo con la cantidad de órganos afectados. Estas complicaciones pueden ser dermatológicas, cardiovasculares, musculoesqueléticas, neurológicas, urológicas, hepatobiliares u oculares. Las complicaciones dermatológicas incluyen el eritema multiforme mayor (síndrome de Stevens-Johnson), diversos tipos de erupciones cutáneas maculares, morbiliformes y vesiculares, y eritema nudoso.^{60,246} El eritema multiforme mayor, la manifestación cutánea que con más frecuencia se relaciona con la infección por micoplasma, se presenta como lesiones vesiculares en las zonas mucocutáneas del cuerpo.^{246,375} Las manifestaciones cardiovasculares pueden aparecer en el 10% de los casos e incluyen defectos de la conducción con arritmia cardíaca, pericarditis, taponamiento cardíaco e insuficiencia cardíaca congestiva.^{212,300,380} Aunque las artralgias son una manifestación frecuente de infección por micoplasma, se han comunicado casos de artritis manifiesta, con cultivos de líquido articular positivos, pero son muy poco frecuentes.^{56,81} Las complicaciones neurológicas pueden ser resultado de la invasión directa del micoplasma al sistema nervioso (meningitis, meningoencefalitis, mielitis transversa, encefalomiелitis diseminada aguda), mientras que los síndromes neurológicos posinfecciosos es probable que se produzcan por medio de un mecanismo autoinmunitario inducido por la infección por micoplasma o por episodios tromboembólicos que conducen a la microangiopatía, vasculitis cerebral y desmielinización en áreas perivasculares del sistema nervioso central (SNC).^{28,31,316,344,363,405} Las complicaciones graves del SNC de este último tipo se asociaron con accidentes cerebrovasculares tras una infección aguda por *M. pneumoniae*.^{331,406} Las complicaciones urológicas y hepatobiliares se manifiestan como nefritis aguda y hepatitis colestásica, respectivamente.^{140,401} Las

complicaciones oculares, como edema de papila, atrofia del nervio óptico, papilitis óptica, exudados y hemorragias retinianas, también se informaron en relación con infecciones por *M. pneumoniae*.^{305,377} Diversos tipos de complicaciones hemáticas (es decir, anemia hemolítica secundaria a la formación de crioprecipitinas, coagulopatía intravascular, neutropenia, trombocitopenia, hemoglobinuria paroxística por el frío) pueden ser el resultado de la formación de anticuerpos específicos y autoanticuerpos dirigidos contra el tejido pulmonar, la cardiolipina y los tejidos musculares.^{57,59,85}

Los estados de inmunodeficiencia humoral y celular también predisponen a los individuos a infecciones más graves por *M. pneumoniae*, así como por otros micoplasmas.^{121,334,372} Los individuos con hipogammaglobulinemia pueden sufrir episodios repetidos de neumonía por *M. pneumoniae* y presentan dificultad para eliminar el microorganismo del aparato respiratorio a pesar del tratamiento adecuado. Estos pacientes suelen padecer síntomas respiratorios altos y bajos graves, con infiltrados escasos o ninguno en la radiografía de tórax y complicaciones importantes, como erupciones cutáneas, artralgias, artralgias sépticas y osteomielitis.^{200,240,440,442} *M. pneumoniae* también puede causar enfermedad grave en pacientes con enfermedades que deprimen la inmunidad celular, como infección por HIV y drepanocitosis.^{194,222,322,334}

La enfermedad fulminante y diseminada por *M. pneumoniae* con afección de múltiples órganos es rara, si bien Kountouras y cols. informaron en un hombre de 50 años, antes sano, un cuadro de dificultad respiratoria progresiva, meningitis aséptica, hepatitis colestásica, insuficiencia renal y coagulación intravascular diseminada.²³² Por serología se diagnosticó la infección por *M. pneumoniae*; el paciente se trató con eritromicina y tuvo una recuperación sin complicaciones. Takiguchi y cols. comunicaron en una mujer de 64 años, antes sana, un cuadro de dificultad respiratoria progresiva, con infiltrados alveolares bilaterales diseminados en las radiografías de tórax.⁴²³ Luego sufrió síndrome de dificultad respiratoria aguda y coagulación intravascular diseminada. La infección por *M. pneumoniae* se diagnosticó por serología. A pesar del tratamiento energético con antimicrobianos y corticosteroides, respiración asistida mecánica, hemodiálisis y plasmáfesis, la paciente falleció por insuficiencia multiorgánica. Koletsky y Weinstein informaron un caso rápidamente mortal de infección diseminada por *M. pneumoniae* durante la cual se desarrolló enfermedad respiratoria grave, neumonía, shock e insuficiencia renal en una mujer de 30 años después de una evolución clínica de 9 días.²²⁵ La paciente falleció a las 24 horas de ser internada. En la autopsia se aisló el microorganismo en pulmones, riñones y cerebro. Los cortes de tejido revelaron condensaciones neumónicas bilaterales y coagulación intravascular diseminada.

En ocasiones se aísla *M. pneumoniae* en localizaciones extrapulmonares no habituales distintas del líquido articular y el SNC. Goulet y cols. aislaron *M. pneumoniae* en muestras urogenitales de 22 mujeres en un período de 2 años.¹³² Además, el microorganismo se aisló en la uretra de uno de tres hombres que eran parejas sexuales de una mujer portadora del microorganismo en su aparato genital. *M. pneumoniae* también se aisló en un absceso tuboovárico.⁴⁴⁸

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum*

Tanto *M. hominis* como *U. urealyticum* pueden aislarse en el aparato genital de hombres y mujeres asintomáticos.^{289,291,292} McCormack y cols. demostraron que las tasas de colonización por *M. hominis* y *U. urealyticum* en hombres variaban de 0% a

13% y de 3% a 56%, respectivamente.^{289,290} Datos similares en mujeres mostraron que las tasas de colonización vaginal para *M. hominis* y *U. urealyticum* varían de 0% a 31% y de 8,5% a 77,5%, respectivamente, de acuerdo con la edad, la raza, las relaciones sexuales y el nivel socioeconómico.^{289,290,292} Las tasas de colonización del aparato genital tanto en hombres como en mujeres se relacionan con la actividad sexual, y los individuos con parejas sexuales múltiples tienen mayores probabilidades de estar colonizados. Por consiguiente, la epidemiología de adquisición del microorganismo sugiere que estos micoplasmas en realidad son transmitidos por contacto sexual. Otro dato adicional en favor del contagio sexual son las tasas de aislamiento mucho más bajas en las mujeres que utilizan anticonceptivos de barrera.²⁹² Con estos datos, es claro que estos microorganismos son mucho más prevalentes, en particular en la localización vulvovaginal de mujeres sexualmente activas.

En los últimos años, *U. urealyticum* y *M. hominis* se han implicado en una diversidad de cuadros clínicos relacionados sobre todo con la colonización y la infección de los genitales externos e internos femeninos y, en raras oportunidades en varones, infección de los genitales internos y prostatitis.^{111,151,188,339} Se ha postulado que ambos microorganismos se relacionan con la endometritis temprana y tardía, la corioamnionitis y la rotura prematura de membranas.^{99,111,137} La presencia de *U. urealyticum* en el aparato genital, en particular, se asoció estadísticamente con prematuridad, recién nacidos con bajo peso al nacer y esterilidad.^{113,137,151,207} Es complicado realizar estudios controlados sobre la patogenicidad de los micoplasmas genitales porque ambos microorganismos presentan una prevalencia muy elevada en adultos asintomáticos sexualmente activos. Como aspectos que confunden aún más la etiología, los micoplasmas genitales suelen aislarse por cultivo junto con otros patógenos genitales reconocidos, como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y estreptococos del grupo B.⁸ Estas asociaciones hacen difícil determinar si un cuadro patológico se atribuye sólo a la presencia de micoplasmas genitales per se. Un ejemplo excelente de este dilema es el cuadro clínico conocido como vaginosis bacteriana. *M. hominis* está asociado con vaginosis bacteriana y a menudo se lo aísla en mujeres con esta infección.^{160,211,238} Sin embargo, en la actualidad se sabe que la vaginosis bacteriana es la consecuencia de la interacción compleja entre bacterias aerobias y anaerobias. La participación de los micoplasmas genitales en este trastorno no ha sido dilucidada, pero no se ha confirmado una relación causal entre *M. hominis* y vaginosis bacteriana. Los estudios sobre la patogenicidad de los micoplasmas genitales son aún más confusos por el aislamiento de los microorganismos durante o después de la administración de antimicrobianos contra otros patógenos genitales.⁷³ El tratamiento antimicrobiano para estos otros microorganismos pueden producir la selección de micoplasmas resistentes a los agentes que se están utilizando (p. ej., penicilinas y cefalosporinas). Tras su aislamiento a partir de un cultivo genital o un sitio de lesión, se hace difícil adjudicar un papel etiológico de los microorganismos en vista de la administración previa o en curso de antibióticos.

M. hominis y *U. urealyticum* se han aislado por hemocultivos en mujeres con fiebre posparto.^{88,111,112,239,293,315} En cerca del 10% de las mujeres con fiebre posparto o posaborto se aísla *M. hominis* o *U. urealyticum* en los hemocultivos. En algunos casos, ya sea micoplasma o ambos pueden aislarse en los hemocultivos, junto con otros microorganismos del aparato genital que, como ya se dijo, confunden el papel etiológico de los micoplasmas. La bacteriemia posparto es la consecuencia

del ascenso de los microorganismos desde la vagina al endometrio, donde en apariencia los microorganismos causan endometritis. La infección de las membranas placentarias y el líquido amniótico por micoplasmas sucede con más frecuencia en las mujeres colonizadas que sufren rotura prematura de membranas y trabajo de parto prolongado o pretérmino.¹²⁵ Desde estos sitios, los microorganismos ingresan en el torrente circulatorio durante el trabajo de parto y el parto o después de una cesárea. También se ha documentado bacteriemia por *U. urealyticum* como complicación en mujeres sometidas a histerectomía.⁸³

El aislamiento de micoplasmas en los genitales externos de mujeres embarazadas se asocia con varias complicaciones del embarazo, como dar a luz a recién nacidos con bajo peso. En un estudio realizado por Kass y cols., en las mujeres cuyo aparato genital estaba colonizado por *U. urealyticum* y con una respuesta de anticuerpos de cuatro veces o más contra el microorganismo hubo una tasa de 30% de recién nacidos con bajo peso, mientras que en las mujeres colonizadas sin respuesta de anticuerpos esta tasa fue de 7,3%.²⁰⁷ Además, la respuesta de anticuerpos fue específica de serotipo, lo que sugiere que la tasa adicional de bajo peso al nacer se relacionaba con infección reciente por un nuevo serotipo de *U. urealyticum* que difería del o de los serotipos ya presentes en la vagina. Un estudio que analizó la relación entre las dos bivariedades de *U. urealyticum* y la evolución del embarazo encontró que la biovariedad *urealyticum* se asociaba con más problemas de bajo peso al nacer, bajo peso para la edad gestacional y parto prematuro que la biovariedad *parvo*.¹ Los estudios de tratamientos con tetraciclina o eritromicina mostraron reducciones de las tasas de bajo peso al nacer, lo que implica que la erradicación de micoplasmas (u otros microorganismos) del aparato genital puede tener un efecto beneficioso directo sobre ciertas complicaciones del embarazo.²⁰⁷

Las infecciones amnióticas por *U. urealyticum* pueden hallarse en mujeres asintomáticas con membranas fetales intactas y estas infecciones se asocian con frecuencia con complicaciones del embarazo.^{52,138,171,505} *U. urealyticum* es capaz de iniciar una respuesta tisular inflamatoria intensa, sin síntomas asociados y evidencia serológica de respuesta de anticuerpos contra estos microorganismos y el aislamiento simultáneo de ureaplasmas en la sangre parece confirmar la posibilidad de infecciones amnióticas asintomáticas.^{52,127} Gray y cols. estudiaron dos grupos de mujeres embarazadas asintomáticas, ajustados por edad materna, edad gestacional e indicación de amniocentesis.¹³⁸ Las muestras obtenidas por amniocentesis transabdominal se cultivaron para micoplasmas. Entre las 86 mujeres en el grupo negativo para ureaplasma se observó una incidencia del 1,2% de aborto espontáneo en el segundo trimestre y una tasa de prematuridad del 9,3%, para una tasa global de resultados adversos del 10,5%. Sin embargo, la tasa de complicaciones en las ocho mujeres positivas para ureaplasma fue del 100%, lo que representa un riesgo 8,6 veces mayor. Entre las complicaciones se observaron aborto espontáneo (75%), partos prematuros con una tasa de mortalidad del 50% (25%) y enfermedad de las membranas hialinas (observada en el único recién nacido sobreviviente). La introducción de microorganismos en el líquido amniótico es también un paso crucial en el desarrollo de corioamnionitis y endometritis. La observación histológica de los tejidos placentarios de las ocho mujeres infectadas reveló corioamnionitis en la totalidad de ellas y las siete muestras de tejido pulmonar de los lactantes evidenciaron neumonía.¹³⁸ Cuatro de las cinco placentas y tres de las cinco muestras de tejido pulmonar fetal que se cultivaron mostraron el

desarrollo de *U. urealyticum*. Horowitz y cols. también mostraron que el 50% de seis mujeres con cultivos positivos de líquido amniótico en el segundo trimestre para *U. urealyticum* presentaron complicaciones del embarazo, en comparación con el 12% de 123 mujeres con cultivos de líquido amniótico negativos.¹⁷¹ Eschenbach hizo una revisión de la información relacionada con la participación de *U. urealyticum* en las complicaciones del embarazo y concluyó que, aunque la presencia de *U. urealyticum* en los genitales externos no se asoció con parto prematuro, su presencia en el corion se asociaba firmemente con evidencia histológica de corioamnionitis y débilmente con parto prematuro como complicación.¹¹³ En otro estudio que evaluó la colonización endocervical por *U. urealyticum* y las respuestas serológicas contra este microorganismo, Horowitz y cols. encontraron que la colonización cervical, cuando se asocia con títulos elevados contra *U. urealyticum*, identifica una población de mujeres con riesgo de complicaciones del embarazo.^{169,170} Aunque está bien establecido que las mujeres sanas colonizadas con *M. hominis* en el aparato genital por lo general dan a luz a recién nacidos sanos colonizados, en ocasiones *M. hominis* se ha asociado con corioamnionitis, aborto, mortinatos y muerte fetal intrauterina.²⁹⁶

En algunos casos, se observó que la infección placentaria a priori contribuye a endometritis ulterior, rotura prematura de membranas y parto prematuro. La colonización de la placenta permite la infección del endometrio, a partir del cual los microorganismos pueden acceder a la circulación. El aislamiento de *U. urealyticum* y *M. hominis* en el tejido endometrial después del parto ha establecido que los micoplasmas y los ureaplasmas, en particular, son causas probables en algunos casos de endometritis de comienzo temprano y tardío. La endometritis posparto es una complicación importante del embarazo y aparece con más frecuencia después de la cesárea que del parto vaginal. En un estudio, la endometritis afectó el 28% de las mujeres con *U. urealyticum* presente en el corioamnion en el parto por cesárea, en comparación con sólo el 8,4% si el cultivo era negativo y el 8,8% si sólo había bacterias distintas de *U. urealyticum*.¹² Estos investigadores concluyeron que la colonización corioamniótica con *U. urealyticum* en mujeres con membranas intactas sometidas a cesárea fue un factor predictivo independiente de endometritis ulterior. Con posterioridad, un ensayo clínico aleatorizado sobre profilaxis con antimicrobianos de espectro ampliado activos contra *U. urealyticum* en mujeres sometidas a cesárea encontró que estos fármacos reducen la incidencia de endometritis posparto.¹¹ Aunque sugerida por algunos estudios, no se ha demostrado de manera inequívoca una relación causal definida entre micoplasmas genitales y enfermedad inflamatoria pélvica (salpingitis).^{41,111,253,391,419}

Debido a las tasas elevadas de colonización de micoplasmas genitales en hombres y mujeres, también se han evaluado estos microorganismos en relación con la esterilidad involuntaria. De nuevo, aunque algunos estudios sugieren una posible participación de estos microorganismos en esta afección no existen pruebas que indiquen que sean la causa de esterilidad masculina o femenina.⁴²⁶ En un estudio realizado en 2002 de 50 mujeres estériles y 46 fértiles, *M. hominis* se aisló en el aparato genital del 8% de las mujeres estériles y en ninguna de los controles.¹¹⁸ *U. urealyticum* se aisló en el 56% de las mujeres estériles y en el 39% de las mujeres control; esta diferencia no fue estadísticamente significativa, pero los autores sugieren que puede existir una asociación entre esterilidad y *U. urealyticum*. En un estudio de 92 parejas estériles, 12 varones asintomáticos (13%) tenían *U. urealyticum* en su esperma. De nuevo, estos investigadores sugirieron que *U. urealyticum* puede participar

en la esterilidad en ausencia de otras alteraciones.²⁴⁷ Se ha observado in vitro que *U. urealyticum* se adhiere a los espermatozoides, lo que produce reducciones importantes en su movilidad y alteraciones en las membranas celulares.³²⁵ Las imágenes por microscopía electrónica de barrido de estas células revelan espermatozoides con masas de *U. urealyticum* adheridos a su cabeza junto con otras alteraciones estructurales. Por consiguiente, estos investigadores también sugirieron una posible participación de *U. urealyticum* en la esterilidad debido a alteraciones en la estructura y la movilidad de los espermatozoides.³²⁵ Sin embargo, otro estudio no encontró diferencia en la calidad de los espermatozoides de hombres con cultivos positivos y negativos para *M. hominis* o *U. ureaplasma*, evaluada por la densidad, la vitalidad, la movilidad y la morfología de los espermatozoides.¹⁰

U. urealyticum puede tener relación con casos de aborto espontáneo por su capacidad para causar corioamnionitis pero, a semejanza con otros trastornos descritos antes, no se han obtenido pruebas definitivas. Joste y cols. examinaron 42 abortos espontáneos durante el primer trimestre y 21 abortos electivos durante el mismo período y los compararon en cuanto a la histología y los cultivos con 32 partos prematuros en el tercer trimestre, 11 de los cuales presentaban cultivos positivos para *U. urealyticum*.²⁰³ Entre las muestras obtenidas de abortos espontáneos ocurridos en el primer trimestre de gestación, en el 26% se observó desarrollo de ureaplasmas, mientras que los cultivos fueron negativos en las 21 muestras de abortos electivos. La evidencia histológica de corioamnionitis no se asoció con la positividad de los cultivos de las muestras de aborto espontáneo. Sin embargo, la presencia de corioamnionitis se relacionó con cultivos positivos para ureaplasma en los 11 partos prematuros en el tercer trimestre. Estos investigadores postularon que los cambios tempranos causados por la infección por *U. urealyticum* distintos de la corioamnionitis evidenciada por la histología pueden ser los determinantes de la patología de los abortos espontáneos relacionados con la infección por ureaplasmas.²⁰³ Un estudio llevado a cabo en Bélgica entre 1989 y 1994 analizó las posibles relaciones entre el diagnóstico de vaginosis bacteriana durante el primer trimestre y aborto espontáneo de menos de 20 semanas de gestación. Se notó una asociación firme entre vaginosis bacteriana y aborto espontáneo.¹⁰⁰ En un análisis multifactorial, *M. hominis* y *U. urealyticum*, pero no otros microorganismos, mostraron una asociación estadísticamente significativa con el aumento del riesgo de aborto espontáneo. Sin embargo, otro estudio publicado en 2004 no halló asociación entre abortos espontáneos del primer trimestre y la presencia de micoplasmas o ureaplasmas en las placentas expulsadas.²⁸⁷ Un estudio que examinó muestras para la investigación de biovariedades específicas de *U. urealyticum* encontró que la biovariedad *urealyticum* era más frecuente en las pacientes con enfermedad inflamatoria pélvica y en las que tuvieron aborto espontáneo.¹

También se informaron infecciones urinarias causadas por micoplasmas y, nuevamente, la mayor parte de la investigación en esta área ha sido en mujeres embarazadas. La determinación de la importancia de micoplasmas en muestras urinarias obtenidas por micción espontánea en condiciones adecuadas es difícil debido a la probable contaminación por microorganismos que colonizan la vagina y la porción distal de la uretra. Dada la reconocida asociación entre bacteriuria durante el embarazo y el aumento de la incidencia de parto prematuro y preeclampsia, Savige y cols. recolectaron muestras de orina vesical por punción suprapúbica en 72 mujeres embarazadas sanas y en 51 mujeres con preeclampsia y cultivaron las mues-

tras de orina para micoplasmas.³⁸⁶ *U. urealyticum* se aisló en la orina del 7% de las mujeres sanas y del 20% de las que padecían preeclampsia. En un estudio posterior sobre bacteriuria en 340 mujeres embarazadas, la presencia de *U. urealyticum* en la orina durante el primer trimestre se correlacionó con el desarrollo de preeclampsia durante el tercer trimestre de embarazo.¹²⁹ Entre las 21 mujeres que desarrollaron preeclampsia, el 29% tenía ureaplasmas en la orina durante el primer trimestre, en comparación con sólo el 10% de las pacientes en quienes no se desarrolló preeclampsia. En consecuencia, la aparición de preeclampsia fue tres veces más probable en las mujeres que tenían ureaplasmas en la orina al comienzo del embarazo que en las que tenían cultivos negativos. Aunque los mecanismos implicados en la patogenia de la preeclampsia no son claros, se sugiere que los ureaplasmas, similar a otras bacterias que producen bacteriuria, también pueden contribuir a complicaciones del embarazo. En otro estudio de micoplasmas realizado en 48 mujeres con síntomas crónicos de infección urinaria, 23 (48%) presentaron cultivos positivos; en 22 se aisló *U. urealyticum* y en 1, *M. hominis*.³⁵¹ Tras el tratamiento específico, los cultivos de todas las mujeres fueron negativos y 21 de las 23 mujeres infectadas experimentaron alivio de los síntomas crónicos. Estos investigadores concluyeron que tras la exclusión de agentes habituales de infecciones urológicas, alteraciones anatómicas y disfunciones neurológicas, debe hacerse un cultivo para micoplasmas e implementar, eventualmente, un tratamiento específico contra ellos antes de considerar otros procedimientos diagnósticos.³⁵¹

En los varones, *M. hominis* es relativamente infrecuente como causa de enfermedad clínica y la mayoría de las investigaciones sobre micoplasmas se han concentrado en la asociación de *U. urealyticum* con la uretritis no gonocócica y no clamidial (UNGNC). Está bien confirmado que *Chlamydia trachomatis* es el agente etiológico que produce del 30% al 50% de uretritis aguda no atribuible a *N. gonorrhoeae* y se ha hecho una asociación importante entre UNGNC y *Mycoplasma genitalium*, que puede determinar del 15% al 25% de los casos de UNGNC aguda.^{90,91,164} Aunque se han realizado varios estudios, el papel de *U. urealyticum* en la uretritis masculina no está totalmente claro. Aunque los datos más tempranos sugieren que *U. urealyticum* es la causa de algunas UNGNC, no se sabe qué proporción de infecciones se deben a este microorganismo e incluso si el microorganismo está presente en la uretra de varones sintomáticos, no puede establecerse su papel como agente causal. Estudios en varones sintomáticos tratados con antibióticos con actividad diferencial entre *Chlamydia trachomatis* y *U. urealyticum* y cultivos realizados en hombres con síntomas persistentes de uretritis tras tratamientos específicos contra gonococos y clamidias sugirieron que algunos casos de uretritis no gonocócica son causados por *U. urealyticum*.^{73,431} El uso de métodos moleculares altamente sensibles junto con respuestas serológicas ha proporcionado información respecto del papel de *U. urealyticum* en la uretritis no gonocócica. Un estudio realizado por Horner y cols. con análisis multifactorial determinó que *U. urealyticum* no se asocia con UNGNC aguda, pero se asoció con UNGNC crónica, la cual fue definida para el estudio como la uretritis que aparecía 30 a 92 días después del inicio del tratamiento.^{165,166} Estos investigadores concluyeron que los ureaplasmas eran una causa probable de UNGNC crónica que apareció después del tratamiento. Un estudio realizado en 2004 en Japón informó una asociación significativa entre *U. urealyticum* y UNGNC y sugirió que la presencia de *U. parvum* en la uretra puede reflejar colonización y no infección.⁹³ Otros estudios recientes que utilizan técnicas moleculares sensibles

establecieron que *U. urealyticum* se asocia con algunos casos de UNGNC y que *U. parvum* se observa con más frecuencia en infecciones asintomáticas, aunque algunos pacientes pueden ser sintomáticos.^{353,507}

Los ureaplasmas también pueden estar implicados en la etiología de la prostatitis crónica. Mediante el empleo de técnicas clásicas para la localización de las infecciones en la próstata, varios investigadores confirmaron *U. urealyticum* como el causal de una pequeña proporción de casos de prostatitis crónica.^{326,327,339,402} En un estudio realizado en 2002 en Croacia, *U. urealyticum* fue el único agente aislado en el líquido prostático del 2,54% de 276 pacientes con infección prostática crónica.⁴⁰² En un estudio en Japón, *U. urealyticum* se aisló en secreciones de líquido prostático de 18 de 143 pacientes con prostatitis.³²⁷ El tratamiento dirigido contra el ureaplasma erradicó a los microorganismos junto con la resolución de los síntomas, lo que sugiere que era el agente causal en estos pacientes. *U. urealyticum* es una causa rara de epididimitis; se ha informado un único caso en que los microorganismos se aislaron en una muestra obtenida por punción y aspiración del epidídimo asociado con un aumento significativo de anticuerpos contra el microorganismo.¹⁸⁸

Con frecuencia, los niños nacidos de madres colonizadas por micoplasmas genitales también están colonizados. En estudios estadísticos, entre el 18% y el 45% de los recién nacidos de madres colonizadas también estaban colonizados por *M. hominis*, y con cultivos positivos de fauces, aparato genital u orina.^{99,111} La tasa de transmisión vertical de *U. urealyticum* varía del 18% al 55% entre los recién nacidos a término y del 29% al 55% entre los prematuros.³⁷⁸ Syrogiannopoulos y cols. realizaron cultivos de muestras de fauces, ojos y vagina de 193 recién nacidos de término de mujeres colonizadas en la vagina por *U. urealyticum*.⁴²² De éstos, 107 (55%) tenían *U. urealyticum* presente en al menos un sitio de cultivo. La colonización puede persistir en estos niños durante períodos prolongados sin efectos morbidos para ellos. En este último estudio, el 68%, el 33% y el 37% de los niños que presentaban colonización en el momento de nacer en fauces, ojos y vagina, respectivamente, seguían colonizados a los 3 meses de edad. En los niños que presentaban colonización del aparato respiratorio, no hubo aumento de la incidencia de enfermedades respiratorias cuando se compararon con niños sin colonización en esa área. En un estudio realizado en Israel, 24% de 99 recién nacidos prematuros estaban colonizados con micoplasmas; *U. urealyticum* se aisló en 21 recién nacidos y *M. hominis*, en tres.¹⁸¹ En este estudio, la tasa de colonización presentó una correlación inversa con la edad gestacional; el 80% de los recién nacidos menores de 28 semanas de gestación estaban colonizados, en contraposición con el 17,9% de los nacidos a las 28 a 36 semanas de gestación.¹⁸¹ De los 27 recién nacidos que precisaron asistencia respiratoria mecánica en este estudio, en el 22% se aisló *U. urealyticum* de las secreciones respiratorias bajas.

Varios estudios han sugerido que *U. urealyticum* se asocia con enfermedad pulmonar crónica, displasia broncopulmonar, hipertensión pulmonar persistente e infección sistémica en recién nacidos prematuros.^{29,51,53,142,338,476,478,482} Estudios prospectivos y otros en modelos animales han mostrado una relación significativa entre infecciones respiratorias por *U. urealyticum* y el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica del recién nacido.^{74,373,482} Cassell y otros investigadores hallaron que el aislamiento de *U. urealyticum* en la tráquea de recién nacidos con un peso menor de 1 000 g, que también requirieron asistencia respiratoria, se relacionaba con el desarrollo de displasia broncopulmonar y trastornos asociados (p. ej., enfer-

medad de las membranas hialinas, conducto arterioso permeable y neumonía).⁵¹ Un estudio ulterior realizado por Crouse y cols. mostró que los recién nacidos de bajo peso al nacer con dificultad respiratoria, de los que se había aislado *U. urealyticum* en cultivos de tráquea, tenían más probabilidad de presentar displasia y evidencia de neumonía en la radiografía de tórax que aquellos en quienes no se había aislado este microorganismo.⁷⁴ La colonización nasofaríngea o traqueal de los recién nacidos prematuros con *U. urealyticum* también se asoció con un recuento elevado en leucocitos en sangre periférica.³²⁸ Sanchez y Regan encontraron que en los recién nacidos colonizados por ureaplasmas en el aparato respiratorio en el 30% de los casos se desarrolla enfermedad pulmonar crónica que requiere asistencia respiratoria mecánica, mientras que la enfermedad respiratoria se observó sólo en el 8% de los recién nacidos no colonizados.³⁷⁹ La infección del torrente circulatorio por *U. urealyticum* se ha documentado en recién nacidos y estas infecciones a menudo se asocian con infecciones respiratorias coexistentes.^{45,29,476} Estas infecciones sistémicas se vinculan con infecciones urinarias, rotura prolongada de membranas, trabajo de parto prematuro y corioamnionitis en la madre, y con bajo peso al nacer, presencia de anomalías congénitas y asfisia perinatal en el recién nacido.⁴⁷⁶ La patogenia de este síndrome en el neonato fue apoyada por modelos animales y refleja la naturaleza de estas bacterias como agentes oportunistas y el estado de inmunodepresión del recién nacido prematuro. Estudios con cultivos de fibroblastos de pulmón neonatal han demostrado la inducción de la liberación de citocina desde estas células por infección por *U. urealyticum* in vitro, que sugiere alguna participación de las citocinas en la patogenia de la displasia broncopulmonar en la prematuridad.⁴⁰⁹ Los estudios serológicos indican que el neonato o el feto con infección sistémica por *U. urealyticum* elabora anticuerpos de IgM e IgG antiureaplasma específicos contra la serovariedad, lo que provee evidencia adicional del potencial patógeno de estos microorganismos.³⁵⁶

Varios informes y estudios mostraron que *U. urealyticum* y *M. hominis* se aíslan con poca frecuencia en el SNC como causa de meningitis asintomática o clínica sintomática en el período neonatal.⁴⁶⁸ Se describieron numerosos casos de infecciones neonatales por *M. hominis* del SNC; la mayoría de éstos afectaron a recién nacidos prematuros en quienes se confirmó la rotura prematura de membranas, aunque también se describieron casos en recién nacidos de término.^{9,294,496} En un estudio prospectivo de 100 recién nacidos prematuros, Waites y cols. aislaron *U. urealyticum* en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de ocho y *M. hominis* en el LCR de cinco.⁴⁷⁹ Entre los niños con infección por *U. urealyticum*, seis presentaban hemorragia intraventricular, tres hidrocefalia y tres murieron. Ninguno de los recién nacidos con infección por *M. hominis* falleció y uno presentó signos neurológicos de meningitis. Sin embargo, Gilbert y Drew comunicaron un caso de meningitis en un recién nacido prematuro causada por *M. hominis* que siguió una evolución crónica, con el desarrollo de hemorragia intraventricular.¹²⁸ En todos estos casos la erradicación de los microorganismos con antibioticoterapia fue difícil. En un estudio de 318 con predominio de recién nacidos de término con signos de presunta sepsis o meningitis y madres con bajo riesgo, *M. hominis* se aisló en el LCR de 9 y *U. urealyticum* en el LCR de 5.⁴⁷⁶ De estos 14 recién nacidos infectados, 12 se recuperaron sin tratamiento y 2 murieron: 1 con *M. hominis* falleció por sepsis por *Haemophilus influenzae* mientras que el otro, infectado por *U. urealyticum*, presentó hemorragia intraventricular. Este estudio sugirió que los micoplasmas son más fre-

cuentes en las infecciones neonatales del SNC que lo percibido con anterioridad. Aunque las infecciones del SNC por *M. hominis* suelen resolverse de modo espontáneo, los ureaplasmas pueden desencadenar respuestas inflamatorias que se asocian con hemorragia intraventricular.¹⁵⁶

Además de las infecciones del SNC, los micoplasmas, en especial *M. hominis*, también se han aislado en otras infecciones extragenitales en niños y adultos. *M. hominis* adquirido en el período perinatal fue aislado en abscesos subcutáneos del cuero cabelludo por lesiones producidas por fórceps, en el monitor, en infecciones conjuntivales y en ganglios linfáticos submandibulares del recién nacido.^{43,131,354} *M. hominis* también se aisló en hemocultivos múltiples de niños de 10 meses de edad que habían sufrido quemaduras graves.⁷⁹ En adultos, *M. hominis* se cultivó a partir de una amplia variedad de infecciones, como bacteriemia, infecciones de heridas posquirúrgicas y poshisterectomía, hematomas, artritis séptica, empiema asociado con aspiración, tromboflebitis séptica, peritonitis, abscesos periorbitales, abscesos intraabdominales y retroperitoneales y abscesos cerebrales.^{44,68,126,221,245,278,285,295,306,307,337,362} En pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica también se observaron bacteriemia e infecciones posquirúrgicas de la herida esternal por *M. hominis*.^{311,404} En otro informe de casos sobre infección de la herida esternal por *M. hominis*, también se aisló *U. urealyticum*.³⁴⁸ Se informó endocarditis por *M. hominis* a causa de una valvuloplastia y ambos, *M. hominis* y *U. urealyticum*, se aislaron en tejidos o líquidos pericárdicos de pacientes con derrame pericárdico.^{35,212} Los pacientes con estas infecciones tenían antecedentes de cirugía cardíaca reciente (p. ej., cirugía de bypass coronario, reemplazo de la válvula aórtica, trasplante cardíaco por miocardiopatía dilatada idiopática) o eran inmunodeprimidos (p. ej., lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica).²¹² *M. hominis* también se aisló en infección de la herida quirúrgica tras la inserción de una prótesis mamaria de silicona.³⁸¹

M. hominis y *U. urealyticum* pueden comportarse como agentes infecciosos oportunistas en pacientes con enfermedades subyacentes, como hipogammaglobulinemia, enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso sistémico, trasplante renal, cardiopatía, leucemia, linfoma, artritis reumatoide y traumatismo grave.^{68,205,276,304,307,330,336,435,449} Se informaron cepas de *M. hominis* y *U. urealyticum* a partir de artritis séptica en pacientes con hipogammaglobulinemia, procesos hemáticos malignos, traumatismo masivo, bacteriemia posparto, lupus eritematoso e inmunodeficiencia común variable; es probable que esta entidad clínica suceda por siembra hemática de los espacios articulares.^{47,68,202,449} En 1994, Kane y cols. comunicaron el primer caso de infección respiratoria con hemorragia alveolar difusa causada por *M. hominis* en el receptor de un trasplante de médula ósea.²⁰⁵ *M. hominis* se aisló en hematomas perihepáticos posquirúrgicos que se formaron en el abdomen del receptor de un trasplante hepático un mes después de la cirugía.¹⁸⁷ *M. hominis* y *U. urealyticum* se aislaron en un hematoma retroperitoneal 12 días después del trasplante hepático en una mujer de 45 años con insuficiencia hepática fulminante.¹⁴¹ También se confirmaron infecciones de articulaciones protésicas por *M. hominis* e infecciones de heridas quirúrgicas por este microorganismo tras la reducción abierta de fracturas mandibulares como también después de operaciones cesáreas.^{346,404} Las infecciones en la región de la cabeza, el cuello y el tórax, y en el tejido contiguo con el aparato genital pueden reflejar la presencia de estos microorganismos en los aparatos respiratorio y urogenital, respectivamente.^{306,362} Por ejemplo, Kayser y Bhend informaron un caso de infección de los tejidos blandos paraes-

pinales e intervertebrales en una mujer de 45 años que se presentó a los 16 días de ser sometida a una histerectomía abdominal.²¹⁰

M. hominis también se aisló en la orina de pacientes con infección por HIV. En un estudio realizado por Chirgwin y cols. en la State University of New York en Brooklyn, *M. hominis* se aisló en el 18% de las muestras de orina obtenidas de 180 individuos HIV positivos y en el 21% de las muestras de orina de 38 individuos HIV negativos.⁶² En este estudio, se aislaron otros 30 micoplasmas que utilizan la glucosa sólo de individuos HIV positivos.⁶² La inhibición del crecimiento con antisueros específicos permitió la identificación de 18 de estas cepas: 14 se identificaron como *M. fermentans* y 4 como *M. pirum*. Las 12 cepas aisladas restantes no resultaron viables en los subcultivos.

Mycoplasma genitalium

En 1981, Tully y cols. aislaron un micoplasma con características inusualmente exigentes, no descrito antes, en muestras uretrales de dos de 13 varones homosexuales con UNGNC.⁴⁵⁸ Aunque fracasaron varios intentos posteriores para aislar este microorganismo nuevo, otras cepas del mismo microorganismo se aislaron en muestras urogenitales en China.²⁷⁵ En 1983, esta nueva especie se denominó *M. genitalium*.⁴⁵⁹ El examen de estas cepas en el microscopio electrónico mostró que el nuevo microorganismo comparte varias características con *M. pneumoniae*, como el aspecto de las células individuales similar a una redoma cónica y la presencia de una estructura apical especializada que facilita la adherencia del microorganismo a células tisulares, eritrocitos y material inerte, como plástico y vidrio.⁴⁵⁹ *M. genitalium* tiene una proteína específica de especie de 140 kDa conocida como P140, que es una contraparte estructural y funcional de la proteína citoadhesina P1 de 170 kDa de *M. pneumoniae*.³¹⁰ Las variantes no adherentes de *M. genitalium* tienen una adhesina P140 alterada o han perdido la molécula adhesina asociada con la membrana.²⁹⁹ *M. genitalium* y *M. pneumoniae* contienen una proteína de 43 kDa que presenta reacción cruzada que también se detecta en las cepas aisladas de *Acholeplasma laidlawii*.⁶⁵ Estos comparten epítomos antigénicos que con probabilidad son los que determinan las reacciones serológicas cruzadas observadas con *M. genitalium* en la mayoría de las pruebas para anticuerpos contra *M. pneumoniae*, como fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta y pruebas de inhibición metabólica y de inhibición del crecimiento mediante el empleo de antisueros heterólogos.^{77,78,254} Los estudios de hibridación del DNA mostraron que los dos microorganismos tienen homología del 6,5-8,1% en la secuencia nucleotídica, lo que tal vez refleje aquellos genes que codifican las proteínas antigénicas que reaccionan en forma cruzada.^{254,504} Otras secuencias génicas son en realidad únicas para esas dos especies, lo que provee evidencia de que *M. pneumoniae* y *M. genitalium* son especies separadas.⁴⁵⁹

En un comienzo, los estudios epidemiológicos por cultivo y serología establecieron una relación entre estas especies de *Mycoplasma* con requerimientos nutricionales especiales y UNGNC. En un estudio realizado por Taylor-Robinson y cols., se detectaron títulos de anticuerpos contra *M. genitalium* en 4 de 14 pacientes con UNG y en 2 de 17 pacientes sin uretritis, pero sólo 1 de los 4 pacientes que presentó seroconversión tenía un cultivo positivo.⁴³³ La imposibilidad de aislar los microorganismos en estudios sobre uretritis tal vez refleje la falta de técnicas adecuadas para obtener cultivos confiables de estas especies con requerimientos nutricionales especiales.

Para sortear los problemas inherentes al cultivo, Hooton y cols. investigaron la incidencia de *M. genitalium* en varones mediante sondas de ácido nucleico específicas de especie preparadas a partir del DNA genómico de *M. genitalium*.¹⁶³ Estos investigadores detectaron el microorganismo en el 14% de 21 varones con uretritis gonocócica, 10% de 30 varones con uretritis por clamidias, 13% de 31 varones con UNGNC y 27% de 37 varones con uretritis recurrente o persistente. Sin embargo, el microorganismo también se detectó en el 12% de 84 hombres sin síntomas genitourinarios. En 1996, Jensen y cols. pudieron aislar cuatro cepas de *M. genitalium* en muestras uretrales de varones con UNGNC; estos pacientes también eran positivos por PCR.¹⁹³ Mediante el empleo de una técnica de PCR basada en sonda que detectó la secuencia nucleotídica específica del gen para la adhesina de 140 kDa de *M. genitalium*, Jensen y cols. encontraron DNA de *M. genitalium* en el 17% de las muestras uretrales de 99 varones; el 20% de las muestras de varones sintomáticos fueron positivas, mientras que sólo el 9% de las los asintomáticos lo eran.^{195,196} En este estudio, todos los intentos para cultivar el microorganismo de las muestras positivas por PCR resultaron insatisfactorios. Horner y cols. también utilizaron la técnica de PCR mediante sondas para la detección de *M. genitalium* y hallaron que el 23% de 103 varones con signos o síntomas de UNGNC aguda y el 6% de 53 varones sin UNGNC eran positivos.¹⁶⁴ La presencia de este microorganismo en el aparato urogenital masculino era independiente de la presencia de *Chlamydia trachomatis*. Mediante técnicas de PCR, el mismo grupo de investigación no pudo detectar *M. fermentans*, *M. penetrans* ni *M. pirum* en muestras uretrales de pacientes con UNGNC.⁸⁹ Estos investigadores concluyeron que *M. genitalium* era el agente etiológico en muchos casos de UNGNC; esto también estuvo avalado por la respuesta clínica de los hombres infectados al tratamiento con doxiciclina.¹⁶⁴

En la actualidad, varios estudios que emplean técnicas moleculares han establecido que *M. genitalium* es la causa del 18,4% al 45,5% de todos los casos de UNGNC en los varones y que la persistencia de los microorganismos en la uretra tras el tratamiento antimicrobiano se asocia con uretritis no gonocócica persistente o recurrente.^{91,190,279,298,439,452} Los métodos moleculares de detección de *M. genitalium* incluyen los ensayos de PCR convencionales y en tiempo real que amplifican el gen para la adhesina (MgPa) específica de *M. genitalium* o regiones específicas de especie del gen rRNA 16S.^{94,109,192,506} El uso de los ensayos en tiempo real para la detección de *M. genitalium*, en las muestras de orina de la primera parte de la micción dio resultados cuantitativos que evidencian que las cantidades de *M. genitalium* en esas muestras de varones sintomáticos son mucho más elevadas que las observadas en varones asintomáticos. En varones con uretritis no gonocócica por *M. genitalium* la proliferación de microorganismos se suprimió durante el tratamiento con levofloxacina y los pacientes se tornaron asintomáticos. Tras el tratamiento, a menudo se constató ausencia de síntomas, pero persistencia de microorganismos en la uretra. La reaparición de los síntomas se asoció con un aumento de la cantidad de microorganismos en pacientes en quienes el tratamiento fracasó. Estos estudios sugieren que para evitar que la uretritis asociada con *M. genitalium* conduzca a la recurrencia ulterior de UNGNC es necesaria la antibioticoterapia con erradicación del microorganismo del aparato genital.⁹⁴

En 1988, Baseman y cols. aislaron *M. genitalium* junto con *M. pneumoniae* en 4 de 16 muestras congeladas recolectadas de las vías respiratorias de reclutas militares durante un ensayo de vacuna contra *M. pneumoniae* en 1974 y 1975.²⁰ El papel de

M. genitalium en la enfermedad respiratoria no es claro, pero se ha sugerido que la asociación con *M. pneumoniae* puede causar una infección sinérgica que provoca una enfermedad neumónica más grave o puede contribuir a la patogenia de complicaciones extrapulmonares de la infección por *M. pneumoniae*.¹⁹⁰ La presencia de *M. genitalium* en el aparato respiratorio, con *M. pneumoniae* o sin este microorganismo, y la reactividad inmunitaria cruzada entre los dos microorganismos pueden no sólo complicar el proceso infeccioso en individuos coinfectados sino también afectar la respuesta inmunitaria contra la infección. Por consiguiente, estas interacciones pueden interferir en la interpretación de las pruebas serológicas utilizadas con frecuencia para diagnosticar las infecciones por *M. pneumoniae*. El empleo de cebadores de PCR y sondas de ácidos nucleicos específicas de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* puede proporcionar una solución a los problemas clínicos y diagnósticos porque evita la necesidad de cultivar estos agentes y de interpretar las respuestas inmunitarias y las consiguientes reacciones serológicas cruzadas que aparecen con estos microorganismos.¹⁷⁷

Algunos estudios han evaluado la detección y la importancia de *M. genitalium* en el aparato genital femenino.^{15,436} En un estudio llevado a cabo en una clínica de enfermedades de transmisión sexual de Londres, *M. genitalium* se detectó por PCR en muestras genitales del 18% de 57 pacientes mujeres.³³³ Otro estudio, realizado en Copenhague, informó el hallazgo de *M. genitalium* en muestras endocervicales de 5 de 74 mujeres.¹⁹⁶ Ninguno de estos estudios investigó la asociación de estas cepas aisladas con la presencia de enfermedad o patología. Aunque faltan datos definitivos sobre la patogenicidad de *M. genitalium* en el aparato genital femenino, las evidencias indirectas sugieren que también puede estar implicado en la infección tanto de los genitales externos como internos. Un estudio llevado a cabo en Japón halló *M. genitalium* en el 7,8% de 64 mujeres con cervicitis purulenta y estudios realizados en Estados Unidos determinaron que, una vez excluidas las infecciones gonocócicas y por clamidias, las pacientes con cervicitis purulenta tenían una probabilidad de más del triple de presentar *M. genitalium* en el cuello uterino que las que no tenían esa afección.^{281,463} Por otra parte, Casin y cols. examinaron a 170 mujeres con síntomas genitales que asistían a una clínica de enfermedades de transmisión sexual (ETS) de París y no hallaron relación entre mucocervicitis purulenta y la presencia de *M. genitalium*, a pesar del hecho de que el 38% de las mujeres tenían resultados de PCR positivos para *M. genitalium* en uno o más sitios genitales (por lo general vaginal).⁵⁰ También existen evidencias de la implicación de *M. genitalium* en endometritis y enfermedad inflamatoria pelviana aguda. Un estudio realizado en Nairobi, Kenya, en 115 mujeres que presentaban dolor pelviano persistente determinó que el 16% de 58 mujeres con endometritis confirmada por histología eran positivas por PCR para *M. genitalium* en el cuello uterino, el endometrio o ambos.⁷⁰ En otro estudio efectuado en Londres, 13% de 45 mujeres con enfermedad inflamatoria pelviana tenían evidencia por PCR de *M. genitalium* en el endocervix, en comparación con ninguna de las pacientes control.⁴⁰⁰ Los estudios serológicos también han documentado títulos elevados de anticuerpos contra *M. genitalium* en algunas mujeres con enfermedad inflamatoria pelviana no atribuible a gonococos, clamidias o *M. hominis*; en chimpancés inoculados de modo experimental con *M. genitalium* se han desarrollado infecciones de los genitales internos y externos.^{308,434} Algunos estudios serológicos también indican que la infección por *M. genitalium* puede ser un factor de riesgo independiente en la patogenia de un proceso infla-

matorio que puede conducir a la cicatrización de los tejidos uterinos, lo cual da por resultado esterilidad.⁶⁷

M. genitalium también se ha aislado, además de en los aparatos respiratorio y genital, en muestras de líquido articular de pacientes con artritis obtenidas por punción y aspiración. En un informe sobre dos de estos casos, *M. genitalium* se detectó por análisis de PCR en la articulación de la rodilla de un varón de 25 años con síndrome de Reiter y en la de otro de 58 años con artritis reumatoide seronegativa.⁴³⁷ *M. pneumoniae* y *M. genitalium* se detectaron en una muestra de líquido articular de la rodilla de un paciente con hipogammaglobulinemia, neumonía por micoplasma y poliartritis tras una neumonía intensa.⁴⁵⁶

M. genitalium también se asoció con infección por HIV, aunque no en la magnitud de otras especies, como *M. fermentans* y *M. penetrans*. Montagnier y Blanchard detectaron *M. genitalium* por PCR en la sangre de un paciente con SIDA en 1993.³⁰⁹ Sin embargo, una investigación de 1996 para la presencia de seis especies de *Mycoplasma* en células mononucleares de sangre periférica de 154 pacientes seropositivos para HIV, 40 pacientes de la clínica de ETS seronegativos para HIV y 40 donantes de sangre seronegativos para HIV no pudo detectar *M. genitalium* por PCR en ninguno de ellos.²³³ Otra investigación de micoplasmas en la orina en 15 niños HIV seropositivos realizada en 1999 encontró sólo una única muestra positiva para *M. genitalium* en 1 de 9 niños con enfermedad por HIV grave.¹⁷⁶ *M. genitalium* también se detectó por PCR en muestras uretrales y rectales de varones homosexuales con UNGNC y sin ella.⁴³⁸

Mycoplasma fermentans

M. fermentans es una especie de micoplasma humano con requerimientos nutricionales especiales que durante años fue considerado un contaminante de cultivo de tejidos.⁴⁶⁴ El uso creciente de linfocitos y macrófagos provenientes de seres humanos en la investigación inmunológica y viral fue tal vez la razón por la cual se consideró este agente contaminante de cultivo de tejidos. *M. fermentans* ha sido detectado por PCR en muestras de saliva de individuos sanos y también en los aparatos genitourinario y respiratorio de seres humanos.^{61,395} En un estudio realizado en Londres, se empleó un ensayo de PCR para detectar *M. fermentans* en hisopados de fauces y muestras de orina de estudiantes universitarios sanos y de pacientes con inmunodeficiencias congénitas.⁵ De 45 estudiantes en los que se habían recogido ambas muestras de fauces y de orina, 12 (27%) presentaban *M. fermentans* en al menos una de sus muestras. En 19 pacientes con inmunodeficiencias congénitas, una muestra de hisopado de fauces y tres muestras de orina fueron positivas para *M. fermentans* por PCR.

En 1986 se alentó el interés en *M. fermentans* como patógeno humano cuando Lo y cols. en la AFIP y los National Institutes of Health (NIH) informaron el aislamiento de un micoplasma nuevo en tejidos de sarcoma de Kaposi de pacientes con SIDA.^{255,265} A este micoplasma se le dio el nombre provisorio de *Mycoplasma incognitus*.²⁶⁴ Por medio de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales contra este agente nuevo, Lo y cols. detectaron antígenos de *M. incognitus* en timo, hígado, bazo, ganglios linfáticos y tejido cerebral de pacientes con SIDA y en tejidos placentarios después del parto de mujeres embarazadas con SIDA.²⁵⁸ La histopatología de los tejidos infectados mostró diversas respuestas; en algunos no se observaron cambios histológicos mientras que en otros se notó necrosis con inflamación fulminante. La inoculación intraperitoneal de cuatro monos langur plateados con este

agente produjo síndrome consuntivo y muerte en 7 a 9 meses.^{268,270} Estos mismos investigadores también comunicaron sobre seis pacientes, provenientes de seis regiones geográficas diferentes, quienes presentaron una enfermedad aguda gripal y un síndrome con fiebre persistente, linfadenopatía, diarrea e insuficiencia multiorgánica, que produjo la muerte en el transcurso de 1 a 7 semanas. Las autopsias revelaron necrosis fulminante de los tejidos de ganglios linfáticos, pulmones, hígado, glándula suprarrenal, corazón y cerebro. Las técnicas inmunohistoquímicas y la microscopia electrónica revelaron antígenos de micoplasmas en las áreas de necrosis y una sonda de DNA específica marcada detectó el material genético del agente en los tejidos infectados.²⁵⁷ Ninguno de estos pacientes estaba infectado por HIV-1 o HIV-2. Los perfiles de hibridación de ácidos nucleicos, el mapeo de endonucleasas de restricción y los análisis antigénicos indicaron que *M. incognitus* no era un micoplasma nuevo sino una cepa de *M. fermentans*, un micoplasma "no patógeno" con requerimientos nutricionales especiales, encontrado en el aparato genital.^{49,376,383}

Con posterioridad se encontró que la cepa "incognitus" de *M. fermentans* se asocia con otra patología en pacientes con SIDA. Bauer y cols. examinaron tejidos renales de 15 pacientes con SIDA y evidencia por microscopia óptica de neuropatía asociada con el SIDA.²¹ Los tejidos de estos pacientes mostraron reacciones de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de la cepa incognitus de *M. fermentans* en células endoteliales y epiteliales glomerulares, membranas basales glomerulares, células epiteliales tubulares y cilindros, y células intersticiales mononucleares. Las estructuras de los micoplasmas también se observaron por inmunomicroscopia electrónica en tejidos renales de estos pacientes. Los tejidos renales de pacientes con SIDA sin afectación renal y de pacientes sin SIDA con nefropatía y sin ella no revelaron microorganismos en el examen histopatológico.²¹ Ainsworth y cols. también comunicaron el caso de un paciente con nefropatía asociada con HIV en quien *M. fermentans* se detectó en tejidos renales por PCR cuando se hizo clínicamente evidente la nefropatía; 18 meses después, cuando progresó la enfermedad y se deterioró la función renal del paciente, la PCR detectó *M. fermentans* en la orina, las fauces y la sangre periférica.⁶ El DNA de *M. fermentans* también se detectó en muestras de ganglios linfáticos provenientes de cuatro de siete pacientes con SIDA.³⁸⁴ Lo y cols. informaron tres pacientes sin SIDA en quienes se desarrolló un síndrome de dificultad respiratoria fulminante del adulto asociado con *M. fermentans*; los estudios inmunohistoquímicos y de microscopia electrónica revelaron microorganismos en los pulmones y el hígado.²⁶⁹ También se documentó la infección diseminada por *M. fermentans* en pacientes HIV positivos con linfoma no Hodgkin.³

Otros investigadores también informaron la asociación de *M. fermentans* cepa incognitus con enfermedad por último mortal en pacientes sin SIDA. Macon y cols. describieron un varón homosexual de 35 años con sarcoma de Kaposi y linfoma de linfocitos T con un recuento de linfocitos CD4 periféricos de 43 por milímetro cúbico.²⁷⁷ Con posterioridad el paciente presentó neumonía mortal por *Pneumocystis* e infección criptocócica diseminada. Varios enzimo-inmunoanálisis y técnicas de inmunotransferencia por Western blot para HIV-1, HIV-2, virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV)-I y anticuerpos contra HTLV-II fueron negativos, como también los cultivos retrovirales y los estudios por PCR. La infección sistémica por *M. fermentans* se documentó por métodos inmunohistoquímicos y PCR en muestras de tejido pre mórtem y post mórtem. Beecham y cols. informaron un caso similar en un varón de 28

años antes sano, no inmunodeprimido, que presentó un antecedente de 7 días de fiebre, dolor abdominal, diarrea, erupción cutánea y disnea. *M. fermentans* se detectó en muestras de biopsia de médula ósea por PCR y microscopia electrónica.²⁵ En otro informe de un hombre antes sano, seronegativo para HIV, con síntomas similares al SIDA de fiebre, malestar general, pérdida de peso, diarrea y extensa necrosis hepática y esplénica, el tratamiento con doxiciclina (300 mg/día, por vía oral durante 6 semanas) dio por resultado la resolución de los síntomas y la recuperación completa del paciente.²⁵⁶ Estos estudios sugieren que *M. fermentans*, o una cepa específica de esta especie, puede ser un patógeno sistémico en pacientes no infectados por HIV.

La aplicación de métodos moleculares para la detección de *M. fermentans* dio lugar a la aparición de varias publicaciones que documentan la presencia de este microorganismo en diversos sitios corporales de individuos HIV positivos y de HIV negativos. Aunque el aislamiento por cultivo de *M. fermentans* es bastante difícil, en ciertos estudios se realizaron intentos para ello. Mediante técnicas de PCR, Dawson y cols. detectaron *M. fermentans* en el 23% de 43 muestras de sedimento urinario provenientes de pacientes con nefropatía asociada con SIDA.⁸² Tres muestras de orina de dos pacientes resultaron positivas por cultivo para *M. fermentans* en medios SP-4 modificado, A-7 y Hayflick. En estos mismos pacientes, en cuatro cultivos se desarrolló *U. urealyticum* y en dos, *M. hominis*. Ninguna de las 50 muestras de sedimento urinario de 50 pacientes sanos, HIV negativos fue positiva por cultivo o PCR para *M. fermentans*, aunque en las 23 muestras se desarrolló *U. urealyticum* y en una, *M. hominis*. Katseni y cols. examinaron muestras de sangre, fauces y orina de 117 pacientes HIV positivos, 114 de los cuales eran varones homosexuales y de 73 pacientes HIV seronegativos que se atendían en una clínica de ETS de Londres.²⁰⁸ *M. fermentans* se detectó por PCR en el 10% de las 117 muestras de células mononucleares de sangre periférica, en el 23% de las 65 muestras de fauces y en el 8% de 55 muestras de orina de personas HIV positivas. Entre los 73 pacientes HIV seronegativos, *M. fermentans* se detectó en muestras de células mononucleares de sangre periférica, fauces y orina en el 9%, el 20% y el 6%, respectivamente. Hawkins y cols. en el NIH detectaron secuencias de DNA de *M. fermentans* en el 11% de las muestras de sangre de 55 pacientes HIV seropositivos pero ninguna en 26 individuos HIV seronegativos de bajo riesgo.¹⁵² En Francia, Bebear y cols. realizaron cultivo y PCR en muestras de fauces, endocervicales, uretrales, orina y células mononucleares de sangre periférica de 105 individuos HIV positivos.²² Aunque el cultivo y los ensayos de PCR para *M. pneumoniae* y *M. genitalium* fueron negativos, *M. fermentans* se detectó por PCR en al menos un sitio de muestra en el 26,7% de 105 pacientes. La presencia de *M. fermentans* en estos pacientes no se asoció con el estadio de la enfermedad por HIV, la carga viral o el recuento de linfocitos CD4.

M. fermentans puede invadir activamente los cultivos celulares, una propiedad no asociada con anterioridad en las especies de *Mycoplasma*. Aunque una cepa de referencia de *M. fermentans* y la cepa incognitus pudieron invadir las células HeLa, las cepas incognitus de *M. fermentans* fueron más invasivas cuando se probaron en cultivos celulares de explantes de células traqueales. Los microorganismos de la cepa incognitus se observaron en la localización intracelular, mientras la cepa de referencia sólo se observó entre las células y adheridas a ellas.^{408,441} La infección intranasal de ratas y el posterior cultivo por explante de tejidos traqueales de estos animales también revelaron la localización intracelular de los microorganismos en los

cultivos celulares.⁴⁰⁸ La cepa incognita de *M. fermentans* y las otras cepas de *M. fermentans* causan ciliostasis y cambios citopatológicos en los cultivos por explante traqueales, pero la magnitud y la gravedad de la citopatología varían considerablemente entre las cepas. Los estudios en animales también indicaron que la inmunosupresión puede permitir que *M. fermentans* crezca y progrese. La administración intravenosa de microorganismos de la cepa incognita de *M. fermentans* produjo la muerte de ratones BALB/c atímicos pero no de los ratones inmunocompetentes.⁴³²

Si bien algunos investigadores han notado diferencias entre la cepa incognita de *M. fermentans* y las otras cepas de *M. fermentans*, otros no han destacado diferencias. Sasaki y cols. compararon la cepa incognita original con otras tres cepas de referencia y clínicas de *M. fermentans*.³⁸³ El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del DNA a partir de estas cepas mostraron patrones similares en los perfiles en gel e inmunotransferencia de las proteínas celulares, lo que indica un alto grado de homogeneidad antigénica entre las cuatro cepas examinadas. La exposición de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a estos micoplasmas produjo aumentos importantes en la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; estos aumentos se observaron después de la exposición a las cuatro cepas de *M. fermentans* y no limitados sólo a la cepa incognita. Por último, la exposición de CMSP infectadas por HIV frente a cualquiera de las cepas de *M. fermentans* derivó en un aumento de 1.8 a 4.3 veces en la actividad de la transcriptasa inversa y de 3.3 a 7 en la producción del antígeno p24 en el cultivo. Estos investigadores concluyeron que la cepa incognita de *M. fermentans* no fue exclusiva cuando se comparó con otras cepas del microorganismo.³⁸³

En la actualidad varios investigadores están analizando el papel de *M. fermentans* y otros micoplasmas como cofactores que afectan la progresión de la enfermedad asociada con HIV.^{4,168} Los estudios in vitro en células CEM (una línea celular del tumor linfoblastoide T enriquecido en CD4) infectadas con HIV mostraron que el tratamiento de las células con análogos de la tetraciclina o fluoroquinolonas inhibió la producción de efectos citopáticos inducida por virus sin inhibir la replicación y la producción de la progenie viral.^{243,324} Estudios posteriores han mostrado que en realidad *M. fermentans* actúa en forma sinérgica con HIV-1 en células linfoblastoides y promonocíticas para causar la muerte celular; esta capacidad también se demostró con otras especies de *Mycoplasma*, entre ellas *M. penetrans*, *M. pirum* y *M. arginini*.^{244,266} Phillips y cols. mostraron que la adherencia de micoplasmas a los linfocitos infectados por HIV se asoció con sitios de brotación viral, lo que llevó a estos investigadores a suponer que la adherencia de micoplasmas puede activar o aumentar la producción de progenie viral por las células infectadas.³⁴⁵

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales los micoplasmas como *M. fermentans* pueden actuar como cofactores o inmunomoduladores en la producción de enfermedad asociada con HIV.³⁰⁹ La activación de linfocitos estimula la replicación del HIV y las especies de *Mycoplasma*, como *M. fermentans* y *M. penetrans*, tienen la capacidad de comportarse como activadores policlonales de linfocitos B y T.^{117,180,416} *M. fermentans* puede inducir la producción de linfocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) en diversos tipos celulares (monocitos, macrófagos, astrocitos y células gliales) in vitro.^{123,313,314} Muhlradt y Frisch aislaron y purificaron parcialmente una sustancia, denominada MDHM (*mycoplasma-derived high-molecular-weight material*, material de alto peso molecular derivado de mico-

plasmas), asociada con la membrana, que contiene lípidos y existe en forma de agregados cuando se purifica.³¹² La presencia de MDHM en cantidades de nanogramos por mililitro activa los macrófagos para liberar óxido nítrico, IL-6 y TNF. Otro grupo identificó un antígeno hidrófobo de 48 kDa asociado con la membrana de *M. fermentans*, distinto de la MDHM, que también estimula la secreción de TNF e IL-1 a partir de monocitos cultivados.²²⁹ *M. fermentans* también puede producir superantígenos que se unen directamente a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad y que estimulan la activación de linfocitos T. También se observó que otra lipoproteína proveniente de *M. fermentans* denominada MALP-2 (*macrophage-activating lipopeptide 2*, lipopéptido activador de macrófagos 2) induce la liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y óxido nítrico por los macrófagos peritoneales murinos.²⁰⁹ *M. fermentans* también incrementa la apoptosis de los linfocitos T inducida por concanavalina A.³⁹⁷ Algunos investigadores propusieron que la producción de peróxidos y radicales libres por los micoplasmas o la producción de enzimas que inactivan la catalasa intracelular normal pueden inducir la expresión génica de HIV y activar la replicación viral. Los peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno inducen la expresión génica de HIV in vitro por transactivación de regiones promotoras virales y contribuyen a la muerte celular programada.²⁴¹ La cepa incognita de *M. fermentans* puede fusionarse tanto con los linfocitos T como con los linfocitos en sangre periférica.⁹⁸ La provisión de componentes de micoplasmas dentro de estas células puede afectar de modo directo las funciones normales de los linfocitos. Además, la fusión de las membranas de micoplasmas y linfocito puede cambiar en forma significativa la estructura o la orientación de diversos receptores ubicados sobre la superficie del linfocito que, por consiguiente, altera la unión, la inducción o la producción de diversas linfocinas. Estas alteraciones fundamentales en la estructura y la función del linfocito pueden influir en la adherencia, la integración y la expresión génica del HIV. *M. fermentans* y *M. penetrans* también tienen la fosfolipasa C asociada con la membrana, que puede inducir una respuesta inflamatoria, causar daño en la membrana de las células huésped y activar la cascada del ácido araquidónico.³⁹⁶

M. fermentans también puede participar en las infecciones del aparato genital. En 1989, el microorganismo se detectó en los tejidos placentarios de dos mujeres con SIDA.²⁵⁸ Blanchard y cols. utilizaron métodos de cultivo y PCR para examinar la presencia de *M. genitalium* y *M. fermentans* en el aparato genital de adultos sexualmente activos y en el líquido amniótico de mujeres con membranas fetales intactas en las que se practicaron cesáreas.³² *M. genitalium* se detectó por PCR, pero no por cultivo, en el 11% de 94 hombres y 87 mujeres con síntomas clínicos de uretritis no gonocócica o cervicitis y no se detectó por cualquiera de los métodos en ninguna de las 232 muestras de líquido amniótico. Por otra parte, *M. fermentans* no se detectó por cualquiera de los métodos en ninguna de las muestras urogenitales, pero se detectó por PCR en cuatro de las 232 muestras de líquido amniótico, lo que sugiere que el microorganismo puede transmitirse por vía transplacentaria. Es interesante destacar que dos de las cuatro pacientes con resultados positivos por PCR para *M. fermentans* mostraron evidencias histológicas de corioamnionitis, lo que implica que *M. fermentans* también puede ser un patógeno del aparato genital.³²

M. fermentans también es causa de algunos casos de artritis reumatoide y otros trastornos reumáticos.^{167,199} En un estudio de 1996 realizado en Londres, se detectó por PCR en muestras

de líquido sinovial en el 21% de 38 pacientes con artritis reumatoide, el 20% de 10 pacientes con espondiloartropatía, de 20% de 5 pacientes con artritis psoriásica y el 13% de 31 pacientes con trastornos artríticos no clasificados.³⁸⁸ La caracterización genotípica de las cepas aisladas en la sinovial de pacientes con artritis no reveló características exclusivas; algunas se relacionaron con la cepa tipo de *M. fermentans* de la American Type Culture Collection (ATCC), mientras que otras se vincularon con cepas aisladas en cultivos de tejidos como contaminantes.³⁸⁷ *M. fermentans*, *M. salivarium* o ambos se detectaron por PCR en muestras de líquido sinovial de la articulación temporomandibular de pacientes con osteoartritis destructiva de la mandíbula.⁴⁸⁹ Se considera que este trastorno es la consecuencia de la acción de proteasas y citocinas en el cartílago de la articulación mandibular. Watanabe y cols. sugirieron que los micoplasmas presentes en la articulación mandibular lesionan la sinovial y el cartílago por sus actividades enzimáticas más su capacidad reconocida para estimular la liberación de citocinas desde las células inmunitarias efectoras.⁴⁸⁹ En un estudio del año 2000, *M. fermentans* se detectó por PCR en el líquido sinovial del 88% de 26 pacientes con artritis reumatoide. Siete de ocho pacientes con alguna variedad de otras artritis inflamatorias también fueron positivos para *M. fermentans*.¹⁶⁷ Por último, un estudio publicado en 2001 también encontró DNA de *M. fermentans* en el líquido sinovial en el 17% de 35 pacientes con artritis reumatoide, el 25% de 44 pacientes con artritis seronegativa indiferenciada y el 17% de 24 pacientes con artritis psoriásica.¹³⁰

La infección por *M. fermentans* se investigó por su relación con el síndrome de fatiga crónica. Mediante ensayos basados en PCR para *M. fermentans*, *M. hominis* y *M. penetrans*, Choppa y cols. examinaron CMSP de 100 pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC).⁶³ *M. fermentans*, *M. hominis* y *M. penetrans* se detectaron en las CMSP del 32,9% y el 6% de los 100 pacientes con SFC, mientras que se detectaron en el 8%, el 3% y el 2% de los controles sanos, respectivamente. Un estudio ulterior realizado por el mismo grupo de investigación detectó *M. fermentans* en CMSP en el 36% de 50 pacientes con SFC típico según la definición de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), el 32% de 50 pacientes con SFC atípico y el 8% de 50 sujetos controles sanos.⁴⁷⁰ Nasralla, Haier y Nicolson utilizaron métodos de PCR para detectar *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. penetrans* y *M. hominis* en muestras de sangre de 91 pacientes con SFC, síndromes de fibromialgia o ambos.³¹⁷ Entre los 91 sujetos, el 59%, el 48%, el 31% y el 20% fueron positivos para *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. hominis* y *M. penetrans*, respectivamente. De los 91 individuos, el 53% mostró evidencia molecular de infección sanguínea con múltiples especies de *Mycoplasma*. En un estudio de 261 pacientes con SFC y 36 voluntarios sanos, la infección sanguínea para al menos una especie de *Mycoplasma* se detectó por una prueba de PCR forense en el 68,6% de los pacientes con SFC y en el 5,6 % de los voluntarios sanos.³²³ *M. hominis* se detectó en el 36,8%, seguido de *M. fermentans* y *M. pneumoniae* en un porcentaje similar del 25,7% para cada uno. La infección con múltiples especies de *Mycoplasma* se detectó en el 17% de los pacientes con SFC. Aunque estos estudios muestran que en pacientes con SFC se encuentran tasas elevadas de infección por especies de *Mycoplasma*, no hay evidencia de que estos microorganismos sean los agentes causales del SFC. Es de esperar que el desarrollo de ensayos sensibles y las mejoras en las técnicas de cultivo para estos microorganismos permitan llevar a cabo estudios sobre la evolución natural y el tratamiento.

También se postuló que *M. fermentans* participa en la enfermedad observada entre los veteranos de la Operación Tormenta del Desierto. Se realizó un estudio serológico entre los veteranos y los militares no desplegados de la guerra del Golfo Pérsico utilizando muestras de suero antes y después de la guerra. Se documentó que las infecciones por *M. fermentans* sucedieron en esta población militar tanto antes como después del servicio en la guerra, pero estas infecciones fueron independientes del despliegue militar al Golfo Pérsico, lo que indica que los datos epidemiológicos y serológicos no apoyan una participación de *M. fermentans* en la enfermedad observada en los veteranos de esa guerra.¹³⁹ Un estudio similar llevado a cabo por el Instituto de las Fuerzas Armadas de Patología (Armed Forces Institute of Pathology; AFIP) también concluyó que no había evidencia serológica para establecer una asociación entre la infección por *M. fermentans* y la “enfermedad de la guerra del Golfo”.²⁶³

Aun con su relativamente breve pero fascinante historia epidemiológica y la intensidad de investigaciones realizadas por varios grupos de trabajo no se conoce el papel de *M. fermentans* en la patogenia del HIV, las enfermedades de transmisión sexual, la artritis reumatoide, el síndrome de fatiga crónica y otras enfermedades. Aunque los métodos moleculares facilitan la detección de secuencias específicas de genes de los microorganismos, la falta de técnicas confiables de cultivo complica los estudios que pueden incluir diversos métodos de tratamiento. *M. fermentans* se ha desarrollado en cultivos de muestras de líquido articular, pero a menudo no se sabe si los ensayos moleculares detectan microorganismos viables o no viables. Los estudios moleculares mostraron que *M. fermentans* es heterogéneo desde el punto de vista genotípico, como se evidencia por la presencia de los elementos similares a la secuencia de inserción en diversas localizaciones del DNA, que dan por resultado la variación entre cepas y dentro de la misma cepa.³⁴⁹ En estudios en los cuales el microorganismo se desarrolló de modo satisfactorio en el medio SP-4, la comprobación bioquímica definió cuatro grupos fenotípicos sobre la base de la utilización de arginina, glucosa, fructosa y *N*-acetilglucosamina.³³² El análisis sistemático fenotípico y genotípico de las cepas aisladas de *M. fermentans* a partir de una diversidad de muestras clínicas y enfermedades puede ayudar a definir la patogenicidad y la patogenia de las infecciones por *M. fermentans* y la participación de este microorganismo en diversos contextos clínicos.

Mycoplasma penetrans

En 1991, Lo y cols. en el AFIP de Washington, D.C., comunicaron el aislamiento de una especie nueva de *Mycoplasma* proveniente del aparato urogenital de varones homosexuales con infección por HIV.²⁶¹ Este microorganismo mostró características morfológicas singulares, como el cuerpo celular en forma de matraz con compartimentos: uno que contiene gránulos gruesos dispuestos de modo laxo, compatibles con estructuras ribosómicas, y el otro más pequeño y delgado con un contenido denso de gránulos finos.²⁶⁰ Este microorganismo fermentaba la glucosa, hidrolizaba la arginina pero no la urea, requiría colesterol para el crecimiento y pudo cultivarse en medio SP-4. También se adhería a células de mamíferos a las que invadía de modo activo.²⁵⁹ Los microorganismos intracelulares se observaban en el interior de vesículas limitadas por una membrana, con la posterior alteración y necrosis de la célula. Esta nueva especie recibió el nombre de *Mycoplasma penetrans*.^{260,385}

Los estudios seroepidemiológicos probaron una alta frecuencia de anticuerpos contra *M. penetrans* en individuos infectados por HIV.^{87,135,461,485} Wang y cols. encontraron que 35.4% de las muestras de suero de 444 pacientes infectados por HIV-1 eran positivas para anticuerpos contra *M. penetrans*.⁴⁸⁵ En 234 varones con SIDA, 41.5% eran seropositivos; 20.3% de 118 individuos asintomáticos infectados por HIV-1 eran también seropositivos. Sólo uno de 384 donantes de sangre HIV negativos presentaba anticuerpos contra *M. penetrans*. Es interesante destacar que 40% de 85 muestras de suero archivadas de pacientes con "GRID" (inmunodeficiencia relacionada con los homosexuales), un término utilizado a comienzos de la década de 1980 para describir el SIDA, también fueron positivas para anticuerpos contra *M. penetrans*. En 336 muestras de suero de clínicas de enfermedades de transmisión sexual en el sur de California, Brooklyn y Milwaukee, sólo tres fueron positivas para anticuerpos contra *M. penetrans*. Ninguna de las 178 muestras de suero obtenidas de individuos seronegativos para HIV-1 con otras enfermedades o trastornos inmunitarios (p. ej., pacientes en diálisis, o pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, leucemia, linfoma u otros cánceres) fue positiva para anticuerpos contra *M. penetrans*.⁴⁸⁵ Otros estudios seroepidemiológicos del mismo grupo de investigación encontraron tasas elevadas de anticuerpos contra micoplasmas en varones homosexuales, HIV-1-positivos, tanto sintomáticos como asintomáticos, pero sólo en el 1% de 308 muestras de drogadictos intravenosos y sólo en el 0.6% de 165 muestras provenientes de pacientes con hemofilia con infección por HIV-1 o sin ella, lo que sugiere que *M. penetrans* puede transmitirse por vía sexual.⁴⁸⁶ Grau y cols. informaron hallazgos muy similares sobre la presencia de anticuerpos contra *M. penetrans* en un estudio realizado en Francia.¹³⁵ Estos investigadores hallaron que la serología positiva para *M. penetrans* se asociaba con infección por HIV-1 y con prácticas sexuales de alto riesgo entre hombres homosexuales y que la seroprevalencia aumentó con la progresión de la enfermedad relacionada con el SIDA. Durante los comienzos de la década de 1990, algunos investigadores comunicaron una relación epidemiológica entre la presencia de anticuerpos contra *M. penetrans* y el desarrollo del sarcoma de Kaposi (SK). Lo y cols. analizaron la seroprevalencia de *M. penetrans* en una cohorte de varones homosexuales de los cuales 33 eran seropositivos para HIV y 31 seronegativos que fueron incluidos en un estudio sobre la evolución natural del SIDA realizado en la ciudad de Nueva York en 1984.²⁶² La comprobación de las muestras de suero archivadas entre 1984 y 1985 reveló que el 45.5% de los varones HIV positivos y el 22.5% de los HIV negativos tenían anticuerpos contra *M. penetrans*, lo que sugiere que *M. penetrans* estaba presente como un probable agente transmisible por vía sexual al comienzo de la epidemia del SIDA y no necesariamente se asociaba con la infección por HIV. En los 8 años posteriores, en nueve hombres se manifestó el sarcoma de Kaposi (SK); siete presentaron anticuerpos contra *M. penetrans* y dos eran negativos. La seropositividad inicial contra *M. penetrans* se asoció estadísticamente con el desarrollo posterior del SK y, entre los hombres HIV-positivos, la aparición del SK era más probable en aquellos con serologías iniciales positivas para *M. penetrans*. Estos investigadores concluyeron que la infección por *M. penetrans* podía actuar como un cofactor con el HIV en la aparición ulterior del SK.^{262,486} Sin embargo, otros investigadores no hallaron asociación entre la infección por *M. penetrans* y el sarcoma de Kaposi, que en la actualidad se sabe que está asociada con la infección por herpesvirus humano tipo 8.¹³⁵

El empleo de técnicas moleculares sensibles para la detección directa de *M. penetrans* mostró que este microorganismo puede estar implicado en infecciones crónicas de células o tejidos distintos de las células mononucleares de la sangre. Kovacic y cols. utilizaron ensayos de PCR específicos para *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. pirum*, *M. penetrans* y *M. hominis* para investigar la presencia de estos microorganismos en células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos infectados o no infectados por HIV-1.²³³ Sólo *M. fermentans* se detectó en el 5.8% de 154 pacientes seropositivos para HIV y en el 11.1% de seronegativos. Estos investigadores sugirieron que el aparato urogenital es un nicho ecológico probable de este microorganismo, ya que fue aislado originalmente en muestras de orina y detectado por PCR en muestras de orina de pacientes que presentaban anticuerpos contra *M. penetrans*.^{135,260,261} También se comunicó la presencia de bacteriemia por *M. penetrans* en pacientes no infectados por HIV con síndrome antifosfolípido.⁵⁰⁰

No se conoce el papel exacto de *M. penetrans* en la patogenia de la infección por HIV. La mayor parte de la investigación se centró en su supuesta participación como cofactor en la progresión de la enfermedad asociada con HIV. Sasaki y cols., del Instituto Pasteur, demostraron que *M. penetrans* podía activar los linfocitos T humanos para sufrir blastogénesis seguida de proliferación celular y expresión de marcadores de activación de la superficie celular.³⁸² Estos fenómenos se observaron con linfocitos provenientes de donantes sanos y de pacientes sintomáticos y asintomáticos infectados por HIV. La caracterización de los linfocitos activados por la exposición a *M. penetrans* mostró que los linfocitos que expresan CD4 o CD8 sufrían blastogénesis como resultado de esta expresión. La activación se asoció exclusivamente con células de *M. penetrans* y no con sobrenadantes de los cultivos. En células linfoides cultivadas, la infección con *M. penetrans* estimula la liberación de TNF- α y aumenta la replicación del HIV-1 coinfectante.¹⁸⁰ Estudios serológicos longitudinales también mostraron cargas virales de HIV más elevadas y disminuciones más rápidas en los recuentos de linfocitos CD4 en pacientes con títulos de anticuerpos persistentemente elevados o en aumento contra *M. penetrans*, lo que hace pensar en una asociación entre infección activa por *M. penetrans* y progresión de la enfermedad por HIV.¹³⁶

Mycoplasma pirum

Aunque descrito por primera vez en 1985, sólo en los últimos años *M. pirum* atrajo cierta atención como otro micoplasma asociado con el SIDA, junto con *M. fermentans* y *M. penetrans*. Antes de esta asociación, *M. pirum* se aisló en cultivos celulares como presunto contaminante, si bien las líneas celulares de las cuales se aisló eran de origen humano; en la actualidad se considera que estos micoplasmas pueden haber estado naturalmente en los tejidos cultivados.⁹⁶ *M. pirum* se aisló en células mononucleares de sangre periférica de un paciente con infección por HIV y se detectó por PCR en células mononucleares sanguíneas de individuos seropositivos para HIV.¹³³ Similar a *M. fermentans*, los efectos citopáticos in vitro asociados con el HIV también aumentan por la presencia de *M. pirum*, lo que llevó a la sugerencia de que, como sucede con *M. fermentans*, *M. pirum* puede actuar como cofactor en la patogenia de las enfermedades relacionadas con el HIV.³⁰⁹

M. pirum está estrechamente relacionado con *M. penetrans* y *M. pneumoniae* y, al igual que a estos dos micoplasmas, presenta forma de matraz con un "extremo" por el cual el microorganismo se adhiere al vidrio o al plástico. Se han caracteri-

zado la proteína adhesina tipo PI de *M. pirum* y el gen que la codifica.⁴⁴⁷ Tras la adherencia, *M. pirum*, como lo hace *M. fermentans* y *M. penetrans*, puede invadir de modo activo las células.⁴³⁰ Se están llevando a cabo investigaciones para definir la interacción de *M. pirum* y otros micoplasmas con células humanas y determinar la participación de estos microorganismos, si existe, en la patogenia de la enfermedad asociada con el HIV.

Mycoplasma primum

M. primum es una habitante común de la cavidad bucal y del aparato urogenital de los monos cercopitecinos en los que se lo aisló por primera vez en 1971.⁹⁵ Se encontró que las cepas aisladas de los tejidos de estos animales en 1971 eran similares a los micoplasmas no clasificados que se habían aislado en una infección del ombligo y en la vagina de una paciente en 1955.³⁷⁴ Las nuevas evaluaciones de las cepas aisladas en monos y los no clasificados humanos permitieron establecer que eran iguales. Se observó que este micoplasma utilizaba arginina, requería suero o colesterol para el crecimiento y era negativo para las pruebas de fermentación de la glucosa, ureasa, hemólisis, actividad de hemadsorción y reducción del tetrazolio. Estas cepas aisladas en seres humanos y primates recibieron el nombre de *M. primum*. Hasta la fecha, este micoplasma no ha sido asociado con infecciones o enfermedad clínica.

Mycoplasma spermatophilum

M. spermatophilum es una especie anaerobia de *Mycoplasma* recientemente descrita que se aisló en cinco muestras de esperma y en una única muestra endocervical, obtenidas de seis pacientes que consultaron a una clínica de esterilidad.¹⁵⁹ En cultivos, esta especie anaerobia obligada crece mejor entre 35 °C y 37 °C y produce una hemolisina que lisa los eritrocitos de cobayos, ovejas y seres humanos. Las colonias tienen el aspecto típico de huevo frito en medios sólidos. Esta especie requiere esteroides para el crecimiento y no utiliza la glucosa ni hidroliza la arginina ni la urea; aún no se la considera patógena.

Infecciones humanas debidas a especies de *Mycoplasma* de origen animal

M. arginini es uno de los pocos micoplasmas encontrados en varios huéspedes animales, como ovejas y cabras (tejidos respiratorio y ocular), ganado vacuno (aparato respiratorio, sangre, ubres, ojos, aparato urogenital) y felinos (aparato respiratorio). Estos animales pueden exhibir o no síntomas patológicos y aún se desconoce la posible participación de este microorganismo en enfermedades de animales. Yechouran y cols. informaron un caso de neumonía complicada por septicemia mortal causada por *M. arginini* en un hombre de 64 años con estadio IVB de un linfoma no Hodgkin, que presentaba hipogammaglobulinemia y había recibido prednisona.⁵⁰² Antes de su internación hospitalaria, el paciente trabajaba en un matadero, donde se sacrificaban ovejas, vacas y pollos. *M. arginini* se desarrolló en tres hemocultivos, una muestra de cepillado bronquial, una muestra de lavado broncoalveolar y la punta del catéter de Swan-Ganz. Los antibiogramas realizados con el procedimiento de dilución en caldo determinaron que el microorganismo era sensible a tetraciclina, doxiciclina y ciprofloxacina, y resistente a eritromicina y estreptomycin. Este patrón de sensibilidad también se observó en *M. arginini* aislado en animales. Los autores de este informe de caso sugirieron que el paciente

adquirió la infección por la inhalación de partículas en aerosol contaminadas en el ámbito del matadero.

Armstrong y cols. comunicaron un caso de infección pulmonar causada por *M. canis* en una mujer que estaba recibiendo tratamiento antineoplásico por carcinoma metastático del cuello uterino.¹⁴ El mismo microorganismo se aisló en el aparato respiratorio de otros miembros de la familia y en el perro mascota, quienes presentaron infecciones de las vías respiratorias altas al mismo tiempo. Bonilla y cols. también comunicaron un caso de artritis séptica de la cadera izquierda y de la rodilla derecha debida a *M. canis* en una mujer con inmunodeficiencia común variable.⁴⁰ La paciente tenía antecedentes de exposición a gatos. A pesar del desbridamiento quirúrgico y del tratamiento con doxiciclina, se notó una osteomielitis crónica diseminada de la cadera que requirió artroplastia.

Especies hemotrópicas de *Mycoplasma*

Las especies de *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* son bacterias similares a los micoplasmas que se adhieren y crecen en las superficies de los eritrocitos de varias especies de vertebrados.²³⁷ Hasta hace poco, estos microorganismos se clasificaban en el orden Rickettsiales, dada la similitud que presentaban con las rickettsias con respecto a su tamaño, características de tinción, tropismo por los eritrocitos y transmisión entre animales por artrópodos vectores. Sobre la superficie de los eritrocitos estas bacterias aparecen como estructuras pequeñas, con forma cocoide, bacilar (o anular), azules o violetas cuando se tiñen con el método de Wright-Giemsa o con naranja de acridina.³⁶ Desde el punto de vista fenotípico, las especies de *Eperythrozoon* forman estructuras anulares en la superficie de los eritrocitos y a menudo aparecen sin adherirse a ellos y libres en el plasma. Por el contrario, las especies de *Haemobartonella* no forman estructuras anulares y raras veces se observan en el estado libre, sin estar adheridas. En algún momento se reconoció la arbitrariedad de la diferenciación fenotípica de estas dos especies, lo que llevó a su reciente reclasificación (véase más adelante). Estas bacterias no son cultivables en medios bacteriológicos y se mantienen en laboratorios de investigación mediante pasajes seriados en los animales huéspedes. Las infecciones en animales causadas por las especies de *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* suelen ser asintomáticas y pueden persistir en forma latente durante años; se considera que los microorganismos se eliminan de la circulación por el bazo.²⁸⁰ Dado que no se comprenden en su totalidad los factores predisponentes (estrés, etc.), grandes cantidades de microorganismos pueden reaparecer en el torrente circulatorio. En algunos animales puede aparecer una anemia crónica sutil o una anemia hemolítica, manifiesta, grave y con frecuencia mortal.^{301,302} Por ejemplo, los bien conocidos micoplasmas felinos hemotrópicos no suelen causar enfermedad en los animales infectados naturalmente, pero pueden provocar anemia en los gatos infectados por el virus de la leucemia felina y acelerar el desarrollo de enfermedades mieloproliferativas inducidas por este virus.⁴²¹ Los micoplasmas hemotrópicos se transmiten de un animal a otro por diversos artrópodos hematófagos, como piojos, garrapatas, moscas, pulgas y mosquitos.

Cuando se descubrieron, las diversas especies de *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* se denominaron de acuerdo con el huésped al que afectaban, aunque realmente no se conoce la variedad de huéspedes de diferentes especies que afecta. A mediados de la década de 1990, las especies reconocidas de *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* eran *H. canis* (caninos), *H. felis* (felinos), *H. muris* (roedores), *E. coccoides* (ratones), *E.*

ovis (ovinos), *E. suis* (cerdos), *E. parvum* (cerdos) y *E. wenyonii* (ganado bovino). En 1997, se investigaron las secuencias genéticas del rRNA 16S de *H. felis*, *H. muris*, *E. suis* y *E. wenyonii* y se demostró que estas bacterias no estaban relacionadas desde el punto de vista filogenético con las rickettsias pero estaban más estrechamente vinculadas con los miembros del género *Mycoplasma*.^{321,364} En 2001, estas cuatro especies de microorganismos se retiraron del orden Rickettsiales, familia Anaplasmatiales y se les dio la categoría “*candidatus*” en el género *Mycoplasma* como “*Candidatus Mycoplasma hemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” y “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”,^{198,319,424} La categoría “*Candidatus*” suele reservarse para los taxones nuevos o descritos de forma incompleta. Por esto, la Judicial Commission of the International Committee on the Systematics of the Prokaryotes resolvió que, al cambiar los nombres de los microorganismos publicados con legitimidad a la categoría taxonómica menor de “*candidatus*”, los nombres originales perderían el lugar porque no habría ningún nombre nuevo o sustitutivo para agregar a la lista aprobada de nombres bacterianos (*Approved List of Bacterial Names*). Como consecuencia, todas las especies que se habían renombrado bajo la categoría “*candidatus*” fueron revisadas eliminando la categoría “*candidatus*” y se las renombró como nuevas especies de *Mycoplasma*.³²⁰ Al mismo tiempo que se publicaba esta opinión, se describieron otras tres especies “*candidatus*” —“*candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*”, “*candidatus Mycoplasma haemolamae*” y “*candidatus Mycoplasma haemominutum*”— como bacterias hemotrópicas a partir de zarigüeyas, alpacas y gatos, respectivamente, infectados en forma natural.³⁰³ Como resultado, las especies originales de *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* ahora se clasifican en el género *Mycoplasma* como *M. hemofelis* (gatos), *M. haemomuris* (ratones), *M. haemosuis* (cerdos), *M. wenyonii* (bovinos), *M. ovis* (oveja y cabras), *M. haemolamae* (llamas), *M. haemocanis* (caninos), *M. haemodidelphidis* (zarigüeya) y “*candidatus M. haemominutum*”,^{318,319,425} Juntos, estos micoplasmas hemotrópicos recibieron el nombre común de “hemoplasmas”.

Cultivos de micoplasmas humanos a partir de muestras clínicas

Consideraciones generales

Los micoplasmas humanos pueden dividirse en tres grupos sobre la base de la utilización de tres sustratos: glucosa, arginina y urea (véase cuadro 18-1). De acuerdo con la especie de micoplasma que se está investigando, un medio peptonado basal enriquecido que contenga extracto de levadura y suero se suplementa con uno de estos tres sustratos y se agrega un indicador de pH (por lo general rojo fenol). *M. pneumoniae* metaboliza la glucosa para producir ácido láctico, lo que determina el cambio a un pH ácido. *M. hominis* metaboliza la arginina con la producción de amoníaco y el cambio del pH de neutro a alcalino. De manera similar, *U. urealyticum* produce la enzima ureasa que hidroliza la urea a amoníaco, lo que causa el cambio a un pH alcalino. *M. fermentans* produce ácido a partir de la glucosa y también metaboliza la arginina.

Las muestras para el aislamiento de micoplasmas, en particular los micoplasmas genitales de crecimiento más rápido, se inoculan de manera rutinaria tanto en medios sólidos (con agar) como en algún tipo de medio líquido (caldo) de enriquecimiento, selectivo o diferencial. Muchas de las fórmulas de los

caldos utilizados para el aislamiento de micoplasmas son difásicas, con un medio que contiene agar en el fondo de un tubo cubierto con caldo de composición similar pero sin el agregado de agar. Los medios para el aislamiento de micoplasmas también contienen antibióticos (p. ej., ampicilina, penicilina, polimixina B y anfotericina) para inhibir las bacterias y los hongos contaminantes. Antes se agregaba a los medios acetato de talio como agente antibacteriano, pero este compuesto es inhibidor para *U. urealyticum* y *M. genitalium* y también es muy tóxico para los seres humanos.

Los micoplasmas humanos difieren en su pH óptimo para el crecimiento y en las condiciones atmosféricas requeridas para el aislamiento satisfactorio en muestras clínicas (véase cuadro 18-1). En los medios utilizados para el aislamiento de *M. pneumoniae* se agrega un buffer para amortiguar el pH inicial a cerca de 7,8, mientras que el medio para el crecimiento de *M. hominis* se amortigua inicialmente a un pH neutro (7). *U. urealyticum* crece de modo óptimo en un ambiente con un pH levemente ácido, de manera que el medio para el aislamiento primario para esta especie está regulado a un pH cercano a 6. La temperatura óptima para el crecimiento de los micoplasmas es de 35 °C a 37 °C. *M. pneumoniae* y *M. hominis* crecen bien en presencia de aire o en una atmósfera compuesta por 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono. *U. urealyticum* tiende a ser capnófilo, con un crecimiento óptimo que se produce en una atmósfera de 10-20% de dióxido de carbono y 80-90% de nitrógeno. El medio sólido inoculado directamente con la muestra o los subcultivos provenientes de medios líquidos deben incubarse en las condiciones adecuadas descritas antes; el caldo puede incubarse siempre en condiciones aerobias.

Los caldos suelen inocularse con 0,1 mL a 0,2 mL de la muestra contenida en un líquido de transporte. Las placas de agar se inoculan con una cantidad similar y el inóculo se disemina sobre la superficie del agar con una varilla arqueada de vidrio. Las placas de agar se sellan con cinta de celofán para evitar el secado del agar. Los medios para el aislamiento de *M. pneumoniae* deben incubarse hasta 4 semanas antes de realizar el informe final del cultivo. Los cultivos para los micoplasmas genitales deben incubarse durante 7 a 8 días; la mayoría de los cultivos en medios líquidos positivos se detectan después de 5 días de incubación. Los medios difásicos se comparan con tubos de los mismos medios inoculados con medio de transporte estéril, incubados al mismo tiempo y en las mismas condiciones, y con tubos inoculados con cepas control de micoplasma para detectar diferencias sutiles en el color o la turbidez. Los cultivos deben inspeccionarse todos los días para determinar cambios sutiles debido a que los microorganismos mueren con rapidez una vez que sucede el crecimiento y se consumen los sustratos. Si se detecta en forma visual un cultivo potencialmente positivo en el medio difásico, el caldo se subcultiva en un medio sólido, como agar SP-4 o agar diferencial A7 (véase la descripción más adelante).

La identificación de los micoplasmas requiere el reconocimiento de las colonias típicas en medios sólidos inoculados directamente con la muestra o con un ansa del medio líquido a partir de un medio líquido difásico presuntamente positivo. Las colonias en medios sólidos pueden examinarse directamente con aumentos de 30 × a 100 × con luz incidente periférica para establecer la morfología y las características del crecimiento. Los colorantes supravitales, como el de Diene, pueden utilizarse para caracterizar más las colonias y para diferenciarlas de los artificios de técnica. Diversas pruebas de identificación pueden realizarse directamente sobre el medio sólido, como la prueba de hemadsorción para la identificación presuntiva de *M.*

pneumoniae, o sustratos como arginina o urea, más el indicador rojo fenol, pueden incorporarse al agar para proporcionar una evaluación directa de la utilización del sustrato y, por consiguiente, una identificación presuntiva. Los medios para el cultivo de micoplasmas respiratorios y genitales, y los procedimientos de identificación para *M. pneumoniae* y *U. urealyticum* se detallan en los protocolos 18-1, 18-2, 18-3, 18-4, 18-5 y 18-6.

Recolección de la muestra

M. pneumoniae puede aislarse en muestras de las vías respiratorias altas y bajas, como hisopado de fauces, hisopados nasofaríngeos, lavados de fauces, esputo, aspirados traqueales y transtraqueales, broncoscopia, lavado broncoalveolar y muestras de tejido pulmonar. El microorganismo puede aislarse a partir de estas muestras durante la evolución de la enfermedad y durante cierto tiempo después de la desaparición de los síntomas. Debido a los requerimientos nutricionales especiales de estas bacterias, los medios de cultivo deben inocularse lo antes posible después de la recolección. Para el transporte de las muestras de hisopados pueden utilizarse medios de cultivo presentados en pequeños frascos ampollas; otras muestras (p. ej., esputo, tejido, lavados) pueden ser transportadas al laboratorio en recipientes estériles con tapa a rosca. Antes de la inoculación de los medios de crecimiento, las muestras respiratorias deben ser homogeneizadas mediante el pasaje repetido a través de aguja y jeringa; el mucolítico Sputolysin® u otros tratamientos químicos para la licuefacción del esputo resultan tóxicos para los micoplasmas.

Los micoplasmas genitales pueden aislarse en diversas muestras, como exudado uretral, vaginal y cervical: secreciones prostáticas; semen; orina; sangre, otros líquidos corporales (LCR, líquido amniótico, secreciones respiratorias, líquido sinovial, líquido pericárdico) y tejidos (p. ej., lavados y biopsias endometriales, tejidos placentarios o amnióticos, tejidos fetales o de aborto, biopsias de la trompa de Falopio, biopsias uterinas, biopsias de herida, tejidos rectales). Las muestras por hisopado deben obtenerse utilizando hisopos de Dacron®, de alginato de calcio o de poliéster con tallos plásticos o de aluminio. No deben utilizarse hisopos con tallo de madera porque este material por sí puede ser tóxico para los ureaplasmas. Si se investigan simultáneamente otros patógenos del aparato genital es preferible utilizar hisopos de rayón o dacrón montados en palillos plásticos, ya que no son tóxicos para los patógenos genitales. Debe evitarse el contacto de los hisopos con soluciones antisépticas, cremas, geles o lubricantes. No debe permitirse el secado de las muestras del hisopo; para ello deben colocarse de inmediato en un medio de transporte o cultivo tras la recolección. Otros líquidos corporales y muestras de biopsia de tejidos deben remitirse en envases estériles. No debe emplearse solución fisiológica para humedecer las muestras de tejido porque puede causar la lisis de los microorganismos. En el laboratorio, las muestras de tejido deben triturarse en medio de transporte estéril para producir una suspensión al 10 % (p/v) y diluirse de forma seriada 10 y 100; este procedimiento es necesario para evitar la inhibición del crecimiento de micoplasmas por materia orgánica como hemoglobina, fosfolípidos tóxicos, anticuerpos o complemento que puedan estar presentes en el tejido de la muestra. Estas diluciones luego se utilizan para inocular los medios de crecimiento.

Las muestras de sangre pueden cultivarse para micoplasmas por inoculación de los medios de crecimiento en una relación de una parte de sangre con nueve partes de caldo (dilución

1:10). Como óptimo, al menos deben cultivarse 10 mL de sangre de pacientes adultos. Lo ideal es que el medio de crecimiento no contenga polianetol sulfonato de sodio (SPS), que inhibe el crecimiento de las especies de *Mycoplasma*, pero debe ser un medio con una fórmula específica para micoplasmas (véase más adelante). Como sucede con *N. gonorrhoeae*, la inhibición del crecimiento por el SPS puede superarse mediante el agregado de gelatina estéril al medio de crecimiento a una concentración final del 1% (p/vol). Los caldos sembrados deben subcultivarse a ciegas, ya que los instrumentos para hemocultivos monitorizados de modo continuo y automatizados, en la mayoría de los casos, no pueden detectar el crecimiento de micoplasmas.⁴⁷²

Medios de transporte

Los micoplasmas son muy sensibles a las condiciones ambientales adversas, de modo que las muestras deben colocarse en medios de transporte o de crecimiento adecuados lo antes posible después de su recolección. Pueden emplearse varios medios de transporte para los cultivos de micoplasmas genitales como caldo que contiene tripticasa y soja con el agregado de albúmina sérica bovina al 0,5%, caldo 2SP (suero fetal bovino inactivado por calor al 10% con 0,2 M de sacarosa en 0,02 M de buffer fosfato, pH 7,2) o diversos tipos de medios de crecimiento para micoplasmas (p. ej., SP-4, caldo de Shepard 10B). Por lo general se agregan antibióticos y antimicóticos (penicilina, 100 000 U/mL; polimixina B, 5 000 µg/mL; anfotericina B, 2 mg/mL, concentraciones finales) para disminuir la contaminación por otros microorganismos bacterianos y micóticos. Las muestras deben ser transportadas al laboratorio de inmediato y se mantienen hasta 24 horas a 4 °C antes de la siembra en los medios de crecimiento. Si el cultivo se retrasa más de ese tiempo, la muestra debe congelarse a -70 °C. Antes del cultivo, estas muestras deben descongelarse rápidamente en un baño a 37 °C. Las muestras de orina para cultivo deben ser centrifugadas y el sedimento diluido en una relación 1:1 con medio de transporte antes del congelamiento. Los estabilizadores proteicos en el medio de transporte evitan la pérdida de la viabilidad de los microorganismos que puede suceder si las muestras de orina se congelan sin esta medida protectora.

Medios para el cultivo de micoplasmas

En la literatura se describieron diversos tipos de medios para el cultivo de *M. pneumoniae* y de los micoplasmas genitales.⁴⁷¹ Como ya se mencionó, la mayoría de los medios con caldo son difásicos; es decir, los tubos contienen una fase sólida de agar que está cubierta con un medio líquido (caldo) de composición similar. Un medio recomendado por los CDC para el aislamiento de *M. pneumoniae* es el medio difásico azul de metileno-glucosa. Este medio contiene caldo y agar PPLO (microorganismo similar a la pleuroneumonía), extracto de levadura y suplementos de suero junto con glucosa, azul de metileno y rojo fenol. El azul de metileno en el medio inhibe el crecimiento de otros micoplasmas humanos que pueden encontrarse en el aparato respiratorio, lo que lo convierte en un medio selectivo para *M. pneumoniae*. Durante el crecimiento de *M. pneumoniae*, el medio se torna más ácido y el rojo fenol vira del color salmón al amarillo. Al mismo tiempo, los microorganismos reducen el azul de metileno y vira del azul al incoloro. Por consiguiente, el color de la fase líquida cambia del púrpura al verde o amarillo verdoso, mientras que la fase sólida del agar vira del violeta al amarillo o al amarillo anaranjado. Este medio

se utiliza junto con el medio agar glucosa para micoplasma. Las colonias aisladas, ya sea directamente en este medio o en los subcultivos de caldos positivos, son sometidas a procedimientos de observación e identificación. En el protocolo 18-4 se presentan los componentes y las fórmulas de los medios de aislamiento para *M. pneumoniae*.

Otro medio recomendado para el aislamiento de *M. pneumoniae* a partir de muestras clínicas es el caldo SP-4 y el agar SP-4 que contiene glucosa.⁴⁵⁷ Estos medios se formularon originalmente para el cultivo de espiralplasmas, pero también proporcionan un aislamiento mejor de *M. pneumoniae* y otros micoplasmas humanos (p. ej., *M. genitalium*). En un estudio comparativo realizado por Tully y cols., el medio difásico SP-4 permitió el aislamiento de *M. pneumoniae* en 69 de 200 muestras que eran negativas cuando se cultivaron por otros métodos "estándares".⁴⁵⁷ Como sucede con el medio difásico con azul de metileno-glucosa, el crecimiento se detectó por el cambio del indicador rojo fenol del rojo al amarillo, lo que indica la producción de ácido a partir de la glucosa. Los medios de agar y caldo SP-4 pueden utilizarse para el aislamiento de *M. hominis* si se agrega arginina en lugar de glucosa.

Como *M. hominis* y *U. urealyticum* metabolizan sustratos diferentes y difieren en el pH para el crecimiento óptimo, muchos laboratorios emplean dos tipos de medio sólido para sus cultivos. Además, deben sembrarse las formulaciones difásicas con caldo y agar de cada tipo de medio para obtener el aislamiento óptimo de micoplasmas. El caldo H y el agar H se utilizan para aislar *M. hominis* y son regulados con buffer a un pH neutro (7,0). Algunas fórmulas también contienen arginina como sustrato para el crecimiento, donde se utilizan la turbidez y el cambio de color del indicador rojo fenol en el rango alcalino del medio para detectar el crecimiento de microorganismos. El caldo U y el agar U, utilizados para aislar *U. urealyticum*, están amortiguados a un pH más bajo (5,5 a 6,0) y contienen urea como sustrato para el crecimiento. Estos últimos medios también son más selectivos para *U. urealyticum* si se agrega lincomicina, porque los ureaplasmas son resistentes a este antibiótico y las cepas de *M. hominis* son sensibles. En el protocolo 18-5 se encuentran las fórmulas de los medios para el aislamiento de micoplasmas genitales.

En la literatura se han presentado otros medios para el aislamiento y la identificación de micoplasmas genitales. Los medios líquidos incluyen el U-9 ureasa descrito por Shepard y Lunceford, el caldo con azul de bromotimol, el caldo Boston S-2 y el medio SP-4 utilizados para el aislamiento de micoplasmas respiratorios.^{119,242,390,392,393,399,498} El medio SP-4 debe suplementarse con urea o arginina para detectar específicamente *U. urealyticum* y *M. hominis*, respectivamente. El caldo Boston S-2 es un medio único que contiene medio base enriquecido, suero de caballo, extracto de levadura, indicador rojo fenol, L-cisteína, urea y penicilina. El crecimiento de *U. urealyticum* se determina por la aparición de un color rosa en el medio, mientras que el de *M. hominis* se pone de manifiesto por color salmón pálido a naranja o por la aparición de una leve turbidez. El medio agar diferencial A7 de Shepard y varias modificaciones de éste (p. ej., A7B y A8) son particularmente útiles, ya que tanto *M. hominis* como *U. urealyticum* crecen bien en ellos y pueden ser diferenciados con facilidad entre sí por la morfología de la colonia y por la detección directa de la formación de ureasa por esta última especie (véase la descripción más adelante).^{390,392,393} Como se verá, con este medio puede lograrse la identificación presuntiva de *M. hominis* y la identificación definitiva de *U. urealyticum*, sin la necesidad de otras pruebas o reactivos.

Aislamiento e identificación de *Mycoplasma pneumoniae*

El crecimiento de *M. pneumoniae* en muestras clínicas suele detectarse por la capacidad de estos microorganismos de producir ácido a partir de la glucosa.⁸⁴ Se inocula el medio difásico que contiene azul de metileno y glucosa con 0,2 mL de la muestra en el líquido de transporte. De modo simultáneo, los tubos de medios se inoculan con un medio de transporte estéril y con un cultivo de control positivo y se incuban junto con las muestras. Los cultivos en caldo se incuban a 35 °C con las tapas ajustadas. Los tubos se observan todos los días para determinar cambios de color y turbidez durante 4 semanas. El desarrollo de turbidez macroscópica y el cambio del indicador a ácido o alcalino dentro de 1 a 5 días suelen deberse a la contaminación bacteriana. Un cambio leve y gradual en el indicador de pH en un período de 8 a 15 días sin turbidez macroscópica sugiere un verdadero cultivo positivo. Enseguida después de determinar los cambios de color en el medio, el caldo debe subcultivarse en un medio con agar adecuado; a medida que se acumula más ácido en el medio, los micoplasmas se tornan no viables con rapidez. Ante la primera indicación de crecimiento, el caldo se subcultiva en un medio sólido (como agar SP-4) y se incuba en aerobiosis durante 5 a 7 días. La observación de la superficie del agar con microscopía de bajo aumento revelará colonias pequeñas de los microorganismos. En ausencia de cambio de color evidente en los medios difásicos, debe realizarse un subcultivo a ciegas en medios sólidos después de 1 y 3 semanas de incubación. En la figura 18-1 se muestra un esquema general para el aislamiento de *M. pneumoniae*.

M. pneumoniae puede identificarse por diversos procedimientos, algunos de los cuales son mejores que otros.⁸⁴ Las pruebas más adaptables a los laboratorios clínicos comprenden la prueba de hemadsorción (protocolo 18-2) y la prueba de reducción del tetrazolio (protocolo 18-6). En el procedimiento de hemadsorción, a las colonias que crecen en la superficie del agar se les agrega una suspensión al 0,2-0,4% de eritrocitos de cobayo lavados. Tras la incubación, la superficie de la placa se cubre cuidadosamente con solución fisiológica estéril y se examina con un aumento de 50 × a 100 ×. Las colonias de *M. pneumoniae* adsorben los eritrocitos a su superficie y aparecen como colonias redondas recubiertas con eritrocitos (véase lámina en color 18-1A). Este procedimiento funciona mejor en colonias de 5 a 7 días de formadas; las colonias más viejas tienden a perder su capacidad de hemadsorción. Otras especies de *Mycoplasma* que habitan las vías respiratorias altas son negativas en la prueba de hemadsorción.

La prueba de reducción del tetrazolio se aprovecha de la capacidad exclusiva de *M. pneumoniae* para reducir el compuesto incoloro trifeníl tetrazolio al compuesto rojo formazán. Para llevar a cabo la prueba, la superficie del agar que tiene las colonias sospechosas se cubre con una solución de clorhidrato de 2-(p-yododifenil)-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolio (0,21%) y se incuba a 35 °C durante una hora. Las colonias de *M. pneumoniae* aparecen rojizas tras ese lapso y pueden tomar un color púrpura a negro después de 3 a 4 horas. Otros micoplasmas son negativos con esta prueba. La prueba de tetrazolio puede realizarse incluso después de llevar a cabo el procedimiento de hemadsorción.

También pueden utilizarse métodos serológicos específicos para la confirmación de cultivos de *M. pneumoniae*. El más rápido es el procedimiento de epifluorescencia. El medio de agar que contiene las colonias se cubre con anticuerpos específicos contra *M. pneumoniae* conjugado con isotiocianato de fluoresceína; se lava para eliminar el conjugado no unido y

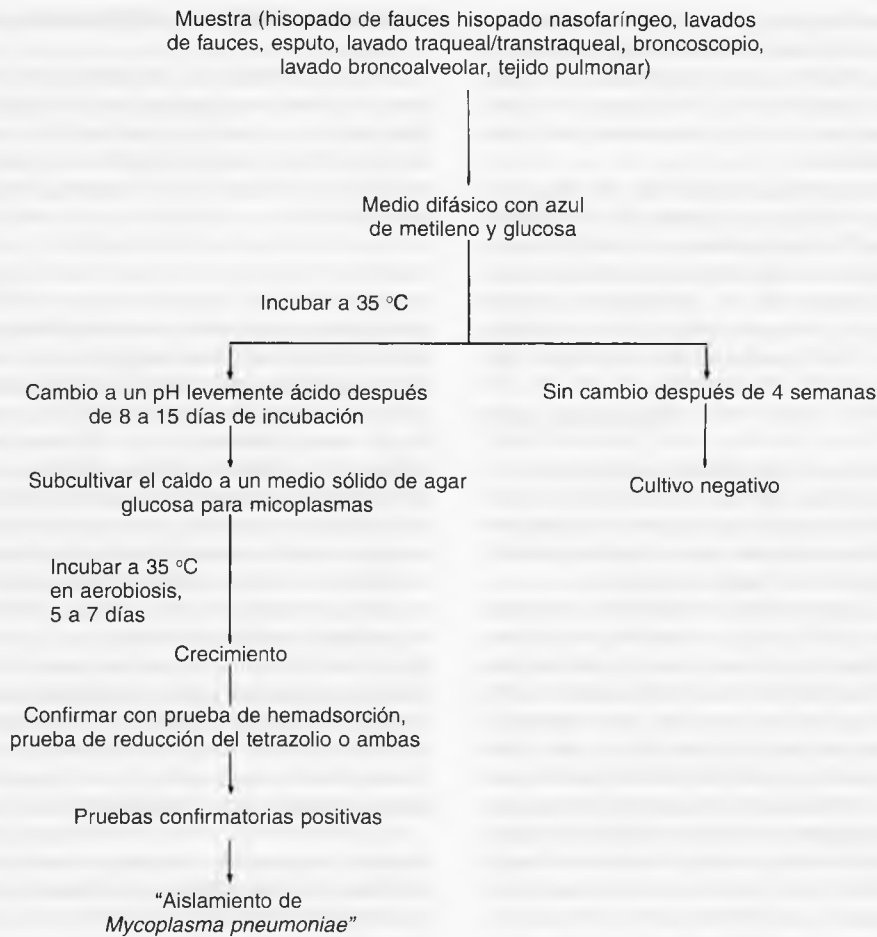


Figura 18-1 Protocolo para el aislamiento de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras respiratorias.

luego se lo observa con un microscopio equipado para procedimientos de epifluorescencia donde se verá la fluorescencia de las colonias de *M. pneumoniae*. Aunque se lo considera el procedimiento de referencia, la prueba de inhibición del crecimiento para la identificación de *M. pneumoniae* es también el procedimiento más laborioso. En esta prueba, se siembra una placa de agar en toda su extensión a partir de una suspensión en caldo del aislamiento por identificar. A continuación se coloca sobre la superficie del agar un trozo de papel de filtro impregnado con anticuerpos contra *M. pneumoniae*. Tras la incubación se observará la inhibición del crecimiento de las colonias alrededor del papel de filtro que está saturado con anticuerpos específicos de especie.

Otras técnicas también se han aplicado al diagnóstico de infecciones respiratorias por *M. pneumoniae*. Cimolai y cols. describieron una técnica nueva de amplificación del cultivo similar a los métodos de cultivo en monocapa del tipo *shell vial* utilizados en la actualidad en virología.⁶⁶ Los cultivos convencionales en agar y caldo se realizan por duplicado. Durante cada día de incubación se prueban alícuotas de una de las muestras duplicadas de caldo mediante una técnica de inmunotransferencia que utiliza la captura de antígeno por anticuerpo monoclonal dirigido contra la adhesina asociada con la membrana de 43 kDa de *M. pneumoniae*. El método de inmunotransferencia detectó cultivos positivos ya en 2 a 12 días (media, 4,7), mientras que los cultivos convencionales fueron visiblemente positivos en 7 a 14 días (media, 8,3).

Detección de *Mycoplasma pneumoniae* por procedimientos que no utilizan cultivos

Dado el crecimiento lento de *M. pneumoniae* se crearon métodos para la detección directa que no dependen del crecimiento e incluyen ensayos de captura de antígeno, inmunofluorescencia directa, análisis de inmunotransferencia y métodos con sondas de ácido nucleico.^{224,272} En general, muchas de estas pruebas carecen de la sensibilidad suficiente como para ser consideradas útiles desde el punto de vista clínico. Marmion y cols. describieron un enzoinmunoanálisis (EIA) con captura de antígeno que emplea anticuerpos policlonales dirigidos contra el antígeno P1 purificado.²⁸³ En un estudio de muestras respiratorias de 234 pacientes, la prueba del antígeno detectó cuatro de cuatro pacientes que eran positivos por cultivo y serología y cuatro de cinco pacientes que eran positivos sólo por cultivo. Cabe destacar que el 43% de 23 pacientes que eran negativos por cultivo pero seropositivos y el 71% de los pacientes con diagnóstico basado en la elevación del título de anticuerpos a los que no se les habían realizado cultivos fueron positivos con el EIA con captura de antígeno. Estos hallazgos indicaron que la prueba del antígeno y tal vez otras pruebas directas necesitan ser confirmadas mediante la evaluación serológica con respuesta de anticuerpos para verificar que la infección diagnosticada por la prueba directa es una infección actual y no el resultado de un estado de portador, prolongado o que continúa, del microorganismo por una infección

previa.²⁰ Los ensayos para la detección directa de antígeno han sido en gran medida reemplazados por técnicas moleculares.

Antes de la aparición de los métodos basados en la amplificación se empleaba una sonda de DNA directa, marcada en forma radiactiva para el diagnóstico de las infecciones respiratorias por micoplasmas. La sonda de DNA para *M. pneumoniae* (Gen-Probe, San Diego CA) se hibridó con el rRNA 16S del microorganismo y se utilizó el ¹²⁵I radiactivo para generar una señal de detección. Tilton y cols. compararon la sonda de DNA con cultivos y encontraron que la sonda tenía una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98% cuando se comparaba con el cultivo.⁴⁵⁰ Dular y cols. informaron que la sonda tenía una sensibilidad y especificidad del 89% en comparación con el cultivo.¹⁰⁶ En ambas publicaciones, los autores destacaron los aspectos prácticos de la sonda como un método rápido, sensible y oportuno para el diagnóstico, ya que los resultados están disponibles en cerca de dos horas, mientras que el cultivo requiere varias semanas. Además, el diagnóstico rápido proporcionado por la sonda podría eliminar la dependencia de la comprobación serológica retrospectiva (p. ej., fijación del complemento) o marcadores serológicos inespecíficos (crioaglutininas) para el diagnóstico y permitiría iniciar antes el tratamiento antimicrobiano específico. Entre las desventajas de la sonda están su vida útil relativamente breve de 6 semanas, la necesidad de equipos adicionales, la generación y la eliminación de desechos radiactivos y su costo. Además, como los microorganismos pueden estar albergados en el aparato respiratorio durante la convalecencia, pueden encontrarse pruebas de sondas positivas en muestras de hisopados respiratorios provenientes de individuos sanos. La prueba Gen-Probe fue retirada del mercado en 1992.

Desde 1989 se crearon varios métodos moleculares, como PCR anidada y semianidada, ensayos de PCR múltiples, amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), Q β -replicasa y PCR en tiempo real, para la detección de *M. pneumoniae* en diversos tipos de muestra,^{272,465} que comprenden esputo, hisopado de fauces, aspirados nasofaríngeos y traqueales, lavados broncoalveolares, aspirados transtorácicos con aguja, tejidos pulmonares fijados y biopsias de pulmón a cielo abierto. Los principales genes diana para estos ensayos fueron el gen para la adhesina P1, el rRNA 16S específico de especie, los genes para el operón de ATPasa de los micoplasmas y el gen *tuf*, que codifica el factor de elongación 2, un factor que actúa en la síntesis de proteína al nivel del mRNA ribosómico.^{46,48,71,86,162,226,271-273,414,451,487,492}

Buck y cols. describieron una prueba de PCR en la cual el segmento de DNA amplificado utilizado tenía 375 pares de bases (pb) de la proteína adhesina P1 de *M. pneumoniae*.⁴⁶ En muestras clínicas simuladas, esta prueba pudo detectar un límite inferior de entre 1 y 10 microorganismos, en comparación con un límite inferior de 1 000 microorganismos para la detección por cultivo. Otros autores informaron sensibilidades similares al utilizar las mismas secuencias diana de DNA.^{48,86} Varios investigadores diseñaron sondas específicas de especie para *M. pneumoniae* basadas en secuencias del rRNA 16S específicas de *M. pneumoniae* y encontraron que la amplificación y la ulterior detección por sonda de estas secuencias en muestras clínicas era más sensible que el cultivo.^{451,469} Al utilizar la técnica de PCR, Narita y cols. detectaron DNA específico de *M. pneumoniae* en cuatro de seis muestras de LCR y en tres de cuatro muestras de suero provenientes de pacientes con infección clínica del SNC confirmada por serología causada por *M. pneumoniae*.³¹⁶ La técnica de huella o impronta del DNA *fingerprinting* por PCR también se ha utilizado para subtipificar las cepas de *M. pneu-*

moniae basada en la divergencia de la secuencia nucleotídica de la proteína citoadhesina P1.⁴⁶⁶

Aislamiento e identificación de los micoplasmas genitales

Los micoplasmas que pueden aislarse en el aparato genital son *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*. Mientras que *M. hominis* y *U. urealyticum* se cultivan con facilidad y suelen desarrollarse en el transcurso de 1 a 5 días, *M. genitalium* y *M. fermentans* crecen con mucha más lentitud y son más difíciles de detectar por cultivo. Además, los sistemas actuales de cultivo para el aislamiento de micoplasmas genitales pueden no brindar un crecimiento óptimo de estas especies. Por ejemplo, el medio SP-4 descrito antes para el aislamiento de *M. pneumoniae* es el medio óptimo para *M. genitalium* porque este microorganismo metaboliza la glucosa, pero la mayoría de los laboratorios no emplean medios de cultivo que contengan glucosa para el cultivo de muestras genitales. Además, la proliferación lenta del microorganismo en los medios de cultivo hace que éstos no tengan utilidad clínica. *M. fermentans* también utiliza la glucosa, pero tiene un crecimiento muy lento. Por estas consideraciones, los micoplasmas genitales distintos de *M. hominis* y *U. urealyticum* no suelen investigarse en las muestras del aparato genital.

M. genitalium es extremadamente difícil de aislar por métodos basados en cultivo. Jensen y cols. informaron el aislamiento exitoso de *M. genitalium* en muestras del aparato genital.¹⁹³ De 11 muestras, 9 se propagaron de modo satisfactorio en cultivos de células Vero a partir de muestras uretrales positivas por PCR de pacientes con uretritis. El crecimiento en cultivos de células Vero fue monitorizado con PCR. De estas nueve cepas aisladas, seis se adaptaron por pasajes seriados para el crecimiento en medio de Friis, un medio de crecimiento complejo que contiene solución salina tamponada de Hanks, caldo de infusión de cerebro y corazón, extracto de levadura "casero" y hasta un 20% (v/v) de suero de caballo. Estas seis cepas aisladas requirieron 1 a 19 pasajes seriados en cultivos de células Vero antes de que pudieran estar adaptadas al crecimiento en caldo y 2 a 6 pasajes en caldo antes de que se visualizaran colonias producidas sobre el agar con una fórmula similar al caldo. En este informe, los autores señalaron que, aunque el desarrollo de un medio que permitiera el crecimiento de *M. genitalium* representaba un avance fundamental, los métodos de PCR eran esenciales para la detección inicial y la monitorización de los cultivos para el crecimiento. Se han creado técnicas moleculares que son altamente sensibles y específicas para la detección de *M. genitalium* en muestras de aparato genital y muestras de la primera porción de la orina, pero estos ensayos no están ampliamente disponibles.^{94,108-110,191,192,410,483,506-508}

Para el cultivo de *M. hominis* y *U. urealyticum*, las muestras adecuadas recibidas en medios de transporte se siembran en medios líquidos y sólidos. En general, cerca de 0,2 mL de la muestra deben sembrarse por estría en medios con agar y en medios líquidos. Los caldos se incuban en aerobiosis a 35 °C, pero las placas deben incubarse en estufa con CO₂ o en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela. Ambos microorganismos también pueden aislarse cuando se incuban en anaerobiosis. Las placas sembradas deben examinarse a diario con un aumento de 40x y luz oblicua para observar las colonias con forma de huevo frito de *M. hominis* o las colonias pequeñas y densas de *U. urealyticum*. En el caso de los cultivos en caldo, cualquiera de los tubos que muestren el más leve cambio de color alcalino o turbidez debe ser subcultivado en los medios sólidos adecuados. En el caldo *M. hominis* produ-

ce turbidez leve además del cambio de color. En el caldo U, *U. urealyticum* tenderá a producir un cambio leve de color al comienzo de la incubación sin una turbidez distinta o evidente. En ambos casos deben realizarse subcultivos en esos tiempos para asegurar el aislamiento de bacterias viables, ya que hay una disminución rápida de la viabilidad de los microorganismos una vez que se eleva el pH por la utilización y la depleción del sustrato. Al igual que las placas de cultivo primario, las placas de los subcultivos deben examinarse todos los días. La mayoría de las cepas aisladas de *M. hominis* y *U. urealyticum* crecen en el transcurso de 5 a 7 días. Si después de este tiempo no se observa proliferación en las placas del cultivo primario o en los subcultivos en caldo, el cultivo puede informarse como negativo para micoplasmas genitales. Es una buena idea congelar alícuotas de los caldos positivos a -70°C por si aparecen problemas con la viabilidad en los cultivos directos en agar o en los subcultivos. El esquema general para el aislamiento de micoplasmas genitales se presenta en la figura 18-2.

La identificación de micoplasmas genitales suele ser bastante sencilla. Las colonias de *M. hominis* crecen en 1 a 5 días, presentan la morfología típica de huevo frito y tienen un diámetro de 50 a 300 fm; para ayudar a su visualización, pueden teñirse con el colorante de Diene (protocolo 18-1) (véase lámina en color 18-1B). No son necesarios otros procedimientos de identificación porque los microorganismos que crecen con rapidez, utilizan la arginina y muestran la morfología típica de la colonia invariablemente son *M. hominis*. Las colonias pequeñas de *U. urealyticum* pueden ser difíciles de distinguir de diversos artificios, como células de mamíferos y detritos o materiales celulares presentes en el suero. Por estos problemas, la presunción de que una proliferación de colonias corresponda a *U. urealyticum* deben ser confirmada. Esto se realiza aprovechando la capacidad de *U. urealyticum* de hidrolizar la urea. Si el medio agar U contiene urea y rojo fenol, la colonia sospechosa de ser ureaplasma aparecerá rodeada por un halo rojo.

La confirmación de *U. urealyticum* en colonias sospechosas también pueden lograrse mediante la prueba de cloruro manganoso-urea (protocolo 18-3). En esta prueba, la placa de agar que contiene la proliferación de colonias se cubre con una solución acuosa de urea (1%) y 0,8% (p/v) de cloruro manganoso. La hidrólisis de la urea por la ureasa libera grupos hidroxilos del agua y éstos oxidan el cloruro manganoso a óxido de manganoso insoluble, lo que causa el depósito de un precipitado castaño dorado en las colonias en el transcurso de unos minutos.

Los medios de agar diferencial A7 de Shepard y sus modificaciones, los agares A7B y A8, tienen la urea y el reactivo para la detección de la hidrólisis de la urea incorporado ya en el medio, de modo que no se requiere cubrir la placa con cloruro manganoso.^{390,392,393} El agar A7 contiene sulfato manganoso como agente precipitante junto con penicilina (1 000 U/mL) y anfotericina B (2,5 µg/mL). El agar diferencial A7B es idéntico al agar A7, salvo que se agrega la poliamina dihidroclorhidrato de putrescina (10 mM) para aumentar la proliferación de ureaplasmas y la formación del precipitado en las colonias. El agar diferencial A8 incorpora cloruro de calcio (1 mM) como catión divalente indicador para detectar la formación de amoniaco a partir de la urea, junto con colistina (7,5 µg/mL), ampicilina (1 µg/mL y anfotericina B (2,5 µg/mL). En las tres fórmulas de medio, *M. hominis* aparece con la morfología característica de huevo frito después de 1 a 3 días en los agares diferenciales A7, A7B y A8. Las colonias de *U. urealyticum* apare-

cen en el transcurso de 1 a 3 días y tienen de 15 a 50 µm de diámetro (de acuerdo con la cantidad de bacterias). Las colonias de *U. urealyticum* en los agares A7 y A7B son de color castaño oscuro debido a la acumulación de óxido de manganoso, mientras que las colonias en el agar diferencial A8 son doradas a castaño claro (véase lámina en color 18-1B). Varias evaluaciones comparativas de los medios A7, A7B y A8 indican que es probable que constituyan los medios sólidos de elección para el cultivo de micoplasmas genitales y, cuando se utilizan con un medio líquido adecuado (p. ej., caldo de azul de bromotimol, caldo Boston), brindan el rendimiento máximo de cultivos positivos.^{242,347,498} Como las características de crecimiento de *U. urealyticum* en estos medios son patognomónicas, no es necesario el empleo de ninguna otra prueba. Los agares diferenciales A7 y A8 son comercializados por Remel Laboratories (Lenexa, KA).

La identificación definitiva de *M. hominis* puede realizarse mediante la inhibición del crecimiento por antisueros específicos. También se ha publicado un método de inmunoperoxidasa indirecta para la identificación de micoplasmas.¹⁷⁹ Este método emplea tiras de papel de filtro impregnadas con antisueros específicos de conejo contra diversas especies de micoplasma que se aplican a los cultivos de estos microorganismos en placas de agar. Después de una hora se eliminan los papeles y en el mismo sitio se cubre con otra tira de papel de filtro impregnada con antisuero de cabra dirigido contra el antisuero de conejo y conjugado a peroxidasa de rábano. Después de otra hora de incubación, los papeles de filtro se retiran y la placa se cubre con el sustrato de la enzima (1% de 4-cloro-1-naftol). La identidad de la cepa aislada se indica por la aparición de un color azul oscuro donde se habían colocado los antisueros específicos de especie. Este método produce resultados comparables con los del procedimiento de inhibición del crecimiento por antisuero. También se han realizado procedimientos similares mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para el estudio de micoplasmas en animales, en las que las especies que tienen tropismos similares por los tejidos pueden estar presentes en cultivos mixtos.²⁷

Detección de micoplasmas genitales por procedimientos que no utilizan cultivos

También se evaluó la capacidad de los métodos que no utilizan cultivos para detectar micoplasmas genitales. Hirai y cols. crearon una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la identificación de *M. hominis* en muestras vaginales.¹⁶¹ La tinción de células Vero infectadas por otras especies de *Mycoplasma*, como *M. orale*, *M. salivarium* y *M. fermentans*, demostró que el procedimiento de IFI era específico para *M. hominis*. La prueba de IFI se comparó con cultivos de muestras vaginales recolectadas de 193 mujeres sanas. De las 22 muestras con cultivos positivos, 17 fueron positivas con la prueba de IFI. Es interesante destacar que 48 de las 171 muestras negativas por cultivo fueron positivas con la prueba de IFI, lo que indica que este método fue más sensible que el cultivo. Estos investigadores también comprobaron que la localización de los agregados granulares observados en las células epiteliales vaginal teñidos con Papanicolaou con frecuencia se correspondían con las áreas de los frotis que se teñían con los reactivos de IFI específicos para *M. hominis*.¹⁶¹

En un comienzo se aprovechó la técnica de sondas para la detección de *M. genitalium* en muestras urogenital porque este microorganismo es muy difícil de aislar mediante cultivo. Dada la reconocida reactividad antigénica cruzada entre *M. genita-*

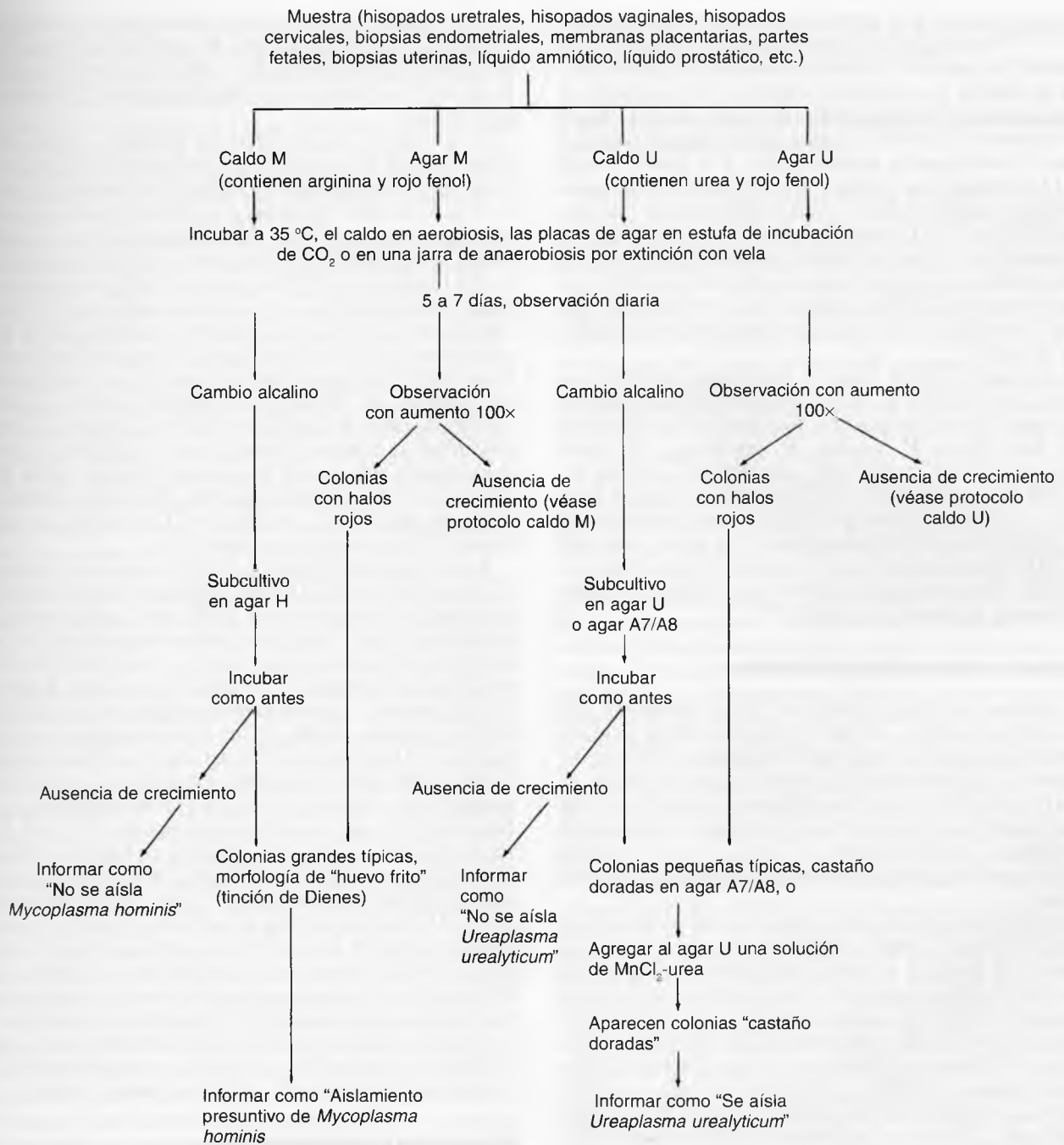


Figura 18-2 Protocolo para el aislamiento de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras genitales.

lium y *M. pneumoniae* y la similitud de ciertas secuencias nucleotídicas de estos microorganismos, las sondas de ácido nucleico para *M. genitalium* tuvieron que ser construidas para excluir aquellas secuencias nucleotídicas compartidas con *M. pneumoniae* con el objeto de evitar los resultados falsos positivos.⁵⁰⁴ Estas sondas de DNA cuidadosamente construidas se utilizaron junto con las técnicas de amplificación y PCR para detectar en forma directa secuencias nucleotídicas específicas de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* en muestras clínicas.^{161,196} En un estudio, 10 de 150 muestras genitales provenientes de ocho pacientes (tres hombres y cinco mujeres) fueron positivas para *M. genitalium*.¹⁹⁶ Estos resultados fueron confirmados por

pruebas de hibridación por Southern blot, ya que no se realizaron cultivos.

También se han utilizado ensayos moleculares para la detección y la identificación específica de *M. hominis* y *U. urealyticum* en muestras del aparato genital, líquido amniótico y respiratorios de recién nacidos.^{34,274,410,508} Los ensayos de PCR para *M. hominis* utilizaron para la amplificación y la detección secuencias del rRNA 16S específicas de *M. hominis*, mientras que ensayos similares para *U. urealyticum* emplearon secuencias rRNA 16S específicas del microorganismo, las secuencias del gen para el antígeno MB (*multiple banded*; bandedo múltiple, variación antigénica) o las secuencias del gen para la ure-

asa para la detección y la identificación de este microorganismo.^{33,34,186,444} Algunas de estas pruebas pueden detectar tan solo una unidad formadora de colonias en muestras del aparato urogenital de adultos y en muestras obtenidas por aspiración de líquido amniótico y endotraqueales de recién nacidos. Teng y cols. examinaron 50 muestras clínicas (8 de hisopado uretral, 8 de orina, 12 de hisopados endocervicales, 8 de líquido prostático y 14 de semen) por cultivo y PCR.⁴⁴³ Los cultivos fueron positivos para cinco muestras y otras cuatro muestras más produjeron cambios de pH adecuados en caldo, pero no crecieron en los subcultivos en medios sólidos (positivos "dudosos"). La PCR fue positiva en las cinco muestras positivas por cultivo, en las cuatro muestras positivas dudosas, más tres muestras (una de líquido prostático y dos endocervicales) que fueron negativas por el cultivo.

Los métodos de PCR para *M. fermentans* detectan una secuencia característica de DNA que aparece repetitivamente en el genoma del microorganismo, mientras que las empleadas para la detección de *M. hominis*, *M. penetrans* y *M. pirum* detectan secuencias nucleotídicas características dentro del rRNA 16S de estas especies.^{133,134,484} Aunque los métodos serológicos y genéticos sugieren que *M. fermentans* representa un grupo homogéneo de microorganismos, las cepas asociadas con el SIDA, las aisladas en cultivos celulares y otras cepas clínicas de *M. fermentans* pueden diferenciarse entre sí mediante espectrometría de masas con pirólisis.¹⁴⁶

Sistemas comerciales de cultivo para *Mycoplasma*

Los sistemas en frasco Mycotrim® RS y Mycotrim® Triphasic (Irvine Scientific, Irvine CA) son los únicos sistemas comerciales que han sido muy utilizados para el cultivo de *M. pneumoniae* y los micoplasmas genitales, respectivamente. El sistema Mycotrim® GU está disponible en la forma de caldo de enriquecimiento que puede utilizarse con agares diferenciales convencionales, como los agares A7 o A8, o como un sistema de cultivo completo, denominado sistema en frascos Mycotrim Triphasic.

El sistema Mycotrim RS está compuesto por un frasco que contiene una capa de medio enriquecido de agar glucosa y el indicador rojo fenol en un lado y un caldo de composición similar. Treinta minutos antes de la inoculación con la muestra, se agregan a los frascos discos saturados con cefoperazona, nistatina y acetato de talio para permitir que los antimicrobianos eluyan del disco y se difundan en el agar. Para agregar las muestras líquidas y "estriar" la superficie del agar se emplea una pipeta. Las muestras de hisopados se rotan sobre la superficie del agar. El frasco se incuba con el lado del agar hacia arriba durante 2 semanas entre 35 °C y 37 °C. Luego de 3 días se realiza la reinoculación mediante la manipulación del frasco de modo que el caldo bañe la superficie de la fase del agar. El crecimiento está indicado primero por un cambio en el indicador del rojo al amarillo anaranjado sin turbidez notoria. La identificación definitiva se realiza colocando el frasco sobre la platina de un microscopio óptico con el agar hacia arriba y se examina la superficie del agar para determinar la presencia de colonias de micoplasma. Esto puede realizarse con el agregado del colorante de Diene o sin él.

El caldo Mycotrim GU y el frasco Mycotrim Triphasic son los únicos sistemas comerciales que son muy utilizados para el aislamiento y la identificación de los micoplasmas genitales *M. hominis* y *U. urealyticum*. El caldo Mycotrim GU contiene arginina, urea y rojo fenol como indicador. Este caldo se inocula con 0,1 mL de la muestra y se incuba en aerobiosis a

35 °C. El medio se observa para evaluar cambios en el color del indicador a un pH más alcalino; los subcultivos en medios sólidos como agar diferencial A7 o A8 y la posterior incubación permiten el aislamiento y la identificación de *M. hominis* y *U. urealyticum*.

El sistema en frasco Mycotrim Triphasic (antes conocido como sistema Mycotrim GU) es un sistema difásico que contiene agar diferencial A8 modificado con cloruro de calcio en un frasco de cultivo de tejido y un medio líquido que contiene arginina, urea y rojo fenol como indicador. Antes de la inoculación se agregan discos impregnados con cefoperazona (100 µg/mL) y nistatina (50 U/mL) para permitir que los antimicrobianos eluyan del disco y se difundan en el agar. El frasco se inocula con 0,10 mL de la muestra y se hace que la mezcla caldo-muestra bañe la fase de agar. El frasco se incuba a 35 °C. El subcultivo se logra al permitir que el caldo bañe la fase de agar después de 24 horas de incubación. Cuando aparece un cambio de color del indicador rojo fenol del rojo al amarillo anaranjado se examina la fase de agar con el microscopio para determinar la presencia de las colonias típicas en huevo frito de *M. hominis* o las colonias pequeñas, teñidas de castaño por el óxido de calcio de *U. urealyticum*. Los cultivos se incuban durante 7 días con observaciones diarias.

En un estudio publicado en 1985, Wood y cols. hallaron que el sistema Mycotrim GU puede utilizarse como el método convencional con caldo arginina, caldo urea, agar glucosa y agar diferencial A7B.⁴⁹⁷ Un estudio ulterior que comparó el sistema Mycotrim GU con el cultivo en medio A7 determinó que el sistema Mycotrim detectó el 73% de las cepas de *M. hominis* y el 84% de las de *U. urealyticum* en comparación con el 93% y el 89%, respectivamente, de los microorganismos aislados en agar A7.³⁴⁷ Un estudio de 1992 del sistema en frasco Mycotrim Triphasic del mismo laboratorio que realizó el estudio de 1985 comparó este sistema con uno de cultivo utilizando el caldo Mycotrim GU con los agares diferenciales A7 y A8 en 129 muestras clínicas.⁴² De las 64 muestras en las que se desarrolló *U. urealyticum*, el 25%, el 98% y el 100% se detectaron en el agar Mycotrim Triphasic, agar A7 y agar A8, respectivamente. De las 18 muestras a partir de las cuales se aisló *M. hominis*, todas crecieron en los cultivos de caldo agar A7 y caldo agar A8 y el 94% se detectó en el agar Mycotrim Triphasic. En los laboratorios que realizan una cantidad modesta de trabajo sobre micoplasma, parece que el caldo Mycotrim GU combinado con un medio de agar diferencial y el sistema Mycotrim Triphasic son bastante comparables, aunque los componentes para el procedimiento "convencional" pueden ser menos costosos.

Aislamiento de micoplasmas en medios de cultivo habituales

En general, *M. pneumoniae* y *U. urealyticum* tienen más requerimientos nutricionales especiales para el crecimiento que *M. hominis* y ésta es la única que se aísla con mayor frecuencia en sitios distintos del aparato genital, como sangre, heridas y líquido articular. Por consiguiente, *M. hominis* en ocasiones se aísla en los medios de cultivos bacteriológicos habituales. El microbiólogo clínico debe poder reconocer estos microorganismos en condiciones subóptimas. *M. hominis* puede crecer en medios enriquecidos como el agar Columbia CNA y el agar chocolate; crece algo menos en agar sangre tripticasa soja.³³⁵ Los microorganismos crecen mejor en condiciones anaerobias, con un crecimiento menos rápido en un ambiente aerobio, enriquecido con CO₂. El desarrollo de los micoplasmas puede no ser evidente hasta después de una

incubación prolongada (72 a 96 horas), de acuerdo con las condiciones de incubación y la cantidad de microorganismos presentes. Las colonias de *M. hominis* son extremadamente pequeñas y pueden detectarse sólo como una "película" o "moteado" de la superficie del agar cuando se examina con una luz reflejada incidente intensa. La observación de este tipo de crecimiento se facilita mediante el empleo de un microscopio de disección. Las colonias son difíciles de tomar con el ansa y no se tiñen con la técnica de Gram.

Las colonias sospechosas de ser micoplasma provenientes de un medio con agar habitual pueden subcultivarse cortando el bloque del agar sangre y frotando el lado que tiene la proliferación bacteriana sobre la superficie de un medio de crecimiento para micoplasma como agar diferencial A7. Otro bloque debe ser retirado de modo aséptico y sumergido en un medio líquido como caldo H o caldo Boston. Ambos subcultivos en medios líquidos sólidos se incuban y el procedimiento sigue como se describió antes. La inspección de la morfología de la colonia, junto con la velocidad de crecimiento y la evaluación de las condiciones óptimas de crecimiento, permitirá realizar la identificación presuntiva de la especie.

En ocasiones, *M. hominis* también se aísla en hemocultivos, en particular en mujeres con fiebre posparto. El polianetol sulfonato de sodio (SPS), el agregado anticomplementario y antifagocítico presente en la mayoría de los medios de hemocultivo, es tóxico para los micoplasmas. En general, cuanto mayor es el contenido de SPS (0,025% frente a 0,050%), más inhibitorio resulta el medio para el aislamiento de micoplasmas.⁸⁰ Los micoplasmas se han aislado en medios de hemocultivos radiométricos (el sistema BACTEC®), pero el SPS inhibe o retarda el aislamiento del microorganismo, según el contenido de SPS del caldo. Smaron y cols. aislaron *M. hominis* en hemocultivos utilizando el sistema radiométrico BACTEC con medios exentos de SPS.⁴⁰³ Los microorganismos se detectaron en los frascos ampolla de hemocultivo en aerobiosis y en anaerobiosis tras 3 a 7 días de incubación. Los frascos con sangre no presentaban el aspecto macroscópico de positividad y los índices de proliferación en equipo BATEC aumentaron lentamente con el tiempo. Además, las tinciones de Gram de los frascos positivos no revelaron la presencia de microorganismos, si bien fueron visibles cuando se los observó con la tinción de naranja de acridina. Se observó que el agregado de 10 mg/mL de gelatina a los medios de hemocultivo supera en parte los efectos inhibitorios del SPS.⁸⁰ Asimismo, la presencia de sacarosa en los medios hipertónicos de hemocultivos retrasa el crecimiento de los micoplasmas.⁸⁰ En el sistema BACTEC puede haber, en cierta medida, crecimiento de micoplasmas, pero el índice de proliferación de los cultivos puede no exceder el valor umbral para considerar positividad. Pratt explicó este fenómeno señalando que la producción de CO₂ por *M. hominis* es el resultado de la actividad de la arginina desaminasa producida por el microorganismo al final de la fase de crecimiento logarítmico. La limitación de las concentraciones de arginina puede evitar que la proliferación de micoplasmas alcance los niveles umbrales de positividad del equipo BACTEC.³⁵⁵

Si se sospecha bacteriemia por *M. hominis*, el procedimiento óptimo es extraer la sangre a la cabecera del paciente e inocularla en un medio exento de SPS. La incubación de los cultivos debe ser prolongada y es necesario realizar subcultivos a ciegas en medios para aislamiento de micoplasma en agar y caldo adecuados, además de agar CNA a intervalos frecuentes. La sangre para el aislamiento de micoplasmas debe inocularse directamente en medios de cultivo para micoplasma. La sangre debe diluirse 1:10 con medio de crecimiento, de modo que el

cultivo de un volumen importante de sangre puede requerir varios frascos ampolla de medios de cultivo.

Pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

Debido a la limitada disponibilidad de cultivos, las dificultades técnicas inherentes al cultivo y el tiempo requerido para obtener los resultados, el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* a menudo se realiza mediante una combinación de hallazgos clínicos y serológicos. El diagnóstico sólo sobre bases clínicas es difícil, ya que muchos otros procesos neumónicos, en especial los causados por virus, se presentan de un modo similar. Además, la persistencia de *M. pneumoniae* en el aparato respiratorio durante períodos variables después de la resolución del proceso mórbido crea confusión en cuanto a la interpretación de los resultados positivos de los métodos de detección basados en el crecimiento y de los métodos moleculares. La prueba serológica más utilizada para el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* es la fijación del complemento (FC). El antígeno utilizado en la prueba es un glucolípidio proveniente del microorganismo que se extrae con cloroformo-metanol (2:1 v/v).²²⁰ La prueba de FC determina sobre todo los anticuerpos IgM tempranos contra *M. pneumoniae* y detecta anticuerpos IgG en una magnitud comparativamente menor.¹⁸² Los anticuerpos IgM aparecen durante la primera semana de la enfermedad, alcanzan sus títulos máximos en la tercera semana y disminuyen a concentraciones bajas en algunos meses. Los anticuerpos IgG aumentan con más lentitud en la evolución de la enfermedad y alcanzan los títulos máximos alrededor de las 5 semanas después del comienzo de los síntomas.¹⁸³ En la mayoría de los casos, los anticuerpos IgG contra *M. pneumoniae* no se encuentran durante la primera semana de la enfermedad, pero, una vez que se elevan, pueden permanecer así durante 3 a 4 años. Por consiguiente, las concentraciones bajas de IgG pueden indicar una infección pasada o una respuesta temprana de IgG ante una infección reciente. Como estos anticuerpos fijadores del complemento pueden persistir durante años tras la infección, la precisión diagnóstica máxima con la prueba de FC se obtiene cuando las muestras de suero de la fase aguda y de convalecencia muestran un aumento de cuatro veces en el título cuando se prueban al mismo tiempo, lo que indica infección reciente o actual por *M. pneumoniae*. La muestra de la fase aguda debe recolectarse lo antes posible después del comienzo de la enfermedad y la muestra de la fase de convalecencia se debe recolectar 2 a 3 semanas más tarde. Los títulos de la FC únicos de 32 o mayor de la muestra recolectada en el período de convalecencia son altamente sugestivos de infección reciente.²²⁰ Los títulos de FC comienzan a elevarse a los 7 a 10 días después de la infección por el microorganismo y alcanzan los valores máximos a las 4 a 6 semanas.¹⁸² El extracto no procesado de *M. pneumoniae* que se utiliza en la prueba de FC tiene una estructura similar a los otros glucolípidos bacterianos y de plantas, de modo que pueden aparecer reacciones cruzadas de este antígeno con otros anticuerpos no dirigidos contra los micoplasmas. Los títulos de FC para el diagnóstico de neumonía por micoplasmas pueden ser falsos positivos en individuos con meningitis bacteriana. Además, algunas enfermedades autoinmunitarias también pueden causar resultados serológicos por FC falsos positivos.¹⁸² Aunque el diagnóstico serológico de infección mediante la prueba de FC suele ser confiable en las poblaciones pediátricas, no sucede lo mismo con los adultos.⁴⁸⁸ Los anticuerpos IgM pueden no ser

producidos de modo uniforme en los individuos mayores como consecuencia de infecciones múltiples pasadas. Además, es probable que los huéspedes inmunodeprimidos mayores no monten una respuesta inmunitaria suficiente como para generar resultados detectables y reproducibles en la prueba de FC.

La sensibilidad y la especificidad de la prueba de FC en el diagnóstico retrospectivo de infección por *M. pneumoniae* varían de acuerdo con el momento de la enfermedad en que se recolectaron las muestras, la disponibilidad de muestras apareadas y el valor de corte utilizado para la interpretación de los títulos de muestras únicas de suero. En un estudio realizado por Kenny y cols., la elevación de cuatro veces en el título mostró una sensibilidad de sólo el 53% en los pacientes afectados por neumonía con cultivos positivos.²²⁰ Esta sensibilidad aumentó al 90% cuando se incluían los títulos únicos mayores de 32. La especificidad de la prueba de FC que emplea un aumento del título de cuatro veces o un título de 32 o mayor fue del 89%. Un estudio numeroso de 12 años de duración sobre la prueba de FC y el cultivo para el diagnóstico de *M. pneumoniae* determinó que la sensibilidad y la especificidad de la prueba de FC eran del 90% y el 94%, respectivamente, mientras que la sensibilidad del cultivo fue del 64%.¹⁸² Además, otras especies de *Mycoplasma* (*M. genitalium*) generan la producción de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada en la prueba de FC para *M. pneumoniae*, lo que contribuye aún más a los problemas de especificidad de esta prueba. Se describieron procedimientos de inmunotransferencia por Western blot para sortear estos problemas, pero estos métodos no están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos.

En la actualidad se comercializan de pruebas serológicas que emplean inmunofluorescencia y enzoinmunoanálisis. El *M. pneumoniae* Antibody Test System® (Zeus Scientific, Raritan, NJ) emplea inmunofluorescencia indirecta para la detección separada de IgG e IgM específicas contra *M. pneumoniae*. En una evaluación de este ensayo, la IFI para IgM específica contra *M. pneumoniae* se comparó con PCR, cultivo y FC para el diagnóstico de infección por micoplasmas.¹⁰¹ Sobre la base de la positividad del cultivo y de la FC como criterios para un diagnóstico positivo de infección, la sensibilidad de la prueba IFI para IgM fue del 78% y la especificidad del 92%. El valor predictivo de la prueba IFI para IgM positiva en este estudio fue de sólo el 57%. En otra evaluación que utilizó resultados consensuados para definir los positivos verdaderos como aquellos que brindan resultados positivos en dos o más ensayos de EIA o FC (más revisiones de las historias clínicas), la IFI para IgM tuvo sensibilidad y especificidad del 89% y 99%, respectivamente.⁷

También se han desarrollado enzoinmunoanálisis (EIA) para la detección de anticuerpos específicos contra *M. pneumoniae*. Los equipos para microtitulación por EIA incluyen *Mycoplasma pneumoniae* IgG/IgM antibody test system® (Remel), ImmunoWELL *Mycoplasma pneumoniae* IgM EIA® (GenBio, San Diego, CA), Zeus *Mycoplasma* IgM EIA® (Zeus Scientific), Incstar *Mycoplasma* IgM ELISA® (Incstar, Stillwater, MN), Platelia IgM and IgG *Mycoplasma* EIA® (Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Francia), Biotest anti-*M. pneumoniae* IgG and IgM ELISA® (Biotest, Buc, Alemania) y ETI-*M. pneumoniae* IgM/IgG assay® (Diasoren, Antony, Francia). Los ensayos ImmunoWELL, Zeus e Incstar emplean placas de microtitulación para detectar anticuerpos IgM contra *M. pneumoniae* en muestras de suero. Los ensayos ImmunoWELL y Zeus emplean un paso de absorción de la IgG para evitar su interferencia en la muestra, mientras que los métodos de Incstar y Platelia IgM capturan la IgM.

Los EIA de Remel, Platelia, Biotest y ETI detectan IgM e IgG. Estos ensayos con formato de microtitulación varían en el tipo de antígeno utilizado en la fase sólida que incluyen ultrasonificados solubilizados y purificados de cultivos de *M. pneumoniae* (p. ej., Platelia y Biotest), glucolípidos purificados de *M. pneumoniae* (p. ej., ImmunoWELL) o antígenos proteicos purificados de la membrana que incluyen la citoadhesina P1 inmunodominante de *M. pneumoniae* (p. ej., ETI) como el antígeno predominante en la fase sólida. La especificidad de la comprobación de IgM por EIA mejora cuando se emplea un método de captura de IgM. En una evaluación comparativa de varios ensayos para IgM sólo se notó una especificidad del 100% en el Platelia IgM EIA, que emplea captura de IgM (es decir, la fase sólida se recubre con anticuerpos anticadena μ), mientras que los ensayos que utilizan absorción de IgG u otros métodos de eliminación de IgG para la detección de IgM tienen especificidades que varían del 90% (ImmunoWELL IgM) al 25% (ETI-*M. pneumoniae* IgM).³⁴² En general, los ensayos para IgM son más sensibles y específicos cuando se comprueban sueros de niños, ya que los adultos pueden no montar una respuesta importante de IgM.³⁹⁸ Además, dado que las poblaciones de adultos tienden a presentar títulos más elevados de IgG específica contra *M. pneumoniae* provenientes de infecciones pasadas o subclínicas, la comprobación de muestras de suero pareadas recolectadas con una separación de 1 a 3 semanas que muestren un aumento del título de anticuerpos de cuatro veces o más es el método más útil para determinar infecciones agudas en los adultos.⁴⁶²

En los últimos años aparecieron en el mercado varias pruebas serológicas rápidas basadas en membrana para IgM e IgG específicas contra *M. pneumoniae*. El sistema de Remel para IgG e IgM contra *Mycoplasma pneumoniae* es un EIA que se realiza en 5 minutos para la detección cualitativa y simultánea de anticuerpos contra *M. pneumoniae*. El suero del paciente se diluye y reacciona con el antígeno de *M. pneumoniae* que está inmovilizado sobre una membrana permeable. Después del lavado, se agrega IgG/IgM antihumana marcada con enzimas y se permite que se enjuague a través de la membrana. Después de dos lavados se agrega el sustratocromógeno al filtro y se lo deja reaccionar durante 5 minutos. Thacker y Talkington evaluaron esta prueba con 50 muestras pareadas de suero y encontraron que la prueba Remel detectó anticuerpos en tres muestras con títulos de FC de 32 y fue positiva en todas menos una muestra con títulos de FC de 64 o mayor.⁴⁴⁵ Otra evaluación de este sistema comunicó una sensibilidad del 91% y una especificidad del 91%, con los correspondientes valores predictivos positivos y negativos del 87% y el 93%, respectivamente.¹⁵ El sistema Meridian ImmunoCard *Mycoplasma* IgM assay® (Meridian Biosciences, Cincinnati, OH) es un EIA cualitativo basado en membrana que se lleva a cabo en 10 minutos en el cual el suero se deja reaccionar con extractos antigénicos de *M. pneumoniae* impregnados en papel de filtro. Este ensayo no requiere la separación de la IgM ni la eliminación de la IgG del suero antes de realizar la prueba. Las evaluaciones de este ensayo sugieren que la prueba ImmunoCard es más sensible que otras pruebas serológicas para detectar concentraciones bajas de anticuerpos IgM.^{7,107,286,446} En una evaluación del ensayo mediante el empleo de muestras provenientes de 40 pacientes pediátricos, todas las muestras de suero de fase aguda fueron positivas con la ImmunoCard, mientras que las pruebas de FC y aglutinación de partículas fueron positivas en el 30% y el 77,5% de los casos, respectivamente.²⁸⁶ En otra evaluación comparativa con 64 sueros de fase aguda de adultos, la ImmunoCard detectó IgM específica en el 46% de las mues-

tras, mientras que la prueba de FC, el Remel EIA y el ImmunoWELL IgM EIA detectaron anticuerpos en el 38%, 41% y 23%, respectivamente.⁴⁴⁶ Una tercera evaluación con 145 sueros de fase aguda provenientes de niños informó sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos del 85%, 97%, 93% y 93%, respectivamente, cuando se comparó con los métodos de microtitulación de IgM por EIA de Remel y de Zeus.¹⁰⁷ Estas evaluaciones del ensayo ImmunoCard para IgM de *Mycoplasma* sugieren que esta prueba rápida es altamente confiable para establecer un diagnóstico de infección reciente por *M. pneumoniae* tanto en niños como en adultos.

También se comercializan ensayos de aglutinación de micropartículas para la detección de anticuerpos contra *M. pneumoniae*. La prueba Serodyne Color Vue IgG/IgM® (Serodyne, Indianápolis, IN) utiliza partículas de látex recubiertas con el antígeno lipídico de *M. pneumoniae*, mientras que la prueba Serodia-Myco II® (FujireBio, Tokio, Japón) utiliza partículas de gelatina sensibilizadas de manera similar. Ambas pruebas se realizan mediante la dilución seriada de suero del paciente inactivado por calor en una placa de microtitulación y el agregado de una alícuota fija de las partículas de látex o gelatina recubiertas con el antígeno lipídico de *M. pneumoniae* en cada pocillo que contiene la dilución. Después del mezclado en un agitador para microplacas y de la incubación se determina el título como la última dilución del suero que causa la aglutinación de las partículas sensibilizadas con el antígeno. Thacker y Talkington evaluaron la prueba de aglutinación pasiva Serodyne que se realiza en 40 minutos y la hallaron menos sensible que el EIA de Remel; sólo el 68% de los casos de neumonía por micoplasmas pudieron ser diagnosticados serológicamente con este equipo en comparación con el 94% y el 96% de los casos diagnosticados por las pruebas de FC y de Remel, respectivamente.⁴⁴⁵ Lieberman y cols. evaluaron la prueba de aglutinación de partículas de gelatina Serodia-Myco II y encontraron que la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos eran del 48,1%, 86,9%, 49,3% y 86,3%, respectivamente.²⁵¹ Otros investigadores también notaron especificidad inadecuada de esta prueba en comparación con un EIA de captura específica de IgM y una IFI para IgM.¹⁷

La purificación y la secuenciación de la adhesina P1 de *M. pneumoniae* y el reconocimiento de epítomos inmunodominantes de P1 y otras moléculas de la superficie celular pueden permitir la elaboración de péptidos sintéticos para utilizar como antígenos específicos, químicamente definidos, en pruebas serológicas futuras para *M. pneumoniae*.¹⁸⁵ Suni y cols. evaluaron un método de EIA nuevo (*M. pneumoniae* IgG, IgA and IgM®, Thermolabsystems, Helsinki, Finlandia) en el cual el antígeno en fase sólida está enriquecido por el antígeno proteico de citoadherencia P1 de *M. pneumoniae*.⁴¹⁷ Cuando se lo comparó con los EIA ImmunoWELL y Platelia, la sensibilidad y la especificidad de esta prueba fueron del 100% y del 96,5-100%, respectivamente. Otro grupo investigó el desempeño de dos EIA nuevos en comparación con la prueba de FC. En uno de ellos, la fase sólida contenía antígeno recombinante P1; en el otro, la fase sólida contenía antígeno recombinante p116.¹⁰² Ambos antígenos tienen antigenicidad demostrable y generan la formación de anticuerpos específicos en pacientes infectados.^{104,105,175} Este estudio encontró que los ensayos con antígeno recombinante mostraron buena correlación con la prueba de FC, y que el EIA con P1 recombinante muestra mejor discriminación entre muestras positivas y negativas.¹⁰² El empleo de epítomos antigénicos específicos de especie en las pruebas serológicas para la infección por *M. pneumoniae* puede ayudar a eliminar resultados falsos positivos como consecuencia de

infecciones respiratorias o urogenitales por *M. genitalium*, ya que se sabe que estos microorganismos tienen antígenos que reaccionan en forma cruzada.²⁵⁴

Asimismo, se investigó el serodiagnóstico mediante la detección de concentraciones séricas de IgA contra *M. pneumoniae* como un método posible para el diagnóstico de infección por ese microorganismo. Watkins-Riedel y cols. evaluaron un método de EIA para IgA que se realiza en 3 horas (SeroMP-IgA kit®; Savyon Diagnostics, Ashdod, Israel) y lo compararon con el ensayo de aglutinación de micropartículas (Serodia Myco II; FujireBio), la prueba de FC, un EIA específico para IgM (SeroMP-IgM kit®; Savyon Diagnostics) y el EIA rápido Immuno-Card IgM (Meridian Diagnostics) en muestras de suero en fase aguda provenientes de 23 pacientes con neumonía por *M. pneumoniae*.⁴⁹⁰ El ensayo para IgA mostró una sensibilidad del 96% al 100% y una especificidad del 91% al 100%. La sensibilidad de los otros ensayos varió del 87% al 91%. Durante el transcurso de este estudio, los investigadores notaron que los pacientes más jóvenes tendían a presentar concentraciones de IgM mayores que los adultos, mientras que los pacientes adultos tendían a mostrar concentraciones más elevadas de anticuerpos IgA. Al parecer, este ensayo parecía resolver dos de las deficiencias de la serología para micoplasma: la sensibilidad y la especificidad comparativamente menores de la prueba de FC y la presencia no uniforme de IgM específica contra *M. pneumoniae* en pacientes adultos infectados.

Una prueba serológica inespecífica que a menudo se utiliza para apoyar el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* es la producción de **crioaglutininas**. Estas aglutininas reaccionan en frío con los antígenos eritrocíticos humanos I. El antígeno I es inactivado por la α -glucosidasa y la unión de las crioaglutininas a estas células es inhibida por la galactosa.^{72,499} Además, cuando los eritrocitos que contienen el antígeno I se someten a la extracción con cloroformo-metanol, se extrae un antígeno que fijará el complemento en presencia de anticuerpos contra *M. pneumoniae*.⁴⁹⁹ Estos datos indican que el antígeno I de eritrocitos detectado por crioaglutininas es similar en cuanto a la estructura a ciertos determinantes antigénicos de la membrana glucolipídica de *M. pneumoniae*.¹⁸⁹ Al igual que otros anticuerpos IgM, las crioaglutininas aparecen alrededor de 7 días después de la infección y alcanzan el máximo a las 4 o 5 semanas. A continuación, los títulos disminuyen con rapidez y se tornan indetectables después de casi 5 meses. Como sucede con la FC y otras pruebas serológicas, la elevación de cuatro veces en los títulos de crioaglutininas en presencia de una enfermedad clínica compatible es sugestiva de infección por *M. pneumoniae*. El principal inconveniente en utilizar esta prueba sola para el diagnóstico presuntivo es que sólo entre el 50% y el 60% de los individuos con infección aguda por *M. pneumoniae* presentará títulos de crioaglutininas demostrables.^{172,182} Además, varias otras enfermedades pueden causar aumentos en las crioaglutininas, como mononucleosis infecciosa, parotiditis, gripe, rubéola, virus sincitial respiratorio, adenovirus, enfermedad vascular periférica y psitacosis.

Pruebas serológicas para micoplasmas genitales

Los métodos serológicos también se investigaron para el diagnóstico de infecciones por *M. hominis*. Las proteínas de membrana asociadas con los lípidos (LAMP) constituyen un grupo fundamental de proteínas de la superficie celular que son

altamente antigénicas y son objetivos principales en la respuesta inmunitaria contra los micoplasmas.²⁶⁷

Las LAMP se han identificado en varias especies de *Mycoplasma*, como *M. salivarium*, *M. penetrans*, *M. pirum* y *M. genitalium* y estos antígenos se emplearon en ensayos serológicos para la comprobación de pacientes con diversos tipos de infecciones.^{483,485,486} Los anticuerpos contra estos antígenos LAMP parecen ser altamente específicos de especie, sin reacciones cruzadas evidentes con los de otras especies. Los anticuerpos contra los antígenos LAMP se emplearon para definir serotipos de *M. hominis*. En un estudio reciente se compararon la antigenicidad y los perfiles de anticuerpos de 14 cepas diferentes de *M. hominis* por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) e inmunotransferencia por Western blot.²⁶⁷ Las LAMP de estas 14 cepas mostraron perfiles similares de SDS-PAGE y el análisis por inmunotransferencia reveló que estas proteínas eran altamente inmunógenas cuando se probaban con sueros de pacientes infectados. Estos investigadores también demostraron que los sueros de 28 de 31 pacientes HIV positivos con cultivos positivos para *M. hominis* de muestras de orina reaccionaron con cada uno de los 14 aislamientos diferentes de *M. hominis* en el examen Western blot. Estos estudios mostraron que las LAMP provenientes de cualquier cepa aislada de *M. hominis* podrían utilizarse como antígeno específico en una prueba de EIA para la detección de anticuerpos contra *M. hominis*. Este EIA derivado de LAMP se utilizó para demostrar que la prevalencia de anticuerpos específicos contra *M. hominis* era significativamente mayor en los pacientes que asisten a clínicas de enfermedades de transmisión sexual (prevalencia del 67,8%) que en los donantes de sangre sanos (prevalencia del 34,4%) y que la infección por *M. hominis* afectaba a una edad mucho menor en las mujeres que en los hombres. Estos EIA para la detección de anticuerpos séricos contra *M. hominis* están disponibles sólo en el ámbito de la investigación.

Los métodos serológicos también se evaluaron como un modo para establecer la presencia de infección por *U. urealyticum*. Entre estos métodos están las técnicas de EIA, con microorganismos purificados y sonificados como antígeno de fase sólida, o técnicas de Western blot, donde los antígenos se preparan a partir del crecimiento de serovariedades representativas de *U. urealyticum* en cultivo, se efectúa la lisis de los microorganismos con SDS, la separación de antígenos por electroforesis y la transferencia de los antígenos a un papel de nitrocelulosa. Un estudio realizado en 1995 examinó la presencia de *U. urealyticum* en líquido amniótico junto con la respuesta serológica confirmada por EIA en mujeres en el tercer trimestre de embarazo que habían sido sometidas a amniocentesis por indicaciones genéticas, mujeres internadas por trabajo de parto prematuro con membranas fetales intactas y mujeres con rotura prematura de membranas.¹⁰ Aunque la prevalencia de la infección por *U. ureaplasma* fue del 2,9%, 4,3% y 17,8%, respectivamente, en los tres grupos las prevalencias correspondientes de anticuerpos fueron del 50%, 86% y 57%. Estos investigadores encontraron que la incidencia de complicaciones del embarazo como nacimiento prematuro, bajo peso al nacer o muerte fetal, fue significativamente mayor en las mujeres que habían montado una respuesta inmunitaria contra *U. urealyticum*.¹⁰ En otro estudio realizado por el mismo grupo, el 30% de las mujeres con endometritis posparto presentaron serologías positivas por EIA para *U. urealyticum*, en comparación con el 6% del grupo control.⁵⁵ Un estudio serológico de mujeres y lactantes que empleó métodos de inmunotransferencia para IgM e IgA específicas para *U. urealyticum* estableció

que el 4,5% de los lactantes nacidos con menos de 30 semanas de gestación, menos del 1,7% de los nacidos entre 30 y 34 semanas de gestación y ninguno de los nacidos a las 35 semanas o más tenían anticuerpos IgM o IgA específica detectables, lo que sugiere una posible participación de la respuesta inmunitaria en la evolución del embarazo.⁷⁵ Los estudios serológicos de este tipo pueden ayudar a clarificar la participación de la respuesta inmunitaria específica contra *U. urealyticum* en la patogenicidad de la infección y proporcionar información para el desarrollo de pruebas serológicas sensibles y específicas para aumentar los enfoques diagnósticos por cultivo y moleculares en el laboratorio clínico. Como sucede con *M. hominis*, las pruebas serológicas para *U. urealyticum* sólo están disponibles y se utilizan en el ámbito de la investigación.

Sensibilidad antimicrobiana y tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma*

La neumonía atípica causada por *M. pneumoniae* suele tratarse con tetraciclina o eritromicina.⁶⁹ Aunque el microorganismo aún puede estar presente en las vías respiratorias altas durante el tratamiento y después de éste, las manifestaciones clínicas de infección por lo general mejoran y los infiltrados observados en las radiografías de tórax suelen desaparecer durante el tratamiento. Dada la dificultad para cultivar este microorganismo, su lenta velocidad de crecimiento y la falta de un método disponible con facilidad, ya no es necesario ni adecuado la realización de antibiogramas para *M. pneumoniae*. Los antibiogramas de cepas de *M. pneumoniae* indican que este microorganismo es sensible a varios agentes antimicrobianos, como quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, garenoxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, rifloxacina), clindamicina, lincomicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, eritromicina y ciertos aminoglucósidos (estreptomina).^{103,122,145,213,429,473-475} Algunos de los antibióticos macrólidos más nuevos, como claritromicina, azitromicina y fluritromicina, también son eficaces contra *M. pneumoniae* y muestran un rango muy estrecho de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM).^{23,122,145,474} Las cepas de *M. pneumoniae* pueden mostrar menor sensibilidad a gentamicina, cloranfenicol, clindamicina y lincomicina y son francamente resistentes a penicilinas, cefalosporinas, ácido nalidíxico y rifampicina.⁴²⁹

Casi todas las cepas aisladas de *M. hominis* y *U. urealyticum* son sensibles a las tetraciclinas. Las cepas de *M. hominis* suelen ser sensibles a clindamicina y lincomicina, pero no a eritromicina y otros macrólidos (azitromicina, claritromicina). Las cepas de *U. urealyticum* suelen ser sensibles a eritromicina y azitromicina, pero no a clindamicina y lincomicina. El crecimiento de *M. hominis* y *U. urealyticum* también es inhibido por cloranfenicol, estreptomina y gentamicina, pero no por los agentes que actúan sobre la pared celular (cefalotina, ampicilina y vancomicina). A mediados y finales de la década de 1970 y a comienzos de la de 1980, se aislaron cepas de ambas especies resistentes a la tetraciclina y se encontró que contenían un determinante genético de resistencia antimicrobiana denominado *tetM*.^{365,366} Este determinante ha sido hallado también en otros microorganismos del aparato genital, como estreptococos del grupo B, *Gardnerella vaginalis* y *Neisseria gonorrhoeae*.³⁶⁷ También se describieron cepas de *U. urealyticum* que presentan resistencia o sensibilidad intermedia a la eritromicina y a los macrólidos más nuevos (p. ej., fluritromicina).^{122,218} En la

actualidad, casi todas las cepas de *M. hominis* son resistentes a la eritromicina y algunas, a la tetraciclina y la clindamicina. La resistencia a los macrólidos como eritromicina en *M. hominis* suele deberse a mutaciones en el rRNA 23S.³⁴⁰ En cepas de *U. urealyticum* también se describió resistencia a la tetraciclina; estas cepas contienen, además, el determinante de la resistencia *tetM*.^{365,366,413} La eritromicina sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de *U. urealyticum* en recién nacidos sin afección del SNC; las infecciones del SNC en este grupo de pacientes se tratan mejor con tetraciclina o cloranfenicol.⁴⁷⁷ Las cepas de *U. urealyticum* suelen ser menos sensibles a las quinolonas que *M. pneumoniae* o *M. hominis*.^{122,214,216,217,219}

El perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de *M. genitalium* parece ser similar al de *M. pneumoniae*, con sensibilidad a las tetraciclinas y a varios macrólidos.^{428,429} Renaudin y cols. determinaron la sensibilidad de siete aislamientos de *M. genitalium* mediante el empleo del método de dilución en agar y las compararon con tres cepas de *M. pneumoniae*.³⁶¹ Ambas especies fueron sensibles a los macrólidos (eritromicina, espiramicina, roxitromicina, azitromicina y claritromicina), clindamicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina y fluoroquinolonas (ofloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina).⁹² A pesar de la sensibilidad in vitro de *M. genitalium* a las tetraciclinas, varios estudios mostraron que el tratamiento con tetraciclina a menudo se asocian con fracasos terapéuticos. Un estudio realizado por Johannsson y cols. halló que el 62% de 13 varones con uretritis por *M. genitalium* tratados con tetraciclina durante 10 días aún presentaban el microorganismo en la uretra durante el seguimiento.¹⁹⁷ En otro estudio, siete varones con uretritis por *M. genitalium* tratados con doxiciclina aún padecían uretritis en el seguimiento.¹⁶⁴ En un estudio sobre tratamiento que comparó tetraciclinas y azitromicina, los seis pacientes que habían recibido azitromicina eran negativos para *M. genitalium* por PCR después del tratamiento, mientras que el 63% de 16 pacientes tratados con tetraciclina aún eran positivos por PCR para *M. genitalium* después del tratamiento.¹¹⁴ La presencia del microorganismo en el aparato urogenital con síntomas o sin ellos tras el tratamiento con estos agentes puede estar directamente relacionada con la dosis y la duración del tratamiento. Según las pautas para el tratamiento de las ETS, la azitromicina para el tratamiento de la uretritis se administra en una única dosis de 1 g.⁵⁴ Los pacientes con uretritis por *M. genitalium* que han sido tratados con azitromicina según estas recomendaciones mostraron respuestas clínicas parciales y permanecieron positivos por PCR una semana después de completar el tratamiento.¹²⁴ Whatley y cols. hallaron que 500 mg de azitromicina en una única dosis seguida de 250 mg de azitromicina una vez por día durante 2 días era más eficaz para erradicar *M. genitalium* que 200 mg de doxiciclina durante 7 días o 1 g de azitromicina en una única dosis.⁴⁹³

Con el uso de un procedimiento de dilución en caldo modificado con el medio SP-4, Hayes y cols. determinaron la sensibilidad a los antimicrobianos de la cepa incognita de *M. fermentans* junto con cepas de referencia de *M. fermentans* (cepa PG18 [ATCC 19989]) y *M. pneumoniae* (ATCC 15531).^{153,155} Como era de esperar, los tres micoplasmas fueron resistentes a los agentes que actúan sobre la pared celular (penicilina, ampicilina). Las cepas PG18 e incognita de *M. fermentans* fueron resistentes a la eritromicina (media de las CIM de eritromicina, 31,2 µg/mL y 43 µg/mL, respectivamente), mientras que *M. pneumoniae* fue sensible (media de las CIM, 0,0073 µg/mL). La cepa incognita de *M. fermentans* fue sensible a tetraciclina, doxiciclina, clindamicina, lincomicina, cloranfenicol y ciprofloxacina. Ambas cepas de *M. fermentans* probadas en

este estudio fueron resistentes a los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina, estreptomycin y neomicina), mientras que *M. pneumoniae* resultó sensible. Las CIM de aminoglucósidos para la cepa incognita de *M. fermentans* fueron mayores de 1 000 µg/mL para estos cuatro fármacos, mientras que las CIM para gentamicina, kanamicina, estreptomycin y neomicina para la cepa PG18 fueron de 15,6, 20,8, 18,2 y 52,1 µg/mL, respectivamente. Antibiógramas realizados con posterioridad en otros 24 aislamientos de *M. fermentans* también indicaron que estas especies eran resistentes a la eritromicina y los aminoglucósidos.¹⁵³ Este último estudio también confirmó que sólo la ciprofloxacina y la levofloxacina, ambos antimicrobianos pertenecientes a las fluoroquinolonas, tenían un efecto bactericida importante.¹⁵³

Mediante el empleo de la técnica de dilución modificada con caldo de Hayflick, Hannon examinó varias cepas de *M. fermentans* provenientes de infecciones humanas y de células de cultivo de tejido.¹⁴³ Estas cepas fueron mucho más sensibles a la azitromicina que a la eritromicina o a la claritromicina. La clindamicina y varios congéneres de la tetraciclina también mostraron buena actividad contra las cepas de *M. fermentans*, aunque las concentraciones bactericidas para micoplasmas fueron siete veces mayores que las concentraciones inhibitorias del antibiótico. Este estudio también demostró que las cepas de *M. fermentans* aisladas durante la década de 1960 en medios sin células eran sensibles a los aminoglucósidos, mientras que los aislamientos humanos recientes y las cepas obtenidas a partir de células de cultivo de tejido a menudo fueron resistentes a fármacos aminoglucósidos únicos o múltiples, con CIM para estos agentes que superan los 500 µg/mL. Las cepas de *M. fermentans* desarrollaron resistencia a la estreptomycin y a la gentamicina después de 5 pasajes en caldo que contenía estos agentes, mientras que la resistencia a la tobramicina, kanamicina y gentamicina se observó después de 7, 8 y 14 pasajes en medios con estos agentes, respectivamente. Esta resistencia inducida a los aminoglucósidos permaneció estable después de 17 pasajes en caldo sin los aminoglucósidos. La azitromicina fue más activa contra las cepas de *M. fermentans* que la eritromicina o la claritromicina.¹⁴³

En un estudio posterior, Hannon examinó la sensibilidad a los aminoglucósidos de varias cepas de *M. fermentans*, que comprendieron tres aislamientos asociados con el SIDA (incluso una cepa incognita), seis aislamientos respiratorios recientes, un aislamiento asociado con leucemia desde 1962 y ocho aislamientos de células de cultivo de tejido.¹⁴⁴ Dos de los tres aislamientos asociados con el SIDA y todos los aislamientos respiratorios no asociados con el SIDA fueron sensibles a los seis aminoglucósidos probados, mientras que la cepa incognita de *M. fermentans* y todos los aislamientos recientes de cultivo de tejido fueron altamente resistentes a los seis agentes, con CIM que superan los 250 µg/mL. La cepa aislada en cultivo de tejido de médula ósea leucémica en 1962 fue altamente resistente a la estreptomycin (CIM, > 250 µg/mL), pero sensible a los otros cinco aminoglucósidos. Estos resultados fueron compatibles con los de los estudios anteriores de Hannon, que habían establecido que *M. fermentans* incognita era la única cepa humana de las nueve analizadas que mostró resistencia múltiple a los aminoglucósidos.¹⁴³ Este perfil de resistencia fue idéntico al de las cepas de cultivos celulares. Estos resultados condujeron a Hannon a postular que el aislamiento original de *M. fermentans* incognita por transfección directa de células NIH/3T3 con DNA extraído del tejido de sarcoma de Kaposi de un paciente con SIDA puede haber sido un contaminante, ya sea en el DNA transfectado o en las células 3T3 del cultivo de

tejido en el NIH.¹⁴⁴ Esto se ve apoyado por el hecho de que el DNA procarionte no suele ser infeccioso para células eucariotas del mismo modo que los ácidos nucleicos virales, y que la capacidad de *M. fermentans* de crecer dentro de la célula puede haber posibilitado que esta cepa desarrollara resistencia cruzada contra los aminoglucósidos que se utilizan en los cultivos de tejido para controlar la contaminación. Esto también está apoyado por el conocimiento de que *M. fermentans* es un contaminante frecuente de las células de los cultivos de tejido.¹⁵ Estudios realizados por otros autores también mostraron que la cepa incognita original de *M. fermentans* presenta una relación genética más estrecha con las cepas asociadas con cultivos celulares.³⁸³ Aun cuando la cepa incognita original de *M. fermentans* puede haber sido un contaminante falso, la investigación posterior mostró que *M. fermentans* es un patógeno importante en pacientes con SIDA y sin él.

Mediante el empleo de un ensayo de inhibición metabólica por microdilución, Poulin y cols. examinaron la sensibilidad antimicrobiana de diversos micoplasmas "asociados con el SIDA", como *M. fermentans* (una cepa de referencia, dos aislamientos clínicos provenientes de pacientes con SIDA y la cepa "incognita"), *M. penetrans* (una cepa) y *M. pirum* (una cepa).³⁵² Todas las cepas aisladas fueron sensibles a azitromicina, claritromicina, clindamicina, doxiciclina, ofloxacina y tetraciclina. Las cepas de *M. fermentans* y *M. pirum* fueron resistentes a eritromicina, mientras que *M. penetrans* fue sensible. Estos investigadores también hallaron que los paneles desecados Sensititre Gram-Positive MIC panels® (BD Microbiology Systems, Irvine, CA) inoculados con una suspensión estandarizada de los microorganismos en caldo SP-4 produjeron resultados comparables con el método de la inhibición metabólica para todos los fármacos probados por ambos métodos. En el panel Sensititre, todas las cepas probadas fueron resistentes a penicilina, ampicilina, cefalotina, imipenem, vancomicina, rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas de *M. fermentans* y *M. penetrans* fueron resistentes a gentamicina, mientras que *M. pirum* mostró una sensibilidad moderada.

Hayes y cols. también examinaron las sensibilidades a los antimicrobianos de las cepas de *M. penetrans* mediante el procedimiento de dilución en caldo.¹⁵⁴ En su estudio de nueve cepas de *M. penetrans*, todas fueron sensibles a azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, levofloxacina, lincomicina y tetraciclina. Todas las cepas presentaron resistencia a gentamicina y estreptomina. Las fluoroquinolonas fueron la única clase de antimicrobianos que mostraron acción bactericida, en lugar de bacteriostática, contra *M. penetrans*.¹⁵⁴

Dada la variabilidad en la sensibilidad antimicrobiana, se crearon métodos para la realización de antibiogramas para micoplasmas, pero no están ampliamente disponibles porque requieren medios especiales y pueden acarrear gastos considerables para los laboratorios de microbiología clínica. Spaepen y Kundsín diseñaron un procedimiento relativamente simple por elución de disco en caldo para la realización del antibiograma de ureaplasmas, similar a los descritos en el pasado para la comprobación de las bacterias anaerobias.⁴⁰⁷ Este procedimiento proporcionó resultados bastante reproducibles cuando se inoculaba con microorganismos crecidos en cultivo o con muestras de orina que contenía microorganismos. Con posterioridad, Robertson y cols. comunicaron un método de dilución en caldo estandarizado para determinar las CIM de los antimicrobianos para las cepas de *U. urealyticum*.³⁶⁸ En 1986, Kenny y cols. publicaron un procedimiento de dilución en agar para la realización de la prueba que parecía brindar resultados más

reproducibles que los métodos en caldo.²¹⁸ Las comparaciones simultáneas de los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar indicaron que ambos proveen resultados similares en la comprobación de *U. urealyticum* para evaluar la sensibilidad a la tetraciclina y la eritromicina.⁴⁸⁰

Se describieron métodos de dilución en agar y de dilución en caldo para la realización de antibiogramas para micoplasmas.²⁴ El agar H con pH de 7,2 a 7,4 puede utilizarse para *M. hominis* y *M. pneumoniae*, mientras que el agar U con pH de 6,3 a 6,5 se utiliza para *U. urealyticum*. Al medio se le incorporan diluciones al doble de los agentes antimicrobianos cuando se preparan las placas para dilución en agar. La inoculación se realiza mediante el replicador de Steer para proporcionar un inóculo de 30 a 300 unidades formadoras de colonias (UFC) por gota de inóculo. Este inóculo se determina por alícuotas de plaqueo de diluciones al décimo de un cultivo en caldo por triplicado, se realizan el recuento de colonias y la dilución adecuada de la suspensión del microorganismo de modo que el replicador proporcione 30 a 300 UFC por inóculo. La placas se incuban en aerobiosis durante 4 días (*U. urealyticum*), 5 días (*M. hominis*) o 14 días (*M. pneumoniae*).

Los procedimientos de microdilución en caldo suelen utilizar caldo 10B para la comprobación de ureaplasma y caldo SP para otros micoplasmas. Los antimicrobianos se solubilizan y diluyen en placas de microtitulación con el medio líquido adecuado que contenga el indicador rojo fenol para lograr un rango de concentraciones del fármaco. El inóculo debe prepararse a partir de los cultivos en la fase de crecimiento exponencial, cuando las concentraciones de microorganismos suelen ser de alrededor de 10^7 UFC/mL para los ureaplasmas y de 10^8 a 10^9 UFC/mL para los micoplasmas de colonias grandes, los cuales también se expresan como unidades de cambio de color (UCC) por mililitro. A cada pocillo de microtitulación que contiene las diluciones del antimicrobiano se agrega un inóculo de 10^4 a 10^5 UFC (UCC) del microorganismo y luego las placas se sellan e incuban en aerobiosis a 35 °C a 37 °C. Las placas de microtitulación se examinan todos los días hasta que se detecta un cambio de color debido al cambio de pH en el crecimiento del control sin fármaco. La CIM se define como la menor concentración del antimicrobiano en la cual se inhibe el metabolismo del microorganismo lo suficiente como para evitar el cambio en el color del medio (por el indicador de pH) en el momento en que el control sin fármaco muestra cambio de color. En el caso de *U. urealyticum*, el crecimiento por lo general se presentará en el pocillo control después de 24 horas, mientras que el crecimiento de *M. hominis* suele requerir 48 horas. Las cepas de *M. pneumoniae* suelen necesitar 4 a 8 días de incubación antes de que se perciba el cambio en el pocillo control. La actividad bactericida de los antimicrobianos puede evaluarse con el enfoque de dilución en caldo al extraer una alícuota del pocillo de la CIM y los pocillos que contienen concentraciones más elevadas del antibiótico, la dilución de la alícuota con medio sin fármaco y la observación de un cambio de color en el medio con la incubación adicional. Con los procedimientos de dilución en agar y caldo, en cada antibiograma deben incluirse cepas con sensibilidades conocidas y CIM reproducibles para la validación de los resultados.

En todos estos procedimientos pueden encontrarse problemas relacionados con las características biológicas de los microorganismos y con el método en sí. Los problemas biológicos comprenden la posibilidad de cultivos mixtos (p. ej., micoplasmas y ureaplasmas juntos) y la coexistencia de poblaciones sensibles y resistentes en el mismo cultivo. Este último problema puede detectarse sólo en los sistemas basados en

dilución en agar, debido a que el crecimiento de colonias en medios que contienen antibióticos puede ser reidentificado directamente mediante la prueba de hidrólisis de la urea o por métodos serológicos. Los problemas que se relacionan con la metodología comprenden la falta de un medio estándar para la realización de la prueba, las discrepancias relacionadas con el pH requerido para el crecimiento óptimo de los micoplasmas en comparación con la actividad óptima del antibiótico, la dificultad en la estandarización del tamaño del inóculo, la falta de tiempo y de condiciones de incubación estandarizados y la falta de valores críticos de sensibilidades estandarizados.^{215,218} Dados estos problemas, los antibiogramas para los micoplasmas suelen realizarse sólo en grandes instituciones con intereses especiales en la investigación del tratamiento de las infecciones genitales por micoplasmas.

Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por especies hemotrópicas de *Mycoplasma* en animales

Los miembros de los géneros que con anterioridad correspondían a *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* no crecen en cultivo, de modo que el diagnóstico se basa en el examen de frotis de sangre teñidos con las técnicas del tipo de Romanowsky, como Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Wright y Wright-Giemsa o por la tinción con naranja de acridina.^{301,302,424} Como los microorganismos realizan bacteriemias cíclicas de donde pueden ser eliminados con rapidez de la sangre, el examen de múltiples frotis de sangre recolectada en un período de 24 horas aumenta la probabilidad de un diagnóstico positivo en especies de huéspedes clínicamente compatibles. Los frotis de sangre deben prepararse de inmediato después de su recolección mediante el empleo de sangre anticoagulada o sangre recolectada en tubos heparinizados; el anticoagulante EDTA puede causar el desprendimiento de los microorganismos de la membrana de los eritrocitos, lo que dificulta el diagnóstico microscópico.^{301,424} Los microorganismos aparecen como formas cocoides de 0,5 µm a 0,8 µm de diámetro y adheridos a las superficies de los eritrocitos. Duelen encontrarse alrededor de la periferia del eritrocito y se disponen de modo aislado o de pares, en grupos y en cadenas. Con la tinción fluorescente de naranja de acridina, los microorganismos aparecen como elementos brillantes, anaranjados o amarillo verdosos. Se han creado ensayos moleculares y serológicos para los micoplasmas hemotrópicos pero no están ampliamente disponibles.⁴²⁴ Todas las especies parecen ser sensibles a las tetraciclinas y resistentes a los β-lactámicos. El tratamiento con eritromicina controla de modo eficaz la infección aguda, pero no elimina de manera constante la infección en los animales.³⁰¹

REFERENCIAS

1. Abele-Horn M, Wolff C, Dtschel P, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcomes for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1997;35:1199-1202.
2. Abu-Amro KK, Haiablab MA, Miles RJ. Nisin resistance distinguishes *Mycoplasma* spp. from *Acholeplasma* spp. and provides a basis for selective growth media *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3107-3111.
3. Ainsworth G, Easterbrook PJ, Clarke J, et al. An association of disseminated *Mycoplasma fermentans* in HIV-1 positive patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int J STD AIDS* 2001;12:499-504.
4. Ainsworth JG, Hourshid S, Easterbrook PJ, et al. *Mycoplasma* species in rapid and slow HIV progressors. *Int J STD AIDS* 2000;11:76-79.
5. Ainsworth JG, Hourshid S, Webster AD, et al. Detection of *Mycoplasma fermentans* in healthy students and patients with congenital immunodeficiency. *J Infect* 2000;40:138-140.
6. Ainsworth IG, Katseni V, Hourshid S, et al. *Mycoplasma fermentans* and HIV-associated nephropathy. *J Infect* 1994;29:323-326.
7. Alexander TS, Cray LD, Kraft IA, et al. Performance of Meridian ImmunoCard *Mycoplasma* test in a multicenter clinical trial. *J Clin Microbiol* 1996;34:1180-1183.
8. Alfa MJ, Robertson IA. The co-existence of genital mycoplasmas and *Neisseria gonorrhoeae* isolated from the male urethra. *Sex Transm Dis* 1984;11:131-136.
9. Alonso-Vega C, Wauters N, Vermeylen D, et al. A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoenitis in a full-term newborn. *J Clin Microbiol* 1997;35:286-287.
10. Andrade-Rocha FT. *Ureaplasma urealyticum* and *Uycoaplasma hominis* in men attending for routine semen analysis: prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with leukocyte and clinical value. *Urol Int* 2003;71:377-381.
11. Andrews WW, Hauth IC, Cliver SP, et al. Randomized clinical trial of extended spectrum antibiotic prophylaxis with coverage for *Ureaplasma urealyticum* to reduce post-caesarean delivery endometritis. *Obstet Gynecol* 2003;101:1183-1189.
12. Andrews WW, Shah SR, Goldenberg RL, et al. Association of post-caesarean: delivery endometritis with colonization of the chorioamnion by *Ureaplasma urealyticum*. *Obstet Gynecol* 1995;8:509-514.
13. Angulo AF, Reijgers R, Brugman J, et al. *Acholeplasma vituli* sp. nov., from bovine serum and cell cultures. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1125-1131.
14. Armstrong D, Yu BH, Yagoda A, et al. Colonization of humans by *Mycoplasma canis*. *J Infect Dis* 1971;124:607-609.
15. Barile MF. *Mycoplasma*-tissue cell interactions. In: Tully IG, Whitcomb RF, eds. *The Mycoplasmas*. Vol. 2. Human and Animal Mycoplasmas. New York: Academic Press. 1979;425-474.
16. Barile MF. DNA homologies and serologic relationships among ureaplasmas from various hosts. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S296-S299.
17. Barker CE, Sillis M, Wreghitt TG. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody: comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1990;43:163-165.
18. Baseman JB, Cagle M, Korte IE, et al. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol* 2004;42:203-211.
19. Baseman JB, Cole RM, Krause DC, Leith DK. Molecular basis for cytoadsorption of *M. pneumoniae*. *J Bacteriol* 1982;151:1514-1522.
20. Baseman JB, Dallo SF, Tully JG, et al. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* 1988;26:2266-2269.
21. Bauer FA, Wear DI, Angritt P, et al. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) infection in the kidneys of patients with acquired immunodeficiency syndrome and associated nephropathy: a light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1991;22:63-69.
22. Bebear C, deBarbeyrac B, Clerc M-T, et al. Mycoplasmas in HIV-1 seropositive patients. *Lancet* 1993;341:758-758.
23. Bebear C, Dupon M, Renaudin H, et al. Potential improvements in therapeutic options for mycoplasmal respiratory infections. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S202-S207.
24. Bebear C, Robertson JA. Determination of minimal inhibitory concentration. In: Tully IG, Razin S, eds. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*. Vol. 2. San Diego, CA: Academic Press, 1996:189-197.
25. Beecham HI III, Lo SC, Lewis DE, et al. Recovery from fulminant infection with *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) in non-immunocompromised host. *Lancet* 1991;338:1014-1015.
26. Bejar R, Curbelo V, Dairs C, et al. Premature labor bacterial sources of phospholipase. *Obstet Gynecol* 1981;57:479-482.
27. Bencina D, Barbury IM. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 1992;30:407-410.
28. Bencina D, Dove P, Mueller-Premru M, et al. Intrathecal synthesis of specific antibodies in patients with invasion of the central nervous system by *Mycoplasma pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:521-530.
29. Benstein BD, Crouse DT, Shanklin DR, Outhr DD. *Ureaplasma* in lung. 2. Association with bronchopulmonary dysplasia in premature newborns. *Exp Mol Pathol* 2003;75:171-177.
30. Biscardi S, Lorrot M, Marc E, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. *Clin Infect Dis* 2004;38:1341-1346.
31. Bitnun A, Ford-Jones E, Blaser S, Richardson S. *Mycoplasma genitalium* encephalitis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003;14:96-107.
32. Blanchard A, Hamrick W, Duffy L, et al. Use of the polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma genitalium* in the urogenital tract and amniotic fluid. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S272-S279.
33. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, et al. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tracts of adults, in amniotic fluid and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S148-S153.
34. Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1358-1361.
35. Blasco M, Torres L, Marco ML, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Mycoplasma hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:638-640.
36. Bobade PA, Nash AS. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline bod. *Vet Parasitol* 1987;26:169-172.
37. Bochud P-Y, Moser F, Erard P, et al. Community-acquired pneumonia: a prospective outpatient study. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:75-87.

38. Boesen T, Emmersen J, Jensen LT, et al. The *Mycoplasma hominis* vaa gene displays a mosaic gene structure. *Mol Microbiol* 1998;29:97-100.
39. Boesen T, Fedosova NU, Kjeldgaard M, et al. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. *Protein Sci* 2001;10:2577-2596.
40. Bonilla HF, Chenoweth CE, Tully JG, et al. *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Clin Infect Dis* 1997;24:222-225.
41. Brihmer C, Kallings I, Nord CE, Brundin J. Salpingitis: aspects of diagnosis and etiology: a four-year study from a Swedish capital hospital. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1987;24:211-220.
42. Broitman NL, Floyd CM, Johnson CA, et al. Comparison of commercially available media for detection and isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1335-1337.
43. Brooker RJ, Eason JD, Solimano A. *Mycoplasma* surgical wound infection in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:751-752.
44. Brunner S, Frey-Rindova P, Altwegg M, Zbinden R. Retroperitoneal abscess and bacteremia due to *Mycoplasma hominis* in a polytraumatized man. *Infection* 2000;28:40-48.
45. Brus F, Van Waarde WM, Schoots C, et al. Fatal ureaplasma pneumonia and sepsis in a newborn infant. *Eur J Pediatr* 1991;150:782-783.
46. Buck GP, O'Hara LC, Summersgill IT. Rapid, sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1992;30:3280-3283.
47. Burdge DR, Reid GD, Reeve CF, et al. Septic arthritis due to dual infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *J Rheumatol* 1988;15:360-368.
48. Cadieux N, Lebel P, Brousseau R. Use of a triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA. *J Gen Microbiol* 1993;139:2431-2437.
49. Campo L, Larocque P, La Malia T, et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Mycoplasma fermentans* strains isolated from different host tissues. *J Clin Microbiol* 1998;36:1371-1377.
50. Casin U, Vexiau-Robert D, De La Salmoniere P, et al. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. *Sex Transm Dis* 2002;29:353-359.
51. Cassell GH, Waites KB, Crouse DT, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. *Lancet* 1988;2:240-244.
52. Cassell CH, Waites KB, Gibbs RS, et al. Role of *Ureaplasma urealyticum* in amniotitis. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S247-S252.
53. Castro-Alcaraz S, Greenberg EM, Bateman DA, Regan JA. Patterns of colonization with *Ureaplasma urealyticum* during neonatal intensive care unit hospitalizations of very low birth weight infants with the development of chronic lung disease. *Pediatrics* 2002;110:1-7.
54. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease treatment guidelines 2002. *Morbidity Mortal Weekly Rep* 2002;51(RR-6):1-78.
55. Chaim W, Horowitz S, David JB, et al. *Ureaplasma urealyticum* in the development of postpartum endometritis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;109:145-148.
56. Chaudhry R, Nisar N, Malhotra P, et al. Polymerase chain reaction confirmed *Mycoplasma pneumoniae* arthritis: a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2003;46:433-436.
57. Chen CJ, Juan CJ, Hsu ML, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection presenting as neutropenia, thrombocytopenia, and acute hepatitis in a child. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37:128-130.
58. Cheng X, Naessens A, Lauwers S. Identification of serotype 1-, 3-, and 6-specific antigens of *Ureaplasma urealyticum* by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1994;32:1060-1062.
59. Cherry JD. Anemia and mucocutaneous lesions due to *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S47-S51.
60. Cherry JD, Hurwitz ES, Welliver RC. *Mycoplasma pneumoniae* infections and exanthems. *J Pediatr* 1975;87:369-371.
61. Chingbingyong MI, Hughes CV. Detection of *Mycoplasma fermentans* in human saliva with a polymerase chain reaction-based assay. *Arch Oral Biol* 1996;41:311-314.
62. Chirgwin KD, Cummings MC, DeMeo LR, et al. Identification of mycoplasmas in urine from persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S264-S266.
63. Chopra PC, Vojdani A, Tagle C, et al. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis*, and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol Cell Probes* 1998;12:301-308.
64. Christiansen G, Andersen H. Heterogeneity among *Mycoplasma hominis* strains as detected by probes containing parts of ribosomal ribonucleic acid genes. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:108-115.
65. Cimolai N, Bryan LE, To M, et al. Immunological cross-reactivity of a *Mycoplasma pneumoniae* membrane-associated protein antigen with *Mycoplasma genitalium* and *Acholeplasma laidlawii*. *J Clin Microbiol* 1987;25:2136-2139.
66. Cimolai N, Schryvers A, Bryan LE, et al. Culture amplified immunological detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;9:207-212.
67. Clausen HF, Fedder J, Drasbek M, et al. Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Human Reproduction* 2001;16:1866-1874.
68. Clough W, Cassell GH, Duffy LB, et al. Septic arthritis and bacteremia due to *Mycoplasma* resistant to antimicrobial therapy in a patient with systemic lupus: erythematosus. *Clin Infect Dis* 1992;15:402-407.
69. Clyde WA. Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S32-S36.
70. Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, et al. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002;359:705-766.
71. Corsaro D, Valassina M, Venditti D, et al. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:105-108.
72. Costea N, Yakulis VJ, Heller P. The mechanism of induction of cold agglutinins by *Mycoplasma pneumoniae*. *J Immunol* 1971;106:598-604.
73. Coufalik ED, Taylor-Robinson, Csonka GW. Treatment of nongonococcal urethritis with rifampicin as a means of defining the role of *Ureaplasma urealyticum*. *Br J Vener Dis* 1979;55:36.
74. Crouse DT, Odrezin GT, Cutter GR, et al. Radiographic changes associated with tracheal isolation of *Ureaplasma urealyticum* from neonates. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S122-S130.
75. Cunningham CK, Bonville CA, Hagen JH, et al. Immunoblot analysis of anti-*Ureaplasma urealyticum* antibody in pregnant women and newborn infants. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:487-492.
76. Dallo SF, Baseman JB. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* 2000;29:301-309.
77. Dallo SF, Chavoya A, Su CJ, et al. DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 1989;57:1059-1065.
78. Dallo SF, Horten JR, Su CJ, et al. Homologous regions shared by adhesin genes of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Microb Pathog* 1989;6:69-73.
79. Dan M, Tyrrell DLJ, Stemke GW, et al. *Mycoplasma hominis* septicemia in a burned infant. *J Pediatr* 1981;99:743-745.
80. Davies S, Eggington R. Recovery of *Mycoplasma hominis* from blood culture media. *Med Lab Sci* 1991;48:110-113.
81. Davis CP, Cochran S, Lisse J, et al. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from synovial fluid samples in a patient with pneumonia and polyarthritis. *Arch Intern Med* 1988;148:969-970.
82. Dawson MS, Hayes MM, Wang RY-H, et al. Detection and isolation of *Mycoplasma fermentans* from urine of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:511-514.
83. Daxboeck F, Iro E, Tamussino K, et al. Bacteremia with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients undergoing hysterectomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:608-611.
84. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:263-273.
85. Daxboeck F, Zedtwitz-Liebenstein K, Burgmann H, Graninger W. Severe hemolytic anemia and excessive leukocytosis masking *Mycoplasma pneumoniae*. *Ann Hematol* 2001;80:180-182.
86. DeBarberac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S83-S89.
87. DeCordova CMM, Takei K, Rosenthal C, et al. Evaluation of IgG, IgM, and IgA antibodies to *Mycoplasma penetrans* detected by ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients in Sao Paulo, Brazil. *Microb Infect* 1999;1:1095-1101.
88. DeGirolami PC, Madoff S. *Mycoplasma hominis* septicemia. *J Clin Microbiol* 1982;16:566-567.
89. Deguchi T, Gilroy CB, Taylor-Robinson D. Failure to detect *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, or *Mycoplasma pirum* in the urethra of patients with acute nongonococcal urethritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:169-171.
90. Deguchi T, Komeda H, Yasuda M, et al. *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 1995;6:144-145.
91. Deguchi T, Maeda S-I. *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis. *J Urol* 2002;167:1210-1217.
92. Deguchi T, Maeda S-I, Tamaki M, et al. Analysis of the gyrA and parC genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:735-748.
93. Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with non-gonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 2004;31:192-195.
94. Deguchi T, Yoshida T, Yokoi S, et al. Longitudinal quantitative detection by real-time PCR of *Mycoplasma genitalium* in first-pass urine of men with recurrent nongonococcal urethritis. *J Clin Microbiol* 2002;40:3854-3856.
95. Del Giudice RA, Carski TR, Barile MF, et al. Proposal for classifying human strain Navel and related simian mycoplasmas as *Mycoplasma primatum* sp. n. *J Bacteriol* 1971;108:439-445.
96. Del Giudice RA, Tully JG, Rose DL, et al. *Mycoplasma pirum* sp. nov., a terminal structured mollicute from cell cultures. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:285-291.
97. De Silva NS, Quinn PA. Endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1986;23:354-359.
98. Dimitrov DS, Franzoso G, Salman M, et al. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) cells are able to fuse with T lymphocytes. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S305-S308.
99. Dinsmoor MJ, Ramamurthy RS, Gibbs RS. Transmission of genital mycoplasma from mother to neonate in women with prolonged membrane rupture. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:843-847.
100. Donders GGG, Van Bulck B, Caudron J, et al. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:431-137.

101. Dorigo-Zetsma JW, Zaat SAJ, Wertheim-van Dillen, et al. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J Clin Microbiol* 1999;37:14-17.
102. Drasbek M, Nielsen PK, Persson K, et al. Immune response to *Mycoplasma pneumoniae* P1 and P116 in patients with atypical pneumonia analyzed by ELISA. *BMC Microbiol* 2004;4:1-10.
103. Duffy LB, Crabb D, Searcey K, Kempf MC. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. *J Antimicrob Chemother* 2000;45(Suppl S1):29-33.
104. Duffy MF, Walker ID, Browning GF. The immunoreactive 116 kDa surface protein of *M. pneumoniae* is encoded in an operon. *Microbiology* 1997;143:3391-3402.
105. Duffy MF, Whithear KG, Noormohammadi AH, et al. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G reactive with a recombinant protein expressed from the gene encoding the 116-kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1024-1029.
106. Dular R, Kajioka R, Kasatiya S. Comparison of Gen-Probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1068-1069.
107. Dunn JJ, Malan AK, Evans J, Litwin CM. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* IgM antibodies in pediatric patients using ImmunoCard *Mycoplasma* compared to conventional immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:412-414.
108. Dupin N, Bijaoui G, Schwarzsinger M, et al. Detection and quantitation of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis. *Clin Infect Dis* 2003;37:602-605.
109. Dutro SM, Hebb JK, Garub CA, et al. Development and performance of a microwell-plate-based polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma genitalium*. *Sex Transm Dis* 2003;30:756-763.
110. Eastick K, Leeming JP, Caul EO, et al. A novel polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2003;56:25-28.
111. Embree J. *Mycoplasma hominis* in maternal and fetal infections. *Ann NY Acad Sci* 1988;549:56-64.
112. Eschenbach DA. *Ureaplasma urealyticum* as a cause of postpartum fever. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S258-S261.
113. Eschenbach DA. *Ureaplasma urealyticum* and premature birth. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S100-S106.
114. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. *Sex Transm Dis* 2003;79:318-319.
115. Fedorko DP, Emery DD, Franklin SM, Congdon DD. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay system for serologic diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;23:85-88.
116. Feldner J, Gobel U, Bredt W. *Mycoplasma pneumoniae* adhesion localized to tip structure by monoclonal antibody. *Nature* 1982;298:765-767.
117. Feng S-H, Lo S-C. Induced mouse spleen B-cell proliferation and secretion of immunoglobulin by lipid-associated membrane proteins of *Mycoplasma fermentans* incognitus and *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* 1994;62:3916-3921.
118. Fenkel V, Yilmazer M, Aktepe OC. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on women infertility? *Infect Med* 2002;10:220-223.
119. Fiacco V, Miller MJ, Carney E, et al. Comparison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 1984;20:862-865.
120. Fischman Marshall KE, Kislak W, et al. Adult respiratory distress syndrome caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Chest* 1978;74:471-473.
121. Foy HM. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S37-S46.
122. Furner PM, Bisignano G, Cerniglia G, et al. In vitro antimycoplasmal activity of flurithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:161-165.
123. Gallily R, Salman M, Tarshis M, et al. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) induces TNF and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. *Immunol Lett* 1992;34:27-30.
124. Gambini D, Decleua I, Lupica L, et al. *Mycoplasma genitalium* in males with non-gonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication. *Sex Transm Dis* 2000;27:226-229.
125. Gauthier PW, Meyer WJ, Bieniarz A. Expectant management of premature rupture of membranes with amniotic fluid cultures positive for *Ureaplasma urealyticum* alone. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:587-590.
126. Geissdorfer W, Schorner C, Lohoff M. Systemic *Mycoplasma hominis* infection in a patient immunocompromised due to combined transplantation of kidney and pancreas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:511-512.
127. Gibbs RS, Cassell GH, Davis JK, et al. Further studies on genital mycoplasmas in intra-amniotic infection: blood cultures and serologic response. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:717-726.
128. Gilbert GL, Drew JH. Chronic *Mycoplasma hominis* infection complicating severe intraventricular hemorrhage in a premature neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:817-818.
129. Gilbert GL, Garland SM, Fairley KF, et al. Bacteriuria due to ureaplasmas and other fastidious organisms during pregnancy: prevalence and significance. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S239-S243.
130. Gilroy CB, Keat A, Taylor-Robinson D. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:1355-1358.
131. Glaser JB, Engelberg M, Hammerschlag M. Scalp associated with *Mycoplasma hominis* infection complicating intrapartum monitoring. *Pediatr Infect Dis* 1983;2:468-470.
132. Goulet M, Dulat R, Tully JG, et al. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. *J Clin Microbiol* 1995;33:2823-2825.
133. Grau O, Kovacic R, Grifffais R, et al. Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;106:327-334.
134. Grau O, Kovacic R, Grifffais, et al. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species: *Mycoplasma penetrans* and *Mycoplasma hominis*. *Mol Cell Probes* 1994;8:139-148.
135. Grau O, Slizewicz B, Tuppin P, et al. Association of *Mycoplasma penetrans* with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1995;172:672-681.
136. Grau O, Tuppin P, Slizewicz B, et al. A longitudinal study of seroreactivity against *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected homosexual men: association with disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:661-667.
137. Gravatt MG, Eschenbach DA. Possible role of *Ureaplasma urealyticum* in preterm premature rupture of the fetal membranes. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S253-S257.
138. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson RB Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of *Ureaplasma urealyticum*. *Prenat Diagn* 1992;12:111-117.
139. Gray GC, Kaiser KS, Hawksworth AW, Watson HL. No serologic evidence of an association found between Gulf War service and *Mycoplasma fermentans* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:752-757.
140. Grulich C, Baumer TF, Blum HE. Acute *Mycoplasma pneumoniae* infection presenting as cholestatic hepatitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:514-515.
141. Haller M, Forst H, Ruckdeschel G, et al. Peritonitis due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in a liver transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;10:172.
142. Hannaford K, Todd DA, Jeffery H, et al. Role of *Ureaplasma urealyticum* in lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Neonatal Ed* 1999;81:F162-F167.
143. Hannan PCT. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycosides in vitro. *J Med Microbiol* 1995;42:421-428.
144. Hannan PCT. Observations on the possible origin of *Mycoplasma fermentans* incognitus strain based on antibiotic sensitivity tests. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:25-30.
145. Hannan PCT. Comparative susceptibilities of various AIDS-associated and human urogenital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agents in vitro. *J Med Microbiol* 1998;47:1115-1122.
146. Hannan PCT, Kearns AM, Sisson PR, Freeman R. Differentiation of strains of *Mycoplasma fermentans* from various sources by pyrolysis mass spectrometry. *J Med Microbiol* 1997;46:348-353.
147. Harasawa R, Dybvig K, Watson HL, et al. Two genomic clusters among 14 serovars of *Ureaplasma urealyticum*. *Syst Appl Microbiol* 1991;14:393-396.
148. Harasawa R, Imada Y, Ito M, et al. *Ureaplasma felinum* sp. nov. and *Ureaplasma cai* sp. nov. isolated from the oral cavities of cats. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:45-51.
149. Harasawa R, Imada Y, Kotani H, et al. *Ureaplasma canigenitalium* sp. nov., isolated from dogs. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:640-644.
150. Harasawa R, Stephens EB, Koshimizu K, et al. DNA relatedness among established *Ureaplasma* species and unidentified feline and canine serogroups. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:52-55.
151. Harrison HR. Cervical colonization with *Ureaplasma urealyticum* and pregnancy outcome: prospective studies. *Pediatr Infect Dis* 1986;266-S269.
152. Hawkins RE, Rickman LS, Vermund SH, et al. Association of mycoplasma and human immunodeficiency virus infection: detection of amplified *Mycoplasma fermentans* DNA in blood. *J Infect Dis* 1992;165:581-585.
153. Hayes MM, Foo H-H, Kotani H, et al. In vitro antibiotic susceptibility testing of different strains of *Mycoplasma fermentans* isolated from a variety of sources. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2500-2503.
154. Hayes MM, Foo H-H, Timenetsky J, et al. In vitro antibiotic susceptibility testing of clinical isolates of *Mycoplasma penetrans* from patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1386-1387.
155. Hayes MM, Wear DJ, Lo S-C. In vitro antimicrobial susceptibility testing for the newly identified AIDS-associated mycoplasma. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:464-466.
156. Heggie AD, Jacobs MR, Butler VT, et al. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate specimens from low birth weight infants. *J Pediatr* 1994;124:956-961.
157. Henrich B, Feldmann RC, Hadding U. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect Immun* 1993;61:2945-2951.
158. Henrich B, Hoppe M, Kitzerow A, Hadding U. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. *J Bacteriol* 1999;181:4873-4878.
159. Hill AC. *Mycoplasma spermatophilum* a new species isolated from human spermatozoa and cervix. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:229-233.
160. Hill GB, Livengood CH. Bacterial vaginosis-associated microflora and effects of topical intravaginal clindamycin. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1198-1204.
161. Huai Y, Kanatani T, Ono M, et al. An indirect immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears. *Microbiol Immunol* 1991;35:831-839.
162. Honda J, Yano T, Kusaba M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1382-1384.
163. Hooton TM, Roberts MC, Roberts PL, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis. *Lancet* 1988;1:266-268.
164. Horner PJ, Gilroy CH, Thomas BJ, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet* 1993;342:582-585.

165. Horner PJ, Thomas B, Gilroy CB, et al. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. *Clin Infect Dis* 2001;32:995-1003.
166. Horner PJ, Thomas B, Gilroy C, et al. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat-shock protein 60 kDa and detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* are associated independently with chronic nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 2003;30:129-133.
167. Horowitz S, Evinson B, Borer A, Horowitz J. *Mycoplasma fermentans* in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *J Rheumatol* 2000;27:2747-2752.
168. Horowitz S, Horowitz J, Hou L, et al. Antibodies to *Mycoplasma fermentans* in HIV-positive heterosexual patients: seroprevalence and association with AIDS. *J Infect* 1998;36:79-84.
169. Horowitz S, Horowitz J, Mazor M, et al. *Ureaplasma urealyticum* cervical colonization as a marker of pregnancy complications. *Int J Gynecol Obstet* 1995;48:15-19.
170. Horowitz S, Mazor M, Horowitz J, et al. Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in women with intraamniotic infection and adverse pregnancy outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:132-136.
171. Horowitz S, Mazor M, Romero R, et al. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 1995;40:375-379.
172. Hosker HSR, Tam JS, Chan CHS, Lai CKW. *Mycoplasma pneumoniae* infection in Hong Kong: clinical features during an epidemic. *Respiration* 1993;60:237-240.
173. Howard CJ, Courlay RM. Proposal for a second species within the genus *Ureaplasma* *Ureaplasma diversum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:446-452.
174. Hu PC, Cole RM, Huang YS, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection: role of surface protein in the attachment organelle. *Science* 1982;216:1126-1131.
175. Hu PC, Huang CH, Collier AM, Clyde WA Jr. Demonstration of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein in human sera and respiratory secretions. *Infect Immun* 1983;41:437-439.
176. Hussain AI, Robson WLM, Kelley R, et al. *Mycoplasma penetrans* and other mycoplasmas in urine of human immunodeficiency virus-positive children. *J Clin Microbiol* 1999;37:1518-1523.
177. Hyman HC, Yoge D, Razin S. DNA probes for detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 1981;25:726-728.
178. Ieven M, Ursi D, Van Bever H, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J Infect Dis* 1996;173:1445-1452.
179. Imada Y, Uchida I, Hashimoto K. Rapid identification of mycoplasmas by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. *J Clin Microbiol* 1987;25:17-21.
180. Iyama K, Ono S, Kuwano K, et al. Induction of tumour necrosis factor- α (TNF α) and enhancement of HIV-1 replicating in the 122HL60 cell line by *Mycoplasma penetrans*. *Microbiol Immunol* 1996;40:907-914.
181. Izraeli S, Samra Z, Sirota L, et al. Genital mycoplasmas in preterm infants: prevalence and clinical significance. *Eur J Pediatr* 1991;150:804-807.
182. Jacobs E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S79-S82.
183. Jacobs E, Bennewitz A, Bredt W. Reaction patterns of human anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1986;23:517-522.
184. Jacobs E, Buchholz A, Kleinman B, et al. Use of adherence protein of *Mycoplasma pneumoniae* as antigen for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Isr J Med Sci* 1987;23:709-712.
185. Jacobs E, Pilatschek A, Gerstenecker B, et al. Immunodominant epitopes of the adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1194-1197.
186. Jacobs E, Vonski M, Stemke GW, et al. Identification of *Ureaplasma* biotypes. *Med Microbiol Lett* 1994;3:31-35.
187. Jacobs F, Van de Stadt J, Gelin M, et al. *Mycoplasma hominis* infection of perihaptic hematomas in a liver transplant recipient. *Surgery* 1992;111:98-100.
188. Jalil N, Doble A, Gilchrist C, et al. Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum*. *Genitourin Med* 1988;62:367-368.
189. Janney FA, Lee LT, Howe C. Cold hemagglutinin cross-reactivity with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 1978;22:29-30.
190. Jensen IS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:1-11.
191. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually-transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 2004;42:683-692.
192. Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003;41:261-266.
193. Jensen JS, Hansen HT, Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J Clin Microbiol* 1996;34:286-291.
194. Jensen JS, Heilmann C, Valerius NH. *Mycoplasma pneumoniae* infection in a child with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994;19:207.
195. Jensen JS, Orsum R, Dohn B, et al. *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? *Genitourin Med* 1993;69:265-269.
196. Jensen JS, Uldum SA, Sondergaard-Andersen J, Vuust J, et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991;29:46-50.
197. Johansson G, Enstrom Y, Lowhagen GB, et al. Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. *Int J STD AIDS* 2000;11:324-326.
198. Johansson KE, Tully IG, Bolske C, Pettersson B. *Mycoplasma caviopharyngis* and *Mycoplasma fastidiosum* the closest relatives to *Eperythrozoon* spp. and *Haemobartonella* spp. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:321-326.
199. Johnson S, Sidebottom D, Bruckner F, Collins D. Identifications of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 2000;38:90-93.
200. Johnston CLW, Webster ADB, Taylor-Robinson D, et al. Primary late onset hypogammaglobulinemia associated with inflammatory polyarthritis and septic arthritis due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Ann Rheum Dis* 1983;42:108-110.
201. Jordan JL, Berry KM, Balish MF, Krause DC. Stability and subcellular localization of cytoadherence-associated protein P65 in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* 2001;183:7387-7391.
202. Jorup-Ronstrom C, Ahl T, Hammarstrom L, et al. Septic osteomyelitis and polyarthritis with *Ureaplasma* in hypogammaglobulinemia. *Infection* 1989;17:301-303.
203. Joste NE, Kundsinn RB, Genest DR. Histology and *Ureaplasma urealyticum* culture in 63 cases of first trimester abortion. *Am J Clin Pathol* 1994;102:729-732.
204. Kakulphimp J, Finch LR, Robertson JA. Genome sizes of mammalian and avian ureaplasmas. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:326-327.
205. Kane JR, Shenep JL, Krance RA, et al. Diffuse alveolar hemorrhage associated with *Mycoplasma hominis* respiratory tract infection in a bone marrow transplant recipient. *Chest* 1994;105:1891-1892.
206. Kapatais-Zoumbos K, Chandler DKF, Barile MF. Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma*: specificity for host immunoglobulin A. *Infect Immun* 1985;47:704-709.
207. Kass EH, Lin J-S, McCormack WM. Low birth weight and maternal colonization with genital mycoplasmas. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S279-S281.
208. Katseni VL, Gilroy CB, Ryaat BK, et al. *Mycoplasma fermentans* in individuals seropositive and seronegative for HIV-1. *Lancet* 1993;341:271-273.
209. Kaufmann A, Muhlrath PF, Gerns D, Sprenger H. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans*-derived lipoprotein MAL-P-2. *Infect Immun* 1999;67:6303-6308.
210. Kayser S, Bhend HJ. Lumbar pain caused by *Mycoplasma* infection. *Infection* 1992;20:97-98.
211. Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, et al. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS* 2000;1:356-360.
212. Kenney RT, Li JS, Clyde WA Jr, et al. *Mycoplasma pericarditis*: evidence of invasive disease. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S58-S62.
213. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to several new quinolones, tetracycline, and erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:877-889.
214. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* to two new quinolones, sparfloxacin and WIN 57273. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1515-1516.
215. Kenny GE, Cartwright FD. Effect of pH, inoculum size, and incubation time on the susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to erythromycin in vitro. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl):215-218.
216. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to a new quinolone, OPC 17116. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1726-1727.
217. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalpofistin, dirithromycin, evermicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalpofistin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2604-2608.
218. Kenny GE, Cartwright FD, Roberts MC. Agar dilution method for determination of antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S332-S334.
219. Kenny GE, Hooten TM, Roberts MC, et al. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the new quinolones as determined by the agar dilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:103-107.
220. Kenny GE, Kaiser GG, Cooney MK, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. *J Clin Microbiol* 1990;28:2087-2093.
221. Kersten RC, Haglund L, Kulwin DR, et al. *Mycoplasma hominis* orbital abscess. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1096-1097.
222. Kho SH, Haja M, Storey CC, et al. Influenza-like episodes in HIV-positive patients: the role of viral and "atypical" infections. *AIDS* 1998;12:751-757.
223. Kitzeros A, Hadding U, Henrich B. Cyto-adherence studies of the adhesion P50 of *Mycoplasma hominis*. *J Med Microbiol* 1999;48:485-493.
224. Kok T-W, Vrkas G, Marmion BP, et al. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. I. Direct detection of antigen in respiratory exudates by enzyme immunoassay. *Epidemiol Infect* 1988;101:669-684.
225. Koletsky RJ, Weinstein AJ. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:491-499.
226. Kong F, Gordon S, Gilben GL. Rapid cycle PCR for detection and typing of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:4253-4259.
227. Kong F, James G, Ma Z, et al. Phylogenetic studies of *Ureaplasma urealyticum*: support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;4:1879-1889.
228. Koshimizu K, Hatasawa R, Pan I-J, et al. *Ureaplasma gallorale* sp. nov. from the oropharynx of chickens. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:333-338.

229. Kostyal DA, Butler GH, Beezhold DH. A 48-kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect Immun* 1994;62:3793-3800.
230. Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, et al. Increase in interleukin (IL)-1, and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 1996;40:250-256.
231. Kotikoski MJ, Kleemola M, Palmu AA. No evidence of *Mycoplasma pneumoniae* in acute myringitis. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:465-466.
232. Kountouras D, Deutsch M, Emmanuel T, et al. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* infection with multiorgan involvement: a case report. *Eur J Intern Med* 2003;14:329-331.
233. Kovacic R, Launay V, Tuppin P, et al. Search for the presence of six *Mycoplasma* species in peripheral blood mononuclear cells of subjects seropositive and seronegative for human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1996;34:1808-1810.
234. Kraft M, Cassell CH, Henson IE, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:998-1001.
235. Krause DC. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends Microbiol* 1998;6:15-18.
236. Krause DC, Balish MF. Structure, function and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;198:1-7.
237. Kreier IP, Ristic M, Genus III. *Haemobartonella*; Genus IV. *Eperythrozoon*. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984;724-729.
238. Krohn MA, Hillier SL, Nugent RP, et al. The genital flora of women with intraamniotic infection. *J Infect Dis* 1995;171:1475-1480.
239. Lamey R, Eschenbach DA, Mitchell SH, et al. Isolation of mycoplasmas and bacteria from the blood of postpartum women. *Amer J Obstet Gynecol* 1982;143:104-112.
240. LaScola B, Michel G, Raoult D. Use of amplification and sequencing of the 16S rRNA gene to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Clin Infect Dis* 1997;24:1161-1163.
241. LeGrand-Poels S, Vaira D, Pincemail J, et al. Activation of human immunodeficiency virus type I by oxidative stress. *AIDS Res Human Retroviruses* 1990;6:1389-1397.
242. Leland DS, Lapworth MA, Jones RB, et al. Comparative evaluation of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 1982;16:709-714.
243. Lemaitre M, Guetard D, Henin Y, et al. Protective activity of tetracycline analogs against the cytopathic effect of the human immunodeficiency viruses in CEM cells. *Res Virol* 1990;141:5-16.
244. Lemaitre M, Henin Y, Destouesse F, et al. Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type I in infected cell lines. *Infect Immun* 1992;60:742-748.
245. Levi N, Prag J, Jensen JS, et al. Surgical infections with *Mycoplasma*: a brief review. *IR Coll Surg Edinb* 1997;41:107-109.
246. Levy M, Shear NH. *Mycoplasma pneumoniae* infection and Stevens-Johnson syndrome: report of eight cases and review of the literature. *Clin Pediatr (Phila)* 1991;30:42-49.
247. Levy R, Layani-Milon MP, D'Estaing G, et al. Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to in vitro fertilization. *Int J Androl* 1999;22:113-118.
248. Li Y-H, Brauner A, Jonsson B, et al. *Ureaplasma urealyticum*-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatr Res* 2000;48:114-119.
249. Li Y-H, Chen M, Brauner A, et al. *Ureaplasma urealyticum* induces apoptosis in human lung epithelial cells and macrophages. *Biol Neonat* 2002;82:166-173.
250. Li Y-H, Yan Z-Q, Jensen JS, et al. Activation of nuclear factor κ B and induction of inducible nitric oxide synthase by *Ureaplasma urealyticum* in macrophages. *Infect Immun* 2000;68:7087-7093.
251. Lieberman D, Lieberman D, Horowitz S, et al. Microparticle agglutination versus antibody-capture enzyme immunoassay for diagnosis of community-acquired *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:577-584.
252. Lieberman D, Schlaeffer F, Lieberman D, et al. *Mycoplasma pneumoniae* community-acquired pneumonia: a review of 101 hospitalized adult patients. *Respiration* 1996;63:261-266.
253. Lind K, Kristensen GB, Bollerup AC, et al. Importance of *Mycoplasma hominis* in acute salpingitis assessed by culture and serological tests. *Gnaitourin Med* 1985;61:185-189.
254. Lind K, Lindhardt BO, Schutten H, et al. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1984;20:1036-1043.
255. Lo S-C. Isolation and identification of a novel virus from patients with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:675-676.
256. Lo S-C, Buchholz CL, Wear DJ, et al. Histopathology and doxycycline treatment in a previously healthy non-AIDS patient systemically infected with *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). *Mod Pathol* 1991;6:750-754.
257. Lo S-C, Dawson MS, Newton PB, et al. Association of the virus e infections agent originally reported in patients with AIDS with acute fatal disease in previously healthy non-AIDS patients. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:364-376.
258. Lo S-C, Dawson MS, Wong DM, et al. Identification of *Mycoplasma*: incognitus infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:691-616.
259. Lo S-C, Hayes MM, Kotani H, et al. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod Pathol* 1993;6:276-280.
260. Lo S-C, Hayes MM, Tully JG, et al. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:357-364.
261. Lo S-C, Hayes MM, Wang RY-H, et al. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *Lancet* 1991;338:1415-1418.
262. Lo S-C, Lange M, Wang R, et al. Development of Kaposi's sarcoma is associated with serologic evidence of *Mycoplasma penetrans* infection: retrospective analysis of a prospective cohort study of homosexual men. First National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Program and Abstracts 1993:61. Abstract 504.
263. Lo S-C, Lenn L, Ribas J, et al. Lack of serological evidence for *Mycoplasma fermentans* infection in Army Gulf War veterans: a large scale case-control study. *Epidemiol Infect* 2000;125:609-616.
264. Lo S-C, Shih JW-K, Newton PB, et al. Virus-like infectious agent (VLIA) is a novel pathogenic mycoplasma: *Mycoplasma incognitus*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;51:586-600.
265. Lo S-C, Shih IW-K, Yang N-Y, et al. A novel virus-like infectious agent in patients with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:213-226.
266. Lo S-C, TSR S, Benish IR, et al. Enhancement of HIV-I cytotoxic effects on CD4+ lymphocytes by the AIDS-associated mycoplasma. *Science* 1991;251:1074-1076.
267. Lo, S-C, Wang RY-H, Grandinetti T, et al. *Mycoplasma hominis* lipid-associated membrane protein antigens for effective detection of *M. hominis*-specific antibodies in humans. *Clin Infect Dis* 2003;36:1246-1253.
268. Lo S-C, Wang RY-H, Newton PB, et al. Fatal infection of silver leaf monkeys with a virus-like infectious agent (VLIA) derived from a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:399-409.
269. Lo S-C, Wear DJ, Green SL, et al. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S259-S263.
270. Lo S-C, Wear DJ, Shih IW-K, et al. Fatal systemic infections of nonhuman primates by *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl):S283-S288.
271. Loens K, Ieven M, Ursi D, et al. Application of NucliSens basic kit for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens. *J Microbiol Methods* 2003;54:127-130.
272. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003;41:4915-4923.
273. Loens K, Ursi D, Ieven M, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in spiked clinical samples by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2002;40:1339-1345.
274. Luki N, Lebel P, Boucher M, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:255-263.
275. Luo D, Xu W, Chiang G, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma genitalium* from high risk populations of sexually transmitted diseases in China. *Chin Med J (Engl)* 1999;112:489-492.
276. Luttrell LM, Kanj SS, Corey R, et al. *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review. *Clin Infect Dis* 1994;19:1067-1070.
277. Macon WR, Lo S-C, Poesz BJ, et al. Acquired immunodeficiency syndrome-like illness associated with systemic *Mycoplasma fermentans* infection in a human immunodeficiency virus-negative homosexual man. *Hum Pathol* 1993;24:554-558.
278. Madoff S, Hooper DC. Nongenitourinary tract infections caused by *Mycoplasma hominis* in adults. *Rev Infect Dis* 1988;10:602-613.
279. Maeda SI, Tamaki M, Kojima K, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* persistence in the urethra with recurrence of nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 2001;28:472-476.
280. Maede Y. Sequestration and phagocytosis of *Haemobartonella felis* in the spleen. *Am J Vet Res* 1979;40:691-695.
281. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003;187:650-657.
282. Markham JG, Markham NP. *Mycoplasma laidlawii* in human burns. *J Bacteriol* 1964;98:827-828.
283. Marmion BP, Worswick JWDA, Kok T-W, et al. Experience with newer techniques for the laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection: Adelaide, 1978-1992. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S90-S99.
284. Marston BJ, Plouffe JF, File TM, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Arch Intern Med* 1997;157:1709-1718.
285. Martinez OV, Chan J, Cleary T, et al. *Mycoplasma hominis* septic thrombophlebitis in a patient with multiple trauma: a case report and literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:193-196.
286. Matas L, Dominguez J, DeOry F, et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard *Mycoplasma* test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM in paediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998;30:289-293.
287. Matovina M, Husnjak K, Milutin N, et al. Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertil Steril* 2004;81:662-659.
288. McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RAJ. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2003;41:4844-4847.
289. McCormack WM. *Ureaplasma urealyticum*: ecologic niche and epidemiologic considerations. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S232-S233.
290. McCormack WM, Almeida PC, Bailey PE, et al. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *JAMA* 1972;221:1375-1377.
291. McCormack WM, Lee Y-H, Zinner SH. Sexual experience and urethral colonization with genital mycoplasmas: a study in normal men. *Ann Intern Med* 1973;78:696-698.

292. McCormack WM, Rosner B, Alpert S, et al. Vaginal colonization with *Mycoplasma hominis* and Ureaplasma urealyticum. Sex Transm Dis 1986;13:67-70.
293. McCormack WM, Rosner B, Lee Y-H, et al. Isolation of genital mycoplasmas from blood obtained abortally after vaginal delivery. Lancet 1975;1:596-599.
294. McDonald JC, Moore DL. *Mycoplasma hominis* meningitis in a premature infant. Pediatr Infect Dis J 1989;7:795-798.
295. McDonald MI, Moore JO, Harrelson JM, et al. Septic arthritis due to *Mycoplasma hominis*. Arthritis Rheum 1983;26:1044-1047.
296. Meis JF, van Kuppeveld FJ, Kremer JA, et al. Fatal intrauterine infection associated with *Mycoplasma hominis*. Clin Infect Dis 1992;15:753-754.
297. Meloni F, Paschetto E, Mangiarotti P, et al. Acute *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in community-acquired pneumonia and exacerbations of COPD or asthma: therapeutic considerations. J Chemother 2004;16:70-76.
298. Mena L, Wang X, Mroczkowski TF, Manin DH. *Mycoplasma genitalium* infections in asymptomatic men and men with urethritis attending a sexually transmitted diseases clinic in New Orleans. Clin Infect Dis 2002;35:1167-1173.
299. Mernaugh GR, Dallo SF, Holt SC, et al. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S69-S78.
300. Meseguer MA, Perez-Molina JA, Fernandez-Bustamante J, et al. *Mycoplasma pneumoniae* pericarditis and cardiac tamponade in a ten-year-old girl. Pediatr Infect Dis J 1996;15:829-831.
301. Messick JB. New perspective about hemotrophic mycoplasma (formerly *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003;33:1453-1465.
302. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet Clin Pamol 2004;33:2-13.
303. Messick JB, Walker PG, Raphael W, et al. '*Candidatus* Mycoplasma haemodidelphis' sp. nov., '*candidatus* Mycoplasma haemoplaniae' sp. nov., and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:693-698.
304. Meyer RD, Clough W. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adult emphasis on immunosuppression. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S243-S249.
305. Milla E, Zografos L, Piguet B. Bilateral optic papillitis following *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Ophthalmologica 1998;212:344-346.
306. Miranda C, Alados JC, Molina JM, et al. Posthysterectomy wound infection: a review. Diagn Microbiol Infect Dis 1993;17:41-44.
307. Miranda C, Carazo C, Banon R, et al. *Mycoplasma hominis* infection in three renal transplant patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1990;13:329-331.
308. Moller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. Lancet 1984;1:1102-1103.
309. Montagnier L, Blanchard A. Mycoplasmas as cofactors in infection due to human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S309-S315.
310. Morrison-Plummer J, Lazzell A, Baseman JB. Shared epitopes between *Mycoplasma pneumoniae* major adhesin protein PI and a 140-kilodalton protein of *Mycoplasma genitalium*. Infect Immun 1987;55:49-56.
311. Mossad SB, Rehm SJ, Tomford RW, et al. Sternotomy infection with *Mycoplasma hominis*: a cause of "culture-negative": wound infection. J Cardiovasc Surg (Torino) 1996;37:505-509.
312. Muhlrath PF, Frisch M. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. Infect Immun 1994;62:3801-3807.
313. Muhlrath PF, Quentmeier H, Schmitt E. Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. Infect Immun 1991;59:3962-3968.
314. Muhlrath PF, Schade U, MDHM. A macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. Infect Immun 1991;59:3969-3974.
315. Naessens A, Foulon W, Breynaert J, et al. Postpartum bacteremia and placental colonization with genital mycoplasmas and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 1989;160:647-650.
316. Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, et al. DNA diagnosis of central nervous system infection by *Mycoplasma pneumoniae*. Pediatrics 1992;90:250-253.
317. Nasralla M, Haier J, Nicolson GL. Multiple mycoplasma infections detected in blood of patients with chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia syndrome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:859-865.
318. Neimark H, Hoff B, Ganter M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*) an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:365-371.
319. Neimark H, Johansson K-E, Rikihisa Y, Tully G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*candidatus* Mycoplasma haemofelis,' '*candidatus* Mycoplasma baemomuris,' '*candidatus* Mycoplasma haemosuis,' and '*candidatus* Mycoplasma weyoni.' Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:891-899.
320. Neimark H, Johansson K-E, Rikihisa Y, Tully JG. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:683.
321. Neimark H, Kocan KM. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a mycoplasma. FEMS Microbiol Lett 1997;156:287-291.
322. Neumayr L, Lennette E, Kelly D, et al. *Mycoplasma* disease and acute chest syndrome in sickle cell disease. Pediatrics 2003;112:87-95.
323. Nijs J, Nicolson GL, De Becker P, et al. High prevalence of *Mycoplasma* infections among European chronic fatigue syndrome patients: examination of four *Mycoplasma* species in blood of chronic fatigue syndrome patients. FEMS Immunol Med Microbiol 2002;34:209-214.
324. Nozaki-Renard J, Iino T, Sato Y, et al. A fluoroquinolone (DR-3355) protects human lymphocyte cell lines from HIV-1-induced cytotoxicity. AIDS 1990;4:1283-1286.
325. Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. *Ureaplasma urealyticum* reduces sperm motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Hum Reprod 1998;13:2756-2761.
326. Ohkawa M, Yamaguchi K, Tokunaga S, et al. *Ureaplasma urealyticum* in the urogenital tract of patients with chronic prostatitis or related symptomatology. Br J Urol 1993;72:918-921.
327. Ohkawa M, Yamaguchi K, Tokunaga S, et al. Amimicrobial treatment for chronic prostatitis as a means of defining the role of *Ureaplasma urealyticum*. Urol Int 1993;51:129-132.
328. Ohlsson A, Wang E, Vearncombe M. Leukocytes counts and colonization with *Ureaplasma urealyticum* in preterm neonates. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S144-S147.
329. Olson LD, Gilbert AA. Characteristics of *Mycoplasma hominis* adhesion. J Bacteriol 1993;175:3224-3227.
330. Orange GV, Jones M, Henderson IS. Wound and perinephric haematoma infection with *Mycoplasma hominis* in a renal transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 1993;8:1395-1396.
331. Ovetchkine P, Brugieres P, Seradj A, et al. An 8-year-old boy with acute stroke and radiological signs of cerebral vasculitis after recent *Mycoplasma pneumoniae* infection. Scand J Infect Dis 2002;34:307-309.
332. Ozcan SA, Miles R. Biochemical diversity of *Mycoplasma fermentans* strains. FEMS Microbiol Lett 1999;176:177-181.
333. Palmer HM, Gilroy CB, Claydon EJ, et al. Detection of *Mycoplasma genitalium* in the genitourinary tract of women by the polymerase chain reaction. Int J STD AIDS 1991;2:261-263.
334. Parides GC, Bloom IW, Ampel NM, et al. Mycoplasma and ureaplasma in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised hosts. Diagn Microbiol Infect Dis 1988;9:55-57.
335. Pasculle AW. Recognition of *Mycoplasma hominis* in routine bacteriology specimens. Clin Microbiol Newslett 1988;10:145-148.
336. Pastural M, Audard V, Bralet M-P, et al. *Mycoplasma hominis* infection in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 2002;17:495-496.
337. Payan W, Seigal N, Madoff S. Infection of a brain abscess by *Mycoplasma hominis*. J Clin Microbiol 1981;14:571-573.
338. Payne NR, Steinberg SS, Ackerman P, et al. New prospective studies of the association of *Ureaplasma urealyticum* colonization and chronic lung disease. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S117-S121.
339. Peeters MF, Polak-Vogelzang AA, Debruyne FM, Van der Veen J. Role of mycoplasmas in chronic prostatitis. Yale J Med Biol 1983;6:551.
340. Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B, et al. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance in *M. hominis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3142-3150.
341. Perez CR, Leigh MW. *Mycoplasma pneumoniae* as the causative agent for pneumonia in the immunocompromised host. Chest 1991;100:860-861.
342. Petitjean J, Vabret A, Gouarin S, Freymuth F. Evaluation of four commercial immunoglobulin C (IgG)- and IgM-specific enzyme immunoassays for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. J Clin Microbiol 2002;40:165-171.
343. Petzel JP, Hartman PA, Allison MJ. Pyrophosphate-dependent enzymes in walled bacteria phylogenetically related to the wall-less bacteria of the class Mollicutes. Int J Syst Bacteriol 1989;39:413-419.
344. Pflauser B, Engelhardt K, Kampf A, et al. Post infectious central and peripheral nervous system diseases complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection: report of three cases and review of the literature. Eur J Neurol 2002;9:93-96.
345. Phillips DM, Pearce-Pratt R, Tan X, et al. Association of human mycoplasma with HIV-1 and HTLV-I in human lymphocytes. AIDS Res Hum Retroviruses 1992;8:1863-1868.
346. Phillips LE, Faro S, Pokorny SF, et al. Postcesarean wound infection by *Mycoplasma hominis* in a patient with persistent postpartum fever. Diagn Microbiol Infect Dis 1987;7:193-197.
347. Phillips LE, Goodrich KH, Turner RM, et al. Isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum* from obstetrical and gynecological patients by using commercially available medium formulations. J Clin Microbiol 1986;24:377-379.
348. Pigrau C, Almirante B, Gasser I, et al. Sternotomy infection due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:597-598.
349. Pitcher D, Hilbocus J. Variability in the distribution and composition of insertion-like sequences in strains of *Mycoplasma fermentans*. FEMS Microbiol Lett 1998;160:101-109.
350. Pollack JD, Jones MA, Williams MV. The metabolism of AIDS-associated mycoplasmas. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S267-S271.
351. Potts JM, Ward AM, Rackley RR. Association of chronic urinary symptoms in women and *Ureaplasma urealyticum*. Urology 2000;55:486-489.
352. Poulin SA, Perkins RE, Kunds RB. Antibiotic susceptibilities of AIDS-associated mycoplasmas. J Clin Microbiol 1994;32:1101-1103.
353. Povlsen K, Bjornelius E, Lidbrink P, Lind I. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 to nongonococcal urethritis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:97-101.

354. Powell DA, Miller K, Clyde WA. Submandibular adenitis in a newborn caused by *Mycoplasma hominis*. *Pediatrics* 1979;63:798-799.
355. Pratt BC. Recovery of *Mycoplasma hominis* from blood culture media. *Med Lab Sci* 1991;48:350.
356. Quinn PA, Gillan JE, Markestad T, et al. Intrauterine infection with *Ureaplasma urealyticum* as a cause of fatal neonatal pneumonia. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:538-543.
357. Razin S, Harasawa R, Barile MF. Cleavage patterns of the mycoplasma chromosome, obtained by using restriction endonucleases, as indicators of genetic relatedness among strain. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:201-206.
358. Razin S, Michmann J, Shimshoni Z. The occurrence of mycoplasma (pleuropneumonia-like organisms, PLO) in the oral cavity of dentulous and edentulous subject. *J Dent Res* 1964;43:402-405.
359. Razin S, Yoge D. Genetic relatedness among *Ureaplasma urealyticum* serotypes (serovars). *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S300-S304.
360. Razin S, Yoge D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-1156.
361. Renaudin H, Tully JG, Bebear C. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:870-872.
362. Ridgway EJ, Allen KD. *Mycoplasma hominis* abscess secondary to respiratory tract infection. *J Infect* 1994;29:207-210.
363. Riedel K, Kempf VA, Bechtold A, Klimmer M. Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) due to *Mycoplasma pneumoniae* in an adolescent infection 2001;29:240-242.
364. Rikihisa Y, Kawahara M, Wenyon B, et al. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J Clin Microbiol* 1997;35:823-829.
365. Roberts MC, Kenny GE. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:350-352.
366. Roberts MC, Kenny GE. TetM tetracycline-resistant determinants in *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S338-S240.
367. Roberts MC, Koutsy LA, Holmes KK, et al. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal tetM sequences. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:141-143.
368. Robertson JA, Coppola JE, Heisler OR. Standardized method: for determining antimicrobial susceptibility of strains of *Ureaplasma urealyticum* and their response to tetracycline, erythromycin, and rosaramicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;20:53-58.
369. Robertson JA, Stemke GW. Expanded serotyping scheme: for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1982;9:673-678.
370. Robertson JA, Vekris A, Bebear C, et al. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1993;31:824-830.
371. Rogers MJ, Simmons J, Walker RT, et al. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from SS RNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1160-1164.
372. Roifman CM, Rao CP, Lederman HM, et al. Increased susceptibility to mycoplasma infections in patients with hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1986;80:590-594.
373. Rudd PT, Waites KB, Duffy LB, et al. *Ureaplasma urealyticum* and its possible role in pneumonia during the neonatal period and infancy. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S288-S291.
374. Ruiter N, Wentholt HMM. Isolation of a pleuropneumonia-like organism from a skin lesion associated with a fusospirochetal flora. *J Invest Dermatol* 1955;24:31-34.
375. Sadler JP, Gibson J. *Mycoplasma pneumoniae* infection presenting as Stevens-Johnson syndrome: a case report. *Dent Update* 1997;24:367-368.
376. Saillard C, Carle P, Bove JM, et al. Genetic and serologic relatedness between *Mycoplasma fermentans* strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS and non-AIDS patients. *Res Virol* 1990;141:385-395.
377. Salzman MB, Sood SK, Slavin ML. Ocular manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 1992;14:1137-1139.
378. Sanchez PJ. Perinatal transmission of *Ureaplasma urealyticum*: current concepts based on review of the literature. *Clin Infect Dis* 1993;16(Suppl 1):S107-S111.
379. Sanchez PJ, Regan JA. *Ureaplasma urealyticum* colonization and chronic lung disease in low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:542-546.
380. Sands MJ Jr, Rosenthal R. Progressive heart failure and death associated with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Chest* 1982;81:763-765.
381. Sanyal D, Thurston C. *Mycoplasma hominis* infection of a breast prosthesis. *J Infect* 1991;23:210-211.
382. Sasaki T, Blanchard A, Watson HL, et al. In vitro influence of *Mycoplasma penetrans* on activation of peripheral T lymphocytes from healthy donors or human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun* 1995;63:4277-4283.
383. Sasaki T, Sasaki Y, Kita M, et al. Evidence that Lo's mycoplasma (*Mycoplasma fermentans* incognitus) is not a unique strain among *Mycoplasma fermentans* strains. *J Clin Microbiol* 1992;30:2435-2441.
384. Sasaki Y, Honda M, Naitou M, Sasaki T. Detection of *Mycoplasma fermentans* DNA from lymph nodes of acquired immunodeficiency syndrome patients. *Microb Pathog* 1994;17:131-135.
385. Sasaki Y, Ishikawa J, Yamashita A, et al. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* 2002;30:5293-5300.
386. Savige JA, Gilbert GL, Fairley KF, et al. Bacteriuria due to *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* in women with preeclampsia. *J Infect Dis* 1983;148:605-607.
387. Schaefferbeke T, Clerc M, Lequen L, et al. Genotypic characterization of seven strains of *Mycoplasma fermentans* isolated from synovial fluids of patients with arthritis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1226-1231.
388. Schaefferbeke T, Gilroy CB, Bebear C, et al. *Mycoplasma fermentans*, but not *M. penetrans*, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. *J Clin Pathol* 1996;49:824-828.
389. Seto S, Miyata M. Attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence proteins and formation of the electron-dense core in wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* 2003;185:1082-1091.
390. Shepard MC. Culture media for ureaplasmas. In: Razin S, Tully JG, eds. *Methods in Mycoplasmatology*. Vol. 1. New York, Academic Press, 1983:137-146.
391. Shepard MC. *Ureaplasma urealyticum*: overview with emphasis on fetal and maternal infections. *Ann NY Acad Sci* 1988;549:48-55.
392. Shepard MC, Combs RS. Enhancement of *Ureaplasma urealyticum* growth on a differential agar medium (A7B) by a polyamine, putrescine. *J Clin Microbiol* 1979;10:931-933.
393. Shepard MC, Lunceford CD. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J Clin Microbiol* 1976;3:613-625.
394. Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK, et al. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: proposed nomenclature for the human (T-strain) mycoplasmas. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:160-171.
395. Shibata K, Kaga M, Kudo M, et al. Detection of *Mycoplasma fermentans* in saliva sampled from infants, preschool and school children, adolescents, and adults by a polymerase chain reaction-based assay. *Microbiol Immunol* 1999;43:521-525.
396. Shibata K-I, Sasaki T, Watanabe T. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipase C in the membrane. *Infect Immun* 1995;63:4174-4177.
397. Shibata K-I, Watanabe T. *Mycoplasma fermentans* enhances concanavalin A-induced apoptosis of mouse splenic T cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;17103-109.
398. Sillis M. The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Med Microbiol* 1990;33:253-258.
399. Sillis M. Genital mycoplasmas revisited: an evaluation of a new culture medium. *Br J Biomed Sci* 1993;50:89-91.
400. Simms I, Eastick K, Mallinson H, et al. Associations between *Mycoplasma genitalium*, Chlamydia trachomatis and pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol* 2003;56:616-618.
401. Siomou E, Kollios KD, Papadimitriou P, et al. Acute nephritis and respiratory tract infection caused by *Mycoplasma pneumoniae*: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:1103-1106.
402. Skerk V, Schonwald S, Krhen I, et al. Actiology of chronic prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:471-474.
403. Smaron MF, Boonlayangoor S, Zierdt CH. Detection of *Mycoplasma hominis* septicemia by radiometric blood culture. *J Clin Microbiol* 1985;21:298-301.
404. Smyth EC, Weinbren MJ. *Mycoplasma hominis* sternal wound infection and bacteraemia. *J Infect* 1993;26:315-319.
405. Socan M, Ravnik I, Bencina D, et al. Neurological symptoms in patients whose spinal fluid is culture- and/or polymerase chain reaction-positive for *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001;32:E31-E35.
406. Sotgiu S, Pugliatti M, Rosati G, et al. Neurological disorders associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Neurol* 2003;10:165-168.
407. Spaepen MS, Kundsins RB. Simple, direct broth-disk method for antibiotic susceptibility testing of *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:267-270.
408. Stadlander CTK-H, Watson HL, Simecka IW, et al. Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including strain incognitus). *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S289-S301.
409. Stancombe BB, Walsh WF, Derdak S, et al. Induction of human neonatal pulmonary fibroblast cytokines by hyperoxia and *Ureaplasma urealyticum*. *Clin Infect Dis* 1993;7(Suppl 1):S154-S157.
410. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NC, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004;42:1528-1533.
411. Stevens MK, Krause DC. Localization of the *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins HMW1 and HMW4 in the cytoskeletonlike triton shell. *J Bacteriol* 1991;173:1041-1050.
412. Stevens MK, Krause DC. *Ureaplasma pneumoniae* cytoadherence phase-variable protein HMW3 is a component of the attachment organelle. *J Bacteriol* 1992;174:4265-4274.
413. Stimson JB, Hale J, Bowie WR, et al. Tetracycline-resistant *Ureaplasma urealyticum*: a cause of persistent nongonococcal urethritis. *Ann Intern Med* 1981;94:192-194.
414. Stone BB, Cohen SP, Breton GL, et al. Detection of rRNA from four respiratory pathogens using an automated Qβ replicase assay. *Mol Cell Procs* 1996;10:359-370.
415. Storgaard M, Tarp B, Ovesen T, et al. The occurrence of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and herpesviruses in otitis media with effusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:97-99.
416. Stuart PM. *Mycoplasma* induction of cytokine production and major histocompatibility complex expression. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S187-S191.
417. Suni J, Vainionpää R, Tuominen T. Multicenter evaluation of the novel enzyme immunoassay based on P1-enriched protein for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Microbiol Methods* 2001;47:65-71.
418. Svenstrup HF, Nielsen PK, Drasbek M, et al. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J Med Microbiol* 2002;51:361-373.
419. Sweet RL. Colonization of the endometrium and fallopian tubes with *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S244-S246.

420. Swenson CE, VanHamont J, Dunbar BS. Specific protein differences among strains of *Ureaplasma urealyticum* as determined by two-dimensional gel electrophoresis and a sensitive silver stain. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:417-421.
421. Sykes JE. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33:773-789.
422. Syrogiannopoulos CA, Kapatais-Zoumbos K, Decavalas GO, et al. *Ureaplasma urealyticum* colonization of full term infants: perinatal acquisition and persistence during early infancy. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:236-240.
423. Takiguchi Y, Shikama N, Aotsuka N, et al. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Intern Med* 2001;40:345-348.
424. Tasker S, Helps CR, Day MJ, et al. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma hemofelis* and "candidate *Mycoplasma aemominutum*." *J Clin Microbiol* 2003;41:439-441.
425. Tasker S, Lappin MR. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J Feline Med Surg* 2002;4:3-11.
426. Taylor-Robinson D. Evaluation of the role of *Ureaplasma urealyticum* in infertility. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S262-S265.
427. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasmas* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 1996;23:671-684.
428. Taylor-Robinson D. *Mycoplasma genitalium*: an up-date. *Int J STD AIDS* 2002;3:145-151.
429. Taylor-Robinson D, Bebear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasma infections. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:622-630.
430. Taylor-Robinson D, Davies HA, Sarathchandra P, et al. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int J Exp Pathol* 1991;72:705-714.
431. Taylor-Robinson D, Evans RT, Coufalik ED, et al. Effect of short-term treatment of non-gonococcal urethritis with ceftriaxone. *Genitourin Med* 1986;62:19-21.
432. Taylor-Robinson D, Furr PM. Models of infection due to mycoplasmas, including *Mycoplasma fermentans* in the genital tract and other sites in mice. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S280-S282.
433. Taylor-Robinson D, Furr PM, Hanna NF. Microbiological and serological study of non-gonococcal urethritis with special reference to *Mycoplasma genitalium*. *Genitourin Med* 1985;61:319-324.
434. Taylor-Robinson D, Furr PM, Tully JG, et al. Animal models of *Mycoplasma genitalium* urogenital infection. *Isr J Med Sci* 1987;23:561-564.
435. Taylor-Robinson D, Furr PM, Webster ADB. *Ureaplasma urealyticum* in the immunocompromised host. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S236-S238.
436. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Hay PE. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S66-S68.
437. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Horowitz S, et al. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:1066-1068.
438. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Keane FE. Detection of several *Mycoplasma* species at various anatomical sites of homosexual men. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:291-293.
439. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Thomas BJ, Hay PE. *Mycoplasma genitalium* in chronic non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 2004;15:21-25.
440. Taylor-Robinson D, Gumpel JM, Hill A, et al. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the synovial fluid of a hypogammaglobulinemic patient in a survey of patients with inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1978;37:180-182.
441. Taylor-Robinson D, Sarathchandra P, Furr PM. *Mycoplasma fermentans*-HeLa cell interactions. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S302-S304.
442. Taylor-Robinson D, Webster ADB, Furr P, et al. Prolonged persistence of *Mycoplasma pneumoniae* in a patient with hypogammaglobulinemia. *J Infect* 1980;2:171-175.
443. Teng K, Li M, Yu W, et al. Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. *J Clin Microbiol* 1994;32:2232-2234.
444. Teng L-J, Zheng X, Glass JI, et al. *Ureaplasma urealyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. *J Clin Microbiol* 1994;32:1464-1469.
445. Thacker WL, Talkington DF. Comparison of two rapid commercial tests with complement fixation for serologic diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* 1995;33:1212-1214.
446. Thacker WL, Talkington DF. Analysis of complement fixation and commercial enzyme immunoassays for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:778-780.
447. Tham TN, Ferris S, Bahraoui E, et al. Molecular characterization of the PI-like adhesin gene from *Mycoplasma pirum*. *J Bacteriol* 1994;176:781-788.
448. Thomas M, Jones M, Ray S, et al. *Mycoplasma pneumoniae* in a luteo-ovarian abscess. *Lancet* 1975;2:774-775.
449. Ti TY, Dan M, Stemke GW, et al. Isolation of *Mycoplasma hominis* from the blood of men with multiple trauma and fever. *JAMA* 1982;247:60-61.
450. Tilton RC, Dias F, Kidd H, et al. DNA probe versus culture for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;10:109-112.
451. Tjhi JH, Van Kuppeveld FJM, Roosendaal R, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1994;32:11-16.
452. Totten PA, Schwartz MA, Sjöström KE, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *J Infect Dis* 2003;183:269-276.
453. Tullus K, Noack GW, Burman LG, et al. Elevated cytokine levels in transbronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 1996;155:112-116.
454. Tully JG. Mollicute-host interrelationships: current concepts and diagnostic implications. In: Tully JG, Razin S, eds. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Vol 2. San Diego: Academic Press, 1996:1-21.
455. Tully JG, Bove M, Laigret F, et al. Revised taxonomy of the Class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with non-helical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*) and emended descriptions of the order *Mycoplasmales*. Family *Mycoplasmataceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:378-385.
456. Tully JG, Rose DL, Baseman JB, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* mixture in synovial fluid isolate. *J Clin Microbiol* 1995;33:1851-1855.
457. Tully JG, Rose DL, Whitcomb RF, et al. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *J Infect Dis* 1979;139:478-482.
458. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human genital tract. *Lancet* 1981;1:1288-1291.
459. Tully JG, Taylor-Robinson D, Rose DL, et al. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human genital tract. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:387-396.
460. Tully JG, Whitcomb RF, Rose DL, et al. *Acholeplasma brassicae* sp. nov. and *Acholeplasma palmae* sp. nov., two non-sterol-requiring mollicutes from plant surfaces. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:680-684.
461. Tuppini P, Delamare O, Launay V, et al. High prevalence of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in human immunodeficiency virus-seronegative and seropositive populations in Brazzaville, Congo. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:787-788.
462. Uldum SA, Sondergaard-Andersen J, Jensen JS, Lind K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* specific immunoglobulin G antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:221-223.
463. Uno M, Deguchi T, Komeda H, et al. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. *Sex Transm Dis* 1997;24:284-286.
464. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 2002;38:79-85.
465. Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, et al. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 2003;53:289-294.
466. Ursi D, Ieven M, VanBever H, et al. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994;32:2873-2875.
467. Uuskula A, Kohl PK. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *Int J STD AIDS* 2002;13:79-85.
468. Valencia GB, Banzon F, Cummings M, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in neonates with suspected infection. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:571-573.
469. Van Kuppeveld FJ, Johansson K-E, Galama JM, et al. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:401-405.
470. Vojdani A, Chopra PC, Tagle C, et al. Detection of *Mycoplasma* genus and *Mycoplasma fermentans* by PCR in patients with chronic fatigue syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;22:355-365.
471. Waites KB, Bebear CM, Robertson IA, et al. *Cumitech 34: laboratory diagnosis of mycoplasma infections*. Washington, D.C.: ASM Press, 2001.
472. Waites KB, Canupp KC. Evaluation of the Bact/ALERT system detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001;39:4328-4331.
473. Waites KB, Crabb DM, Bing X, Duffy LB. In vitro susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacin (BMS-284756) and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasma. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:161-165.
474. Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. In vitro activities of ABT-773 and other antimicrobials against human mycoplasmas. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:39-42.
475. Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. Comparative in vitro susceptibilities and bactericidal activities of investigational fluoroquinolone ABT-492 anti other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3973-3975.
476. Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Systemic neonatal infection due to *Ureaplasma urealyticum*. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S131-S135.
477. Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Therapeutic considerations for *Ureaplasma urealyticum* infections in neonates. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S208-S214.
478. Waites KB, Crouse DT, Phillips JB III, et al. *Ureaplasma pneumoniae* and sepsis associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1989;83:79-85.
479. Waites KB, Duffy LB, Crouse DT, et al. Mycoplasma infections of cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:241-245.
480. Waites KB, Figarola TA, Schmid T, et al. Comparison of agar versus broth dilution techniques for determining antibiotic susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991;14:265-271.
481. Waites KB, Tully JG, Rose DL, et al. Isolation of *Acholeplasma oculi* from human amniotic fluid in early pregnancy. *Curr Microbiol* 1987;15:327-327.
482. Walsh WF, Butler J, Coalson J, et al. A primate model of *Ureaplasma urealyticum* infection in the premature infant with hyaline membrane disease. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl 1):S158-S162.

-
483. Wang RY-H, Grandinetti T, Shih JW-K, et al. *Mycoplasma genitalium* infection and host antibody response in patients infected by HIV, patients attending STD: clinics and in healthy blood donors. *FFMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:237-245.
484. Wang RY-H, Hu WS, Dawson MS, et al. Selective detection of *Mycoplasma fermentans* by polymerase chain reaction and by using a nucleotide sequence within the insertion sequence-like element. *J Clin Microbiol* 1992;30:245-248.
485. Wang RY-H, Shih IW-K, Grandinetti T, et al. High frequency of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected patients. *Lancet* 1992;340:1312-1316.
486. Wang RY-H, Shih JW-K, Weiss SH, et al. *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis* 1993;17:724-729.
487. Waring AL, Halse TA, Csiza CK, et al. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. *J Clin Microbiol* 2001;39:1385-1390.
488. Waris ME, Toikka P, Saarinen T, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 1998;36:3155-3159.
489. Watanabe T, Shibata K-I, Yoshikawa T, et al. Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;22:241-240.
490. Watkins-Riedel T, Stanek G, Daxboeck F. Comparison of SeroMP-IgA with four other commercial assays for serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:21-25.
491. Webster D, Windsor H, Ling C, et al. Chronic bronchitis immunocompromised patients: association with a novel *Mycoplasma* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:530-534.
192. Welti M, Jaton K, Altwegg M, et al. Development of a multiplex, real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;45:85-95.
493. Whatley JD, Thin RN, Mumtaz G, Ridgway GL. Azithromycin vs doxycycline in the treatment of nongonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 1991;2:248-251.
494. Willby MJ, Krause DC. Characterization of a *Mycoplasma pneumoniae* hmw3 mutant: implications for attachment organelle assembly. *J Bacteriol* 2002;184:3061-3068.
495. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:494-498.

496. Wolthers KC, Kornelisse RF, Platenkamp GJJM, et al. A case of *Mycoplasma hominis* meningo-encephalitis in a full-term infant: rapid recovery after start of treatment with ciprofloxacin. *Eur J Pediatr* 2003;162:514-516.
497. Wood JC, Lu RM, Peterson EM, et al. Evaluation of Mycotrim-GU for isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1985;22:789-792.
498. Yajko DM, Balston E, Wood D, et al. Evaluation of PPLO, A7B, E and NYC agar media for the isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma* species from the genital tract. *J Clin Microbiol* 1984;14:73-76.
499. Yakulis VJ, Costea N, Heller P. α -Galactoside determinants of the I-antigen. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121:812-816.
500. Yanez A, Cedillo L, Neyrolles O, et al. *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary anti-phospholipid syndrome. *Emerg Infect Dis* 1999;5:164-167.
501. Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:157-168.
502. Yechouron A, Lefebvre J, Robson HG, et al. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. *Clin Infect Dis* 1992;15:434-438.
503. Yogev D, Halachmi D, Kenny GE, et al. Distinction of species and strains of mycoplasmas (*Mollicutes*) by genomic DNA fingerprints with an rRNA probe. *J Clin Microbiol* 1988;26:1198-1201.
504. Yogev D, Razin S. Common deoxyribonucleic acid sequences in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* genomes. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:426-430.
505. Yoon BH, Romero R, Kom M, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-1137.
506. Yoshida T, Degeuchi T, Ito M, et al. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men in real-time BCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:1451-1455.
507. Yoshida T, Maeda S-I, Degeuchi T, Ishiko H. Phylogeny-based rapid identification of mycoplasma and ureaplasmas from urethritis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40:105-110.
508. Yoshida T, Maeda S-I, Deguchi T, et al. Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1850-1855.
509. Zhang Q, Wise KS. Localized reversible frameshift mutation in an adhesin genes confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol Microbiol* 1997; 25:859-869.

Micobacterias

Tendencias actuales en la tuberculosis clínica

Aumento mundial de la incidencia de tuberculosis
Impacto de la coinfección por HIV y *Mycobacterium tuberculosis*
Personas con riesgo de tuberculosis
Enfermedad rápidamente progresiva
Implementación de un control de la infección y medidas epidemiológicas más intensivas

Tendencias en el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis

Uso de técnicas moleculares
Uso de instrumentos automatizados
Uso de medios de cultivo en caldo
Inoculación de muestras clínicas en medios de cultivo con base de agar
Uso de *p*-nitro-acetilamino-hidroxipropiofenona (NAP)
Aplicaciones de la cromatografía gas-líquido y la cromatografía líquida de alto rendimiento
Uso del tubo de hemocultivo con sistema de lisis-centrifugación

Laboratorio clínico

Optimización de la detección y la identificación de micobacterias
Seguridad en el laboratorio

Recolección de las muestras

Muestras respiratorias
Hemocultivos

Muestras de heces
Otras muestras "estériles"

Procedimientos de laboratorio para el aislamiento y la identificación de las micobacterias

Preparación de las muestras
Digestión y descontaminación
Centrifugación
Muestras de médula ósea y muestras de biopsia
Otras muestras líquidas
Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes

Cultivo de muestras para el aislamiento de micobacterias

Medios de cultivo
Medios de cultivo no selectivos para el aislamiento de micobacterias
Medios de Cohen y de Middlebrook
Medios selectivos
Incubación

Métodos rápidos para establecer un diagnóstico

Sensibilidad de los frotis ácido-alcohol resistentes
Cromatografía gas-líquido y cromatografía líquida de alto rendimiento
Uso de medios de cultivo en caldo

Sistemas de detección automatizados

Sistema BACTEC AFB
Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, tubo indicador de crecimiento de micobacterias) y MGIT 960
Sistema de detección de micobacterias MB/BacT
Sistema de cultivo ESP II
BACTEC MYCO/F LYTIC

Sistemas de detección manuales

Sistema Septi-Chek AFB

Identificación de micobacterias mediante métodos convencionales

Temperatura óptima para el aislamiento y velocidad de crecimiento
Producción de pigmento
Acumulación de niacina
Reducción de nitratos a nitritos
Hidrólisis en Tween 80®
Actividad de catalasa
Actividad de arilsulfatasa
Actividad de ureasa
Pirazinamidasa
Captación de hierro
Inhibición del crecimiento por la hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico
Crecimiento en cloruro de sodio al 5%
Crecimiento en agar de MacConkey

Clasificación de las micobacterias

Identificación de laboratorio de las micobacterias y síndromes clínicos relacionados

Se están implementando nuevas técnicas y algoritmos revisados para el aislamiento, la identificación y las pruebas de sensibilidad de las micobacterias en muchos laboratorios en vista de los cambios en las manifestaciones clínicas y la epidemiología de la tuberculosis. A corto plazo, se seguirán utilizando los métodos convencionales; sin embargo, se están introduciendo técnicas moleculares rápidas para la identificación y las pruebas de sensibilidad de las especies de *Mycobacterium* aisladas en muestras clínicas. Al menos dos tercios de los artículos de investigación básica y aplicada en relación con las micobacterias y la tuberculosis publicados en la bibliografía médica actual se concentran en las posibles aplicaciones de laboratorio de las técnicas moleculares. Aunque la solicitud para la investigación pura en biología molecular es una parte integral de esta evolución, la fuerza impulsora para el personal del laboratorio clínico es proporcionar identificaciones de especies y perfiles de sensibilidad de los antibióticos cada vez más rápidos. En la medida que la investi-

Revisión de las especies de *Mycobacterium*: características de laboratorio y correlaciones clínicas

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
Fotocromógenos
Escotocromógenos
No fotocromógenos
Especies de crecimiento rápido
Otras micobacterias

Detección e identificación de las micobacterias mediante métodos moleculares

Métodos de amplificación de señales

Sondas de ácidos nucleicos
Hibridación in situ

Métodos de amplificación de ácidos nucleicos

Aplicaciones comerciales
Ensayos domésticos de PCR, incluida la PCR en tiempo real

Análisis posamplificación

Hibridación inversa
Secuenciación del DNA
Análisis de micromatrices

Tipificación de cepas y huellas moleculares de DNA

Pruebas de sensibilidad

Tratamiento a corto plazo

Recomendaciones de la American Thoracic Society

Resumen

gación de procedimientos moleculares derive en productos comerciales, muchos de los cuales requieren la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA), la mayoría de los laboratorios podrá diagnosticar la tuberculosis en días –o increíblemente incluso en horas– más que en semanas.

Tendencias actuales en la tuberculosis clínica

Las siguientes son tendencias sobre la epidemiología de la tuberculosis que deben ser encaradas por los médicos y el personal de control de infecciones y de laboratorio.

Aumento mundial de la incidencia de tuberculosis

La incidencia de tuberculosis en los Estados Unidos declinó progresivamente durante las ocho primeras décadas del siglo XX, pero esta tendencia cambió a comienzos de la década de

1980.²⁴ Hacia fines de los años setenta la condescendencia fue reemplazando la vigilancia a medida que la curva de incidencia de la tuberculosis se aproximaba a cero en numerosas partes del mundo y muchos creían que la tuberculosis estaba por ser derrotada.^{41,144,285} De hecho, ocurrió lo opuesto. Desde 1985 hasta 1992 hubo un aumento en los casos comunicados de tuberculosis en los Estados Unidos.¹⁴⁴ Además de la condescendencia, otros factores contribuyeron a esta tendencia, como los cambios en la asignación de fondos federales para el control de la tuberculosis, la epidemia de HIV/SIDA, el aumento de la inmigración de personas desde zonas con tasas elevadas de endemia, el hacinamiento de los pobres y la aparición de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*.^{24-26,42,59,144,249,335,341,343} Desde 1992 hasta 2002 hubo nuevamente una tendencia decreciente en la cantidad de casos de tuberculosis en los Estados Unidos debido a la mejoría en las medidas de salud pública, que incluyeron el tratamiento con observación directa. Sin embargo, en todo el mundo, el impacto de la tuberculosis es peor que nunca, sobre todo en las regiones que tienen gran cantidad de individuos infectados por HIV.

En 1993, en un paso sin precedentes, la Organización Mundial de la Salud declaró la tuberculosis una emergencia global. El boletín informativo sobre el estado actual de la tuberculosis en el mundo (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>) es impactante y menciona los siguientes datos:

1. Un tercio de la población mundial está infectada actualmente por *M. tuberculosis*.
2. Se produce una nueva infección por tuberculosis cada segundo, lo que conduce a nuevas infecciones por tuberculosis en el 1% de la población mundial por año.
3. La epidemia de tuberculosis está creciendo y mata a alrededor de 2 millones de personas por año.
4. El HIV contribuye significativamente a la propagación de la tuberculosis.
5. Las infecciones recién adquiridas entre 2002 y 2020 se proyectan a 1 000 millones de individuos. De éstos, 150 millones se enfermarán y 36 millones morirán por tuberculosis.

En los países industrializados, el 80% de los casos ocurren en individuos mayores de 50 años; en los países en vías de desarrollo, el 80% de los casos ocurren entre los 15 y los 50 años. Se ha calculado que al menos 15 millones de personas en los Estados Unidos tienen pruebas cutáneas positivas o presentan enfermedad clínica. Las tasas de aumento son incluso mayores en los países en vías de desarrollo, debido a las tasas elevadas de la endemia, las condiciones socioeconómicas en deterioro o crónicamente malas en las ciudades densamente pobladas y la cantidad creciente de individuos infectados por HIV.

Impacto de la coinfección por HIV y *Mycobacterium tuberculosis*

La pandemia por HIV, que en su mayor parte no está controlada en muchas zonas del mundo, ha contribuido significativamente a la propagación de la tuberculosis. La infección por HIV y la tuberculosis son enfermedades que interactúan de manera sinérgica en todo nivel, desde el molecular hasta el epidemiológico.^{25,59} Por ejemplo, la presencia de HIV en un individuo promueve la replicación intracelular del bacilo de la tuberculosis y, en consecuencia, la propagación de *M. tuberculosis* a otros. En muchas partes del mundo, la tuberculosis es la causa principal de muerte en los individuos infectados por HIV. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que

un tercio de los 36.1 millones de personas que están infectadas por HIV tienen también tuberculosis.²⁷⁹ El factor de riesgo más poderoso conocido para la reactivación de la tuberculosis latente es la coinfección por HIV.^{31,88,181,310} Si se considera que la mayoría de los individuos infectados por HIV, *M. tuberculosis* o ambos viven en condiciones de pobreza con acceso insuficiente a la atención de la salud, esta situación sólo puede agravarse.

Personas con riesgo de tuberculosis

Se deben realizar pruebas de cribado para tuberculosis en los grupos de alto riesgo establecidos por el *Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis* de los CDC (Consejo Asesor para la Eliminación de la Tuberculosis de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades), a saber:⁵⁶

1. Contactos cercanos (aquellos que comparten la misma casa u otro ambiente cerrado) de personas de las que se sabe o se sospecha que tienen tuberculosis.
2. Personas infectadas por HIV.
3. Personas que se inyectan drogas ilegales u otros consumidores de sustancias identificadas como de alto riesgo (como consumidores de crack de cocaína).
4. Personas que presentan factores de riesgo clínico que se sabe que aumentan la posibilidad de sufrir la enfermedad en el caso de que ocurra la infección.
5. Residentes y empleados de lugares que agrupan individuos de alto riesgo (como instituciones correccionales, asilos, instituciones para enfermos mentales, otras instituciones de residencia prolongada y albergues para individuos sin hogar).
6. Personal sanitario que atiende a pacientes de alto riesgo.
7. Individuos nacidos en el extranjero, incluidos los niños, llegados recientemente (dentro de los 5 años) de países con alta incidencia o prevalencia de tuberculosis.
8. Algunas poblaciones de bajos ingresos que cuentan con poca atención médica.
9. Poblaciones minoritarias raciales o étnicas de alto riesgo, según las definiciones locales.
10. Lactantes, niños y adolescentes expuestos a adultos pertenecientes a categorías de alto riesgo.

Se recomienda que los profesionales que intervienen en los programas de tuberculosis locales o estatales sean los que definen los grupos por evaluar. En algunas localidades, los departamentos de salud local deben llevar a cabo el estudio de detección o deben conversar acerca de la necesidad de realizar esta evaluación con otros individuos adecuados, como el personal de las instituciones correccionales, los funcionarios de control de infecciones de los hospitales y los operadores de los albergues. Los CDC proporcionan varias recomendaciones para conducir los programas y para manejar los grupos de alto riesgo específicos.⁵⁶

Enfermedad rápidamente progresiva

La infección por *M. tuberculosis* de adquisición reciente no siempre sigue la evolución clásica y lentamente progresiva de la enfermedad secundaria. La tuberculosis progresiva primaria o el tipo milar de tuberculosis de rápida propagación es la regla más que la excepción en los pacientes con inmunosupresión profunda, como los pacientes con SIDA. La progresión de la enfermedad en estos pacientes ya no se mide en términos de

meses y años, sino más bien, en semanas. La replicación más rápida de las micobacterias en los sitios de infección, tanto de *M. tuberculosis* como particularmente de cepas pertenecientes al complejo *M. avium-intracellulare* (MAI), conduce no sólo a altas concentraciones de microorganismos en estos sitios, sino también a septicemia, propagación miliar y a posibles fracasos terapéuticos secundarios a la carga masiva de micobacterias y posiblemente al surgimiento de cepas multirresistentes.

Implementación de un control de la infección y medidas epidemiológicas más intensivas

También se están instituyendo medidas más intensivas para que los pacientes con alto índice de sospecha de tuberculosis sean rápidamente aislados. El personal de los hospitales dedicado a la asistencia directa de los pacientes con tuberculosis también corre alto riesgo de infección y es necesario que siga los procedimientos de aislamiento y que use vestimentas y máscaras protectoras con filtros de alta selectividad. El personal de laboratorio que manipula muestras clínicas de pacientes con tuberculosis también está muy expuesto a sufrir la infección, pero puede trabajar en forma segura utilizando las precauciones universales, que incluyen el procesamiento de las muestras con campanas de seguridad biológica con flujo laminar. Se encuentran bajo estrecha vigilancia los sistemas de ventilación de los hospitales y lugares donde existen condiciones de hacinamiento, como prisiones, asilos y albergues urbanos para individuos sin hogar, en los que se han comunicado brotes de tuberculosis. Nardell y cols. observaron que una mala aireación contribuía a la transmisión aérea de infecciones en edificios equipados con sistemas de tuberías que proveían mezclas deficientes de aire exterior.²⁴¹ Sin embargo, los problemas subsistirán en circunstancias que no despiertan sospechas, como el brote de tuberculosis entre 41 clientes de un bar local comunicados por Kline y cols.¹⁸⁰ El caso inicial en esta comunicación fue un individuo sin hogar que era cliente habitual del bar, que tuvo un intervalo asintomático prolongado antes del diagnóstico. El consumo importante de alcohol entre esta población de clientes también puede haber contribuido a la alta tasa de infectividad; se ha demostrado que este factor de riesgo se asocia con la transmisión de la tuberculosis.

Tendencias en el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis

En respuesta a estas situaciones clínicas y epidemiológicas alteradas, han surgido varios cambios en las prácticas de laboratorio en los últimos años. Se han introducido varias técnicas nuevas dirigidas a la detección de *M. tuberculosis* directamente en muestras clínicas mediante la amplificación de ácidos nucleicos, el aislamiento más eficaz de micobacterias en las muestras clínicas, la rápida identificación de las micobacterias y la determinación de los perfiles de sensibilidad a los fármacos. El siguiente es un resumen de varios de estos métodos nuevos:

Uso de técnicas moleculares

Los métodos moleculares han cambiado de manera significativa el tiempo que requiere la identificación en los laboratorios que los utilizan (véanse los detalles más adelante). Esto comenzó con el uso de las sondas de ácidos nucleicos comerciales para la identificación de miembros del complejo *M.*

tuberculosis, el complejo MAI, *M. kansasii* y *M. goodii*. El uso de estas sondas redujo significativamente el tiempo de identificación de estos microorganismos y, lo que es más importante, confirmó o excluyó con rapidez la presencia de *M. tuberculosis*.

La detección directa de *M. tuberculosis* en las muestras clínicas es posible utilizando pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Dos de estos métodos han recibido la aprobación de la FDA para su uso en muestras clínicas; ambos son altamente sensibles y específicos para *M. tuberculosis* en muestras con frotis positivos. También se describieron distintos ensayos "domésticos", más recientemente en varios de los formatos en tiempo real. Aunque en teoría, se puede detectar el DNA de una sola célula micobacteriana después de la amplificación mediante PCR, en realidad se necesita más de una célula por la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras clínicas. Por ejemplo, Yajko y cols. determinaron que 42 unidades formadoras de colonias (UFC) era el límite inferior de corte en las muestras directas de esputo con su ensayo, lo cual correspondía a ocho UFC que fueron aisladas en cultivo de muestras procesadas con *N*-acetil-L-cisteína (NALC)-NaOH.⁴⁰¹

Otras técnicas de biología molecular, como la secuenciación de ácidos nucleicos, la hibridación inversa y el análisis de micromatrices, también han sido satisfactorias para la caracterización rápida de las micobacterias que crecen en cultivo. Estas técnicas tendrán un efecto considerable sobre la forma como se practicará la micobacteriología en el futuro y se explican mejor más adelante.

Uso de instrumentos automatizados

El tiempo transcurrido hasta el aislamiento de micobacterias en el esputo y otras muestras, incluidos los hemocultivos, se ha acortado hasta 2 a 3 semanas con el uso de los sistemas automatizados.^{236,287} BACTEC 460® (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD), BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube® (MGIT) 960 (BD Diagnostic) y ESP II® (Trek Diagnostic Systems, Westlake, OH) también han sido autorizados por la FDA para la realización de pruebas rápidas de sensibilidad a los antituberculosos de primera línea.^{128,396} Un aumento del crecimiento, según lo determina el instrumento, en el frasco ampolla que contiene el antibiótico dentro de los 3 a 5 días de la inoculación con la cepa de prueba indica resistencia al fármaco.

Uso de medios de cultivo en caldo

La tasa de aislamiento y el tiempo hasta la positividad de las micobacterias de las muestras clínicas también se han mejorado mediante el uso de los medios de cultivo en caldo. Los sistemas de cultivo con base de caldo para las micobacterias incluyen los sistemas MGIT® manual y automatizado (BD Diagnostic), que utilizan caldo 7H9 y un sensor fluorescente sensible al O₂ para indicar el crecimiento microbiano, el frasco MB/BacT® (BioMérieux, Durham, NC), el frasco lítico BACTEC MYCO/F® (BD Diagnostic), el sistema Septi-Chek manual® (BD Diagnostic) y el ESP Culture System® (Trek Diagnostic).

Inoculación de muestras clínicas en medios de cultivo con base de agar

La inoculación de un medio de cultivo transparente con base de agar, como Middlebrook 7H10 o 7H11® permite la observación microscópica para microcolonias. Se puede observar con

el microscopio el crecimiento de las colonias tan sólo 5 a 7 días después de la inoculación de muestras con frotis positivos. Se ha utilizado también la morfología de las microcolonias realizando identificaciones presuntivas tempranas de *M. tuberculosis* y miembros del MAI. Esta información a menudo proporciona una guía útil para otras investigaciones del aislamiento, sobre todo para seleccionar el ensayo de sonda de ácidos nucleicos apropiado.

Uso de *p*-nitro-acetilamino-hidroxipropiofenona (NAP)

La NAP es un antibiótico que inhibe selectivamente el crecimiento de *M. tuberculosis* en los medios de cultivo en caldo. Después de la inoculación de un frasco ampolla con cultivo BACTEC que contiene NAP y el microorganismo de prueba, cualquier elevación en el índice de crecimiento, que indica resistencia a la NAP, después de 3 días de incubación incluye la posibilidad de *M. tuberculosis*.

Aplicaciones de la cromatografía gas-líquido y la cromatografía líquida de alto rendimiento

La composición de ácidos micólicos de la pared celular y de los ácidos grasos que contiene, determinada por cromatografía de gas-líquido y cromatografía líquida de alto rendimiento, define perfiles útiles para la identificación rápida de especies de micobacterias aisladas en las muestras clínicas.

Uso de tubos de hemocultivo con sistema de lisis-centrifugación

El aislamiento de micobacterias en las muestras de sangre periférica y médula ósea puede mejorarse liberando las micobacterias del medio intracelular al caldo de hemocultivo, lo que aumenta la tasa de aislamiento y reduce el tiempo necesario.

Por lo tanto, se utiliza una combinación de técnicas microbiológicas tradicionales mejoradas y aplicaciones técnicas de diagnóstico molecular como herramienta para la rápida detección e identificación de las micobacterias en las muestras clínicas y en los cultivos positivos. La identificación más rápida de las micobacterias permite un tratamiento antimicobacteriano dirigido e intensivo, que ayuda a evitar la aparición de cepas resistentes a los fármacos y tiene implicaciones en relación con la transmisión interhumana de la tuberculosis.²⁶² En este capítulo se explicarán con más detalle los nuevos enfoques señalados antes.

Laboratorio clínico

Optimización de la detección y la identificación de micobacterias

Salfinger señala lo que denomina un programa de "ejecución rápida", en referencia a la organización global de los laboratorios clínicos y a la necesidad de proporcionar más servicios de laboratorio.^{298,300} Tres objetivos primarios del programa de ejecución rápida son:

1. Utilizar las técnicas más rápidas y confiables a fin de lograr los tiempos de procesamiento más cortos posibles para la identificación del microorganismo y las pruebas de sensibilidad.
2. Centralizar estos servicios para controlar costos.
3. Limitar al menor tiempo posible el confinamiento de los pacientes con infecciones no producidas por *M. tuberculosis* en habitaciones para aislamiento respiratorio.

La práctica tradicional de esperar que aparezcan las colonias bacterianas en agar sólido, realizar las identificaciones sin técnicas de sondas y efectuar las pruebas de sensibilidad a los antibióticos sólo en medios sólidos lleva demasiado tiempo. Las decisiones referentes a los procedimientos y las pruebas que se realizarán en el laboratorio del lugar y que serán enviadas a un laboratorio de referencia calificado deben determinarse dentro de cada comunidad de asistencia de la práctica. En muchos lugares, las actividades del laboratorio local pueden estar limitadas a los procedimientos rápidos de cambio de rumbo, como examinar frotis para microorganismos ácido-alcohol resistentes o la inoculación y la evaluación provisional de los cultivos. Otros procedimientos, que nuevamente deben ser determinados por el personal sanitario, pueden realizarse mejor en el laboratorio de referencia regional. La mayoría de las técnicas para identificaciones directas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento, el análisis de sondas de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los ensayos de endonucleasas de restricción y secuenciación del DNA, estarán dentro de la competencia del laboratorio de referencia, pero se encuentran cada vez más ampliamente disponibles. Se debe establecer un equipo de trabajadores sanitarios, que incluya médicos, especialistas de laboratorio y personal de apoyo para determinar los enfoques diagnósticos que deben coordinarse en el programa de rastreo rápido para alcanzar los objetivos. El diagnóstico temprano, el tratamiento adecuado y rápido, y el aislamiento respiratorio son los principales ingredientes para lograr la curación del paciente, evitar el surgimiento de cepas resistentes e interrumpir la transmisión de una persona a otra.

Seguridad en el laboratorio

La manipulación incorrecta del material biológico infeccioso como muestras clínicas coloca al personal de laboratorio en riesgo de infección. En los Estados Unidos existe una preocupación creciente por la bioseguridad en relación con la manipulación de muestras potencialmente infecciosas y cultivos en los laboratorios de microbiología clínica. En la actualidad, en muchos casos se recomiendan los estándares estrictos de control de seguridad que se conforman al estándar de bioseguridad de nivel 3, sobre todo cuando se trabaja con aislamientos de cultivos. Específicamente, se requieren prácticas de bioseguridad de nivel 3 para los laboratorios en los cuales se realizan actividades niveles II y III de la American Thoracic Society, que en el caso de las micobacterias son la propagación y la manipulación de cultivos para *M. tuberculosis* o *M. bovis*. Los siguientes son los requisitos de bioseguridad propuestos por el Department of Health and Human Services de los Estados Unidos (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 3ª edición, 1993).

El ámbito de bioseguridad de nivel 3, que incluye el gabinete de seguridad biológica y la centrífuga, debe tener paredes y superficies de trabajo impermeables, flujo de aire direccional (con la presión de aire más baja en el laboratorio) y un cierre con doble puerta para evitar el flujo retrógrado del aire. El aire proveniente del ámbito de bioseguridad debe ser ventilado a través de filtros particulados de alta eficacia para aire directamente hacia el exterior. Los laboratorios y las capuchas deben estar equipados con medidores para controlar la presión de aire.

Como el equipamiento y los brazos del trabajador colocados en un gabinete para seguridad biológica pueden interrumpir el flujo de aire laminar y desviar el aire contaminado hacia afue-

ra, quienes trabajan en ese gabinete y en el ámbito de bioseguridad nivel 3 deben utilizar un equipo de protección personal, que incluya una máscara con filtros. Se debe evaluar todos los años al personal para verificar que la máscara se adapta correctamente. Se deben utilizar batas descartables sobre las prendas de trabajo (no se deben utilizar vestimentas de calle en el ámbito de bioseguridad de nivel 3 porque se pueden contaminar), junto con guantes, gorras y protección del calzado para completar los accesorios de protección personal, ya que pueden ocurrir salpicaduras accidentales. Una vez que se completa el trabajo se deben retirar las vestimentas y colocarlas en una bolsa para su tratamiento en el autoclave.

El director debe determinar el grado en que se requieren renovaciones en el ámbito del laboratorio. Éstas pueden costar muchos miles de dólares y es posible que no sean rentables en ciertos lugares. En estos casos, hay que considerar la decisión de si sería más eficaz realizar los cultivos para micobacterias en otras instalaciones, como un laboratorio de referencia que pueda cumplir con los estándares recomendados.

Recolección de las muestras

Las micobacterias pueden ser aisladas en distintas muestras clínicas, como las de las vías altas (esputo, lavados bronquiales, lavado broncoalveolar y biopsias bronquiales), orina, heces, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR); biopsias titulares y aspiraciones profundas con aguja de casi cualquier tejido u órgano.¹⁸⁴ Las muestras que pueden contener flora bacteriana normal pueden procesarse enseguida después de la recolección para reducir al mínimo el grado de sobrecrecimiento con contaminantes.

Muestras respiratorias

Las muestras de esputo recogidas con expectoración o con nebulización ultrasónica se obtienen mejor poco después de que el paciente se despierta por la mañana, cuando la concentración de las micobacterias es máxima. En el pasado, se necesitaban muestras de esputo de 24 horas para tener una concentración suficiente de micobacterias para aumentar al máximo el aislamiento; sin embargo, los procedimientos de extracción actuales son más eficientes y basta una muestra más pequeña para lograr el mismo grado de aislamiento. No se recomiendan las recolecciones de 24 horas porque la muestra que contiene la máxima concentración de micobacterias estará proporcionalmente diluida por las muestras de bajo rendimiento ulteriores y las posibilidades de un hipercrecimiento de bacterias y de hongos durante el proceso de recolección prolongada aumentan en forma significativa.¹⁶⁶

La liberación irregular e intermitente de micobacterias en la luz bronquial desde las úlceras mucosas o las cavidades loculadas a menudo conduce a un patrón variable de aislamiento desde las muestras respiratorias. Los cultivos obtenidos de pacientes con tuberculosis pulmonar o renal, en particular, pueden ser positivos un día pero negativos el siguiente; por lo tanto, se debe recoger un mínimo de tres esputos de las primeras horas de la mañana o cinco muestras de orina de las primeras horas de la mañana en períodos sucesivos de 24 horas para aumentar al máximo la posibilidad de aislamiento de micobacterias. Todas las muestras deben ser transportadas rápidamente al laboratorio y refrigeradas si se difiere el procesamiento.

Hemocultivos

Se pueden utilizar varios métodos para el aislamiento de micobacterias en los hemocultivos. Berlin y cols. comunicaron sobre el uso de un sistema bifásico que utiliza albúmina-ácido oleico-7H11 modificado como fase de agar e infusión de cerebro y corazón como fase de caldo. Se obtuvieron cultivos positivos para MAI tan sólo a los 6 a 8 días.²⁰ Sin embargo, Agy y cols. informaron que sólo el 43,8% de los hemocultivos de pacientes con hemocultivos positivos fueron aislados utilizando un sistema bifásico similar.³ El uso del sistema de hemocultivo por lisis-centrifugación (Isolator®; Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) ha aumentado el rendimiento y acortado el tiempo hasta el aislamiento de micobacterias en los hemocultivos.^{104,212} El tubo de lisis-centrífuga contiene un anticoagulante y un agente que lisa para lograr la rotura de eritrocitos y neutrófilos. Así, se liberan las micobacterias intracelulares en el medio de caldo, enriquecido además por la lisis de los eritrocitos. Cada tubo tiene 5 mL de sangre y la lisis celular puede aumentarse invirtiendo con suavidad el tubo varias veces inmediatamente después de agregar la muestra. Luego de la centrifugación del tubo a 3 000 g durante 20 a 30 minutos, se descarta el líquido que queda y se dividen 1,6 mL de sedimento en alícuotas de 0,2 mL para su transferencia a los medios de cultivo apropiados.

Uno de los primeros sistemas de hemocultivos semiautomatizados para micobacterias fue el BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, MD); la detección de frascos positivos se basó sobre la detección del ¹⁴CO₂ radiactivo liberado en el frasco de hemocultivo a partir del metabolismo del ácido 1-^{[14}C]-palmitico que fue incluido en el medio de caldo (Middlebrook).

Se ha propuesto la teoría de que el reactivo de lisis-anticoagulante (LAR) contenido en el tubo Isolator® puede ser tóxico para el MAI cuando se transfiere el producto de la lisis a un sistema líquido cerrado, al contrario del subcultivo en medios sólidos, para el cual el componente puede difundirse en el agar o evaporarse en el espacio aéreo suprayacente. Whittier y cols. llevaron a cabo un estudio de aislamiento en Isolator en el cual el aislamiento de MAI de medios bifásicos Septic-Check AFB fue superior a su aislamiento en los frascos BACTEC 12B inoculados en paralelo.^{383a}

Sin embargo, Doern y Westerling observaron que el efecto inhibidor de LAR en los frascos de BACTEC 12B se reduce si se utiliza un inóculo pequeño (0,2 mL) del producto de la lisis del Isolator.^{77,78} Sin embargo, Wasislauskas y Morrell contraargumentan que el uso de un inóculo más pequeño puede comprometer el aislamiento en las infecciones leves.³⁷² Tal vez si se va a utilizar un sistema líquido cerrado para la transferencia de muestras de sangre con lisis, centrifugadas y procesadas, puede estar indicada la inoculación de medios sólidos en paralelo, sobre todo en los pacientes con SIDA, en los cuales el aislamiento de microorganismos MAI es altamente probable.

El problema se elude en muchos laboratorios utilizando los frascos para hemocultivo lítico, lo que evita posibles inconvenientes asociados con el sistema Isolator. En un estudio de 32 casos de sepsis por micobacterias, se detectó crecimiento en 30 de los frascos ampollas 13A (93,7%), en 27 placas de agar de Middlebrook 7H11 inoculadas con sedimento obtenido del tubo Isolator (84,4%) y en 26 frascos BACTEC 12B inoculados con el sedimento de Isolator (81,2%).³ Se detectó crecimiento en el frasco 13B y en los frascos 12B a los 14,2 y 13,7 días, respectivamente, en comparación con 20,8 días para las placas M7H11. Este estudio llegó a la conclusión de que el frasco BACTEC 13A es igual o mejor que el sistema Isolator, tanto en la tasa de aislamiento de micobacterias de los hemo-

cultivos como en el tiempo hasta él, conclusión que también han alcanzado otras investigaciones.³⁹⁰ Strand y cols. observaron que el frasco BACTEC 13A era comparable con el procedimiento en agar de lisis-centrifugación/7H11 en la tasa de aislamiento (96,9% y 98,5%, respectivamente) y el tiempo de detección de 64 hemocultivos positivos para *M. avium* y uno para *M. tuberculosis*.³³⁷ Se presentarán en este capítulo los detalles de los frascos líticos para hemocultivos y sus aplicaciones en el laboratorio de micobacteriología.

Existen varias opciones comerciales más nuevas para el cultivo de sangre para micobacterias, algunas de las cuales contienen agentes líticos que ayudan a liberar las micobacterias de los fagocitos. Estas opciones incluyen el ESP Culture System II (Trek Diagnostics), el sistema lítico BACTEC MYCO/F (BD Diagnostic Systems) y el frasco MB/BacT (BioMérieux) y se explican a continuación.

Cualquiera que sea el sistema de hemocultivos que se utilice, es posible que la política de obtener por lo menos dos conjuntos de cultivos no sea costo-eficaz para los pacientes en los cuales se sospecha una micobacteriemia.³³⁴ De un total de 1 047 hemocultivos para micobacterias obtenidos en 273 pacientes con MAI diseminado, Stone y cols. observaron que sólo uno de los dos frascos era positivo en sólo cuatro de 98 cultivos positivos (4%).³³⁴ En el 85%, ambos frascos fueron negativos y en el 11%, ambos frascos fueron positivos. Por lo tanto, como rutina recomiendan obtener sólo un único hemocultivo para el diagnóstico de septicemia por micobacterias y ordenar otro cultivo sólo si existe una prueba clínica firme de infección diseminada. Se ha destacado la importancia de obtener hemocultivos en los pacientes en los que se sospecha tuberculosis.²⁹ El 14% de los pacientes con tuberculosis diseminada tuvieron hemocultivos positivos (el consumo de drogas intravenosas y el alcoholismo crónico fueron factores de riesgo); en el pasado, hasta el 26-42% de los pacientes con SIDA tuvieron infecciones por micobacterias en algún momento durante el curso de su enfermedad y en el 33%, los hemocultivos positivos proporcionaron el aislamiento inicial del microorganismo. Por lo tanto, los hemocultivos positivos para bacilos ácido-alcohol resistentes proporcionan un procedimiento no invasor para diagnosticar una enfermedad diseminada.

Muestras de heces

En ciertos pacientes con SIDA, la concentración de micobacterias, sobre todo MAI, puede ser lo suficientemente alta en el colon como para ser aislada en cultivo. Kiehn y cols. sugirieron un procedimiento para procesar muestras de heces para cultivo de micobacterias.¹⁷⁰

- Las muestras se recogen en un recipiente limpio (no necesariamente estéril) con una tapa bien ajustada, como para los cultivos bacterianos de rutina.
- Se prepara en primer lugar un frotis directo de una pequeña cantidad de la muestra y se lo tiñe para bacilos ácido-alcohol resistentes, utilizando las técnicas de carbolfucsina de Ziehl-Neelsen o de Kinyoun o el método de fluorescencia de rodamina-auramina.
- Si los frotis son negativos para bacilos ácido-alcohol resistentes, la muestra no se procesa más.
- Si se observan bacilos ácido-alcohol resistentes, se suspende 1 g de heces en 5 mL de caldo de Middlebrook 7H9 o equivalente y se lo somete a la misma descontaminación-digestión con NaOH como se utilizó para las muestras de esputo, lo que se describirá más adelante.

- La contaminación del cultivo con bacterias intestinales está significativamente disminuida durante el procedimiento de digestión.

Se podría plantear la duda acerca de la importancia de la detección de micobacterias en muestras de heces. En un estudio de 89 pacientes con enteropatía relacionada con SIDA realizado en Lusaka, Zambia, Conlon y cols. observaron que el síntoma de la diarrea crónica no se relacionaba con la presencia de micobacterias en las muestras de heces.⁵⁴ Llegaron a la conclusión de que las micobacterias desempeñan un papel sin importancia en la patogenia de la enteropatía en los pacientes con SIDA. Como alternativa, Chin y cols. observaron que el aislamiento de los microorganismos MAI de muestras de heces es predictivo de enfermedad diseminada.⁴⁴ Se puede aplicar la técnica descrita antes; el hecho de que el procedimiento deba estar disponible en un laboratorio dado debe ser una decisión individual.

Otras muestras "estériles"

Las muestras remitidas para cultivo de bacilos ácido-alcohol resistentes que normalmente son estériles, como líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y otros líquidos corporales, no necesitan ser descontaminadas antes del cultivo. El procesamiento puede comenzar con la centrifugación, como se describe luego y se transfiere una pequeña alícuota del sedimento a un medio de cultivo apropiado. Se pueden agregar directamente muestras de líquidos de bajo volumen a alrededor de 10 mL de caldo 7H9 o 7H11 que se incuban directamente. En general, las muestras de orina pueden procesarse sin descontaminación y centrifugarse, y se utiliza para el cultivo una porción del sedimento, como ya se describió. Se prefiere la primera muestra de la mañana más que una recolección de 24 horas. La práctica de algunos laboratorios es establecer cultivos bacterianos antes de cultivar para micobacterias a fin de determinar si las muestras requieren descontaminación. Además, se pueden agregar 10 o 15 mL de cloruro de calcio al 10% a la muestra de orina hasta que se forma un precipitado para eliminar los factores inhibidores. Luego de la centrifugación, se cultiva una porción del sedimento, como ya se describió. Los tejidos y el material de la biopsia con aguja deben colocarse en una pequeña cantidad de caldo 7H9 o 7H11 como medio de sostén. Según el tamaño y la naturaleza del material obtenido, se coloca la muestra en una pequeña cantidad de caldo con un mortero y una mano de mortero y se transfieren alícuotas de la suspensión a los medios de cultivo apropiados.

No existe casi ninguna indicación para obtener material para el cultivo de micobacterias con un hisopo porque la naturaleza hidrófoba de la pared celular de las bacterias que contiene lípidos inhibe la transferencia de los microorganismos desde el hisopo hasta el medio de cultivo acuoso. Si se recibe un hisopo en el laboratorio, se debe colocar directamente el extremo sobre la superficie del medio de cultivo o en un tubo que contenga unos 5 mL de caldo 7H9 y se lo incubaba durante 4 a 8 semanas. Si hay micobacterias, se las puede hallar formando colonias en las fibras del hisopo en la unión de los medios de cultivo. Como alternativa, el director del laboratorio puede considerar que un hisopo es una muestra inapropiada y rechazarla para el cultivo de micobacterias. Las decisiones de no procesar estas muestras de bajo o ningún rendimiento pueden ahorrar al hospital una cantidad considerable de dinero con el tiempo. Es necesario educar al personal médico acerca del razonamiento de estas decisiones y debe ser

notificado antes de implementar protocolos de rechazos de las muestras.

Procedimientos de laboratorio para el aislamiento y la identificación de las micobacterias

El enfoque clásico de laboratorio del diagnóstico de las infecciones por micobacterias comprende la caracterización fenotípica de las colonias que crecen en el medio de Löwenstein-Jensen. El empleo de una serie de pruebas bioquímicas lleva demasiado tiempo para las aplicaciones actuales. La figura 19-1 es un algoritmo que refleja la práctica del procesamiento de las muestras de esputo en muchos laboratorios. Otras muestras pueden requerir tratamiento alternativo. La recomendación actual es utilizar una combinación de ensayos fenotípicos y moleculares para la identificación rápida de las micobacterias, sobre todo, para la de *M. tuberculosis*.

Los frotis deben prepararse con el material remitido para la tinción ácido-alcohol resistente. La mayoría de los laboratorios utilizan la tinción de auramina O para el examen de selección y el seguimiento con una tinción con base de carbolfucsina (Ziehl-Neelsen o Kinyoun) para la confirmación de los resultados positivos. La mayoría de los laboratorios tratan las muestras de esputo con NALC-NaOH, un procedimiento de descontaminación-digestión para concentrar cualquier célula micobacteriana que pueda estar presente. En la actualidad, se recomienda inocular todas las muestras de esputo tratadas y otras muestras en medios de cultivo en caldo además de los medios de Löwenstein-Jensen o agar de Middlebrook. Las elecciones de los caldos de cultivo incluyen los frascos BACTEC 12A en los laboratorios donde se dispone de un instrumento 460 BACTEC o la inoculación del Septi-Chek® (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) o el sistema de cultivo MGIT® (BD Diagnostic). Si cualquiera de estos cultivos muestra indicios de proliferación, se deben realizar estudios con sondas de ácidos nucleicos tan pronto como la concentración de los microorganismos exceda el umbral de sensibilidad para el ensayo. En los laboratorios que utilizan el sistema BACTEC, se debe inocular un frasco de NAP para descartar *M. tuberculosis*.

La observación de microcolonias en agar de Middlebrook puede servir como guía para saber cuál es la sonda que se debe utilizar: si se observa un patrón de entretejido con formación de cordones, se debe realizar una sonda para *M. tuberculosis*; si las colonias son planas y transparentes, está indicada la sonda para MAI. Metchock y Diem sugieren que si los frotis son 3+ o 4+ y se detecta crecimiento dentro de los 5 días, se debe realizar una sonda para *M. tuberculosis*.²²⁵ Para los frotis 1+ o 2+ que crecen en cultivo después de 7 días, se debe realizar la sonda MAI. Si todas las sondas son negativas y se considera que el aislamiento tiene importancia clínica, se deben efectuar estudios bioquímicos convencionales utilizando las colonias que crecen en el medio de Löwenstein-Jensen si fuera positivo. Se deben realizar estudios de sensibilidad in vitro a los fármacos si fuera necesario.

Al seguir el algoritmo que se muestra en la figura 19-1, puede ser posible la identificación de *M. tuberculosis*, MAI, *M. kansasii* y *M. gordonae* en los casos con frotis positivo en 2 a 3 semanas. Puede ser necesaria otra semana o dos para el aislamiento y la identificación de estas cuatro especies en los casos con frotis negativo. Se requiere otra semana una vez que el cultivo en caldo se vuelve positivo para los resultados de las pruebas de sensibilidad contra los cuatro fármacos de primera línea: isoniazida, ácido *p*-aminosalicílico, etambutol y estrepto-

tomicina. Se necesitarán otras 2 a 4 semanas para identificar las especies de micobacterias distintas de las que se acaba de mencionar, según los resultados de las pruebas bioquímicas, y para determinar los perfiles de los fármacos con el uso de los métodos de crecimiento en agar convencionales.

Preparación de las muestras

La alta concentración de lípidos en la pared celular de la mayoría de las micobacterias las vuelve más resistentes a la destrucción por las soluciones ácidas y alcalinas fuertes que otras bacterias que pueden estar presentes en la muestra. En consecuencia, las muestras que probablemente contengan una flora bacteriana mixta son tratadas con un agente descontaminante para reducir el sobrecrecimiento bacteriano indeseable y licuar el moco. Después del tratamiento con el descontaminante durante un período cuidadosamente controlado, el ácido o el álcali utilizado se neutraliza y la mezcla se centrifuga a alta velocidad para concentrar las micobacterias.

Digestión y descontaminación

Algunas soluciones descontaminantes, como hidróxido de sodio al 6%, son tan fuertes que pueden destruir o dañar gravemente a las micobacterias hasta el punto en que crecen sólo en forma muy lenta o no crecen en absoluto. La reducción de la potencia de la solución para descontaminación ácida o alcalina ha conducido a una mejoría en el aislamiento de las micobacterias por cultivo, pero a menudo al precio del sobrecrecimiento del cultivo por contaminantes. La exposición de las muestras a hidróxido de sodio fuerte, ácido oxálico al 5% u otros agentes debe cronometrarse con cuidado para evitar una lesión excesiva de las paredes de las micobacterias por el agente químico.

El empleo de descontaminantes suaves, como fosfato trisódico solo o combinado con cloruro de benzalconio (Zephiran; Winthrop Laboratories, Nueva York, NY), es popular en algunos laboratorios. Las muestras que contienen gran cantidad de *M. tuberculosis* pueden resistir la acción de estos agentes hasta durante toda la noche y no es necesario un cronometrado cuidadoso de la exposición.⁷⁵ Las muestras tratadas con TSP-Zephiran deben inocularse en un medio de cultivo con base de huevo para neutralizar la inhibición del crecimiento del Zephiran. Si se utilizan medios con base de agar, la neutralización del Zephiran se puede lograr agregando lecitina. En el recuadro 19-1 se muestra el procedimiento de digestión-descontaminación convencional.

En general, se utiliza HCl o NaOH concentrados para neutralizar los agentes descontaminantes. Debido a la potencia de estas soluciones, a veces es difícil lograr un punto final neutro. Una ventaja del procedimiento NALC es que el agregado de un volumen grande de buffer de fosfato hace menos probable los desplazamientos fuertes del pH. El agregado de buffer sirve para "lavar" la muestra, diluye las sustancias tóxicas y reduce la densidad de la muestra de modo que la centrifugación es más eficaz en la sedimentación de los microorganismos.

En el cuadro 19-1 se enumeran otros agentes para descontaminar y concentrar muestras, junto con comentarios acerca de su uso. El micobacteriólogo debe seleccionar los agentes que utilizará en su laboratorio sobre la base de la cantidad y los tipos de muestras recibidas y el tiempo y el personal técnico disponible para procesarlas. Como se menciona en el cuadro 19-1, el ditiotritol es también un agente mucolítico eficaz cuando se lo utiliza con NaOH al 2%. También se ha recomen-

ESPUTO PARA ESTUDIOS DE BACILOS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES

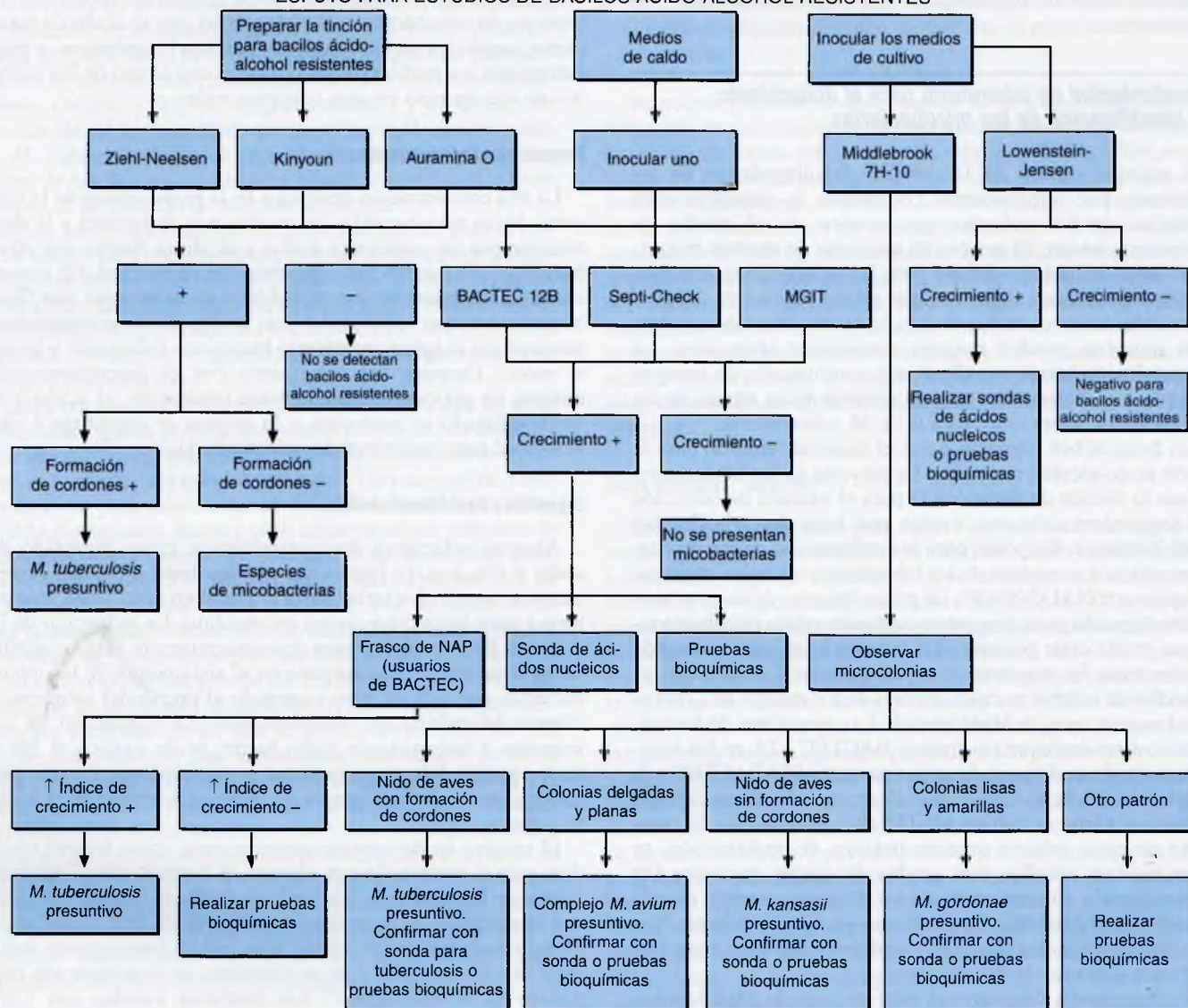


Figura 19-1 Algoritmo que refleja la práctica del procesamiento de las muestras de esputo.

dado el cloruro de cetilpiridio para la descontaminación de las muestras, sobre todo de las enviadas desde sitios remotos de recolección.³²¹ El procedimiento de digestión-descontaminación se describe mejor en el protocolo 19-1.

Ratnam y cols. describieron un procedimiento simplificado con acetilcisteína-alcálina que combina los pasos de contaminación y descontaminación y la inoculación de la muestra en medios de cultivo selectivos (que contienen antibióticos, que se describirán más adelante).²⁷⁸ Se mezclan las muestras con solución de NALC-NaOH en un agitador vorticial y, sin nada de espera ni agregado de buffer ni agua a las muestras digeridas, se centrifuga la muestra a 3 000 g durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante y se suspende el sedimento en 1 a 2 mL de buffer de fosfato (0,067 M, pH 5,3). La concentración de NaOH en la solución puede estar reducida desde el 2% habitual hasta el 1,5% si fuera necesario o factible.

El método modificado elimina dos pasos: el tiempo de descontaminación de 15 a 20 minutos luego de la digestión de las

muestras y el agregado de buffer de fosfato o agua. Según estos autores,²⁷⁸ la máxima destrucción de micobacterias ocurre durante los primeros minutos de exposición al líquido de digestión de los álcalis y se pueden perder hasta 10^4 micobacterias, según la especie. El método modificado elimina la posibilidad de que las muestras goteen desde la tapa o discurran por la superficie externa del tubo cuando se agrega diluyente después de la mezcla en el agitador vorticial y reduce la posibilidad de contaminación cruzada. Por lo tanto, los autores observaron que el método modificado era más simple, más rápido y más seguro que el procedimiento original y también es probable que la menor manipulación reduzca la posibilidad de contaminación cruzada en el procesamiento secuencial de las muestras. La eliminación del paso de digestión inicial no tiene ningún efecto adverso sobre el aislamiento de micobacterias. De hecho, a veces, el agregado de buffer de fosfato o de agua conduce a un aislamiento más bajo, debido a una mayor disolución de la materia particulada en las muestras. La tolerancia a los

Recuadro 19-1 Procedimiento de digestión-descontaminación estándar desarrollado por Kubica y cols. en los Centers for Disease Control and Prevention¹⁹⁰

1. Preparar el digestivo de acetilcisteína-álcali de esta forma: combinar 50 mL de citrato trisódico al 2,94% -3 H₂O (0,1 M) con 50 mL de NaOH al 4%. Agregar a esta solución 0,5 g de *N*-acetil-L-cisteína (NALC) en polvo, inmediatamente antes del uso. El NaOH (que se convierte en una solución al 2% después de mezclar partes iguales con la muestra) sirve como agente descontaminante. En ocasiones, la concentración de NaOH debe aumentarse hasta el 3% (solución original al 6%) cuando el clima es cálido o al tratar muestras provenientes de pacientes con grandes cavidades pulmonares asociadas con contaminación bacteriana persistente. El NALC es un mucolítico sin actividad bactericida que licua el moco al dividir los enlaces disulfuro. Las micobacterias se liberan cuando el moco se licua, lo que las vuelve fáciles de concentrar mediante centrifugación a alta velocidad.
2. Utilizar tubos de centrifuga de plástico de 50 mL con tapas bien ajustadas para el procesamiento de todas las muestras. Agregar la mezcla digestiva de NALC en un volumen igual al de la muestra. En condiciones típicas, se utiliza un volumen de 10 a 15 mL de la muestra. Ajustar la tapa a rosca.
3. Homogeneizar la mezcla con un mezclador vortical durante 15 a 20 segundos o hasta que esté bien mezclada y permitir que sedimente a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos, sacudiendo los tubos periódicamente. Se debe prestar la correcta atención de modo que el tiempo de digestión no exceda 20 minutos, porque las muestras "sobretatadas" conducen a menos cultivos positivos.
4. Después del paso de digestión-descontaminación, agregar buffer fosfato, de pH 6,8 (se prefiere sobre el agua estéril), hasta el anillo de la parte superior en el tubo. Mezclar bien. El buffer fosfato vuelve menos probables los desplazamientos fuertes del pH y sirve también para "lavar" la muestra, diluir y neutralizar las sustancias tóxicas, y reducir la densidad de la muestra de modo que la centrifugación sea más eficaz en la sedimentación de los microorganismos.
5. Concentrar la muestra por centrifugación a 2 000-3 000 g durante 15 a 20 minutos. Se puede utilizar una centrífuga refrigerada a velocidades más altas para aumentar el rendimiento de las micobacterias.
6. Después de la centrifugación, decantar todo el sobrenadante con cuidado en un receptáculo a prueba de salpicaduras que contenga un desinfectante fenólico. Secar la tapa del tubo con una torunda de algodón embebida en fenol al 5%. Agregar una pequeña cantidad de buffer fosfato, pH 6,8 (1 a 2 mL) y volver a suspender el sedimento con una pipeta de Pasteur. Aunque se ha recomendado el agregado de una pequeña cantidad de albúmina sérica en el pasado, en la actualidad se evita porque aumenta las posibilidades de contaminación y de demora en el tiempo de detección.
7. Preparar frotis en portaobjetos limpios para microscopios con la tinción de Ziehl-Neelsen (o Kinyoun) o de fluorocromo. Utilizar un palillo aplicador estéril o un ansa bacteriológica de 3 mm de diámetro calentada y extender una porción del sedimento sobre un área de 1 × 2 cm. Si la cantidad de sedimento es muy pequeña, diferir los frotis hasta después del paso siguiente (agregado de albúmina). Agregar 1 mL de albúmina bovina estéril al 0,2%.
8. Transferir una pequeña cantidad (0,2 a 0,4 mL) del concentrado a un medio de cultivo apropiado. La inoculación de una dilución 1 en 10 del concentrado en agua estéril hasta un segundo medio de cultivo también se realiza en algunos laboratorios. En general se utilizan las porciones inclinadas con tinción de Löwenstein-Jensen y las placas de agar de Middlebrook 7H10 o 7H11.

álcalis no fue una característica constante entre las especies de micobacterias y las cepas evaluadas, y las especies de crecimiento rápido fueron las más sensibles a un pH alto. Al reducir o eliminar el tiempo estándar de tratamiento de 15 a 20 minutos o al disminuir la concentración de NaOH en la solución de

digestión del 2% habitual hasta 1,5% o 1%, se pueden superar fácilmente los efectos adversos.

A causa de la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos, pueden requerirse pruebas rápidas de laboratorio con el propósito de determinar el perfil de sensibi-

Cuadro 19-1 Agentes de uso frecuente para la descontaminación y concentración de muestras

AGENTE	COMENTARIOS
<i>N</i> -acetil-L-cisteína más NaOH al 2%	Solución de descontaminación suave con agente mucolítico NALC para liberar las micobacterias atrapadas en el moco. Limitar la exposición a NaOH a 15 minutos
Ditiotreitol más NaOH al 2% ^a	Agente mucolítico muy eficaz utilizado con NaOH al 2%. El nombre comercial del ditiotreitol es Sputolysin®. El reactivo es más caro que NALC. Limitar la exposición a NaOH a 15 minutos
Fosfato trisódico, 13% más cloruro de benzalconio (Zephiran®)	Preferido por los laboratorios que no pueden controlar con cuidado el tiempo de exposición a la solución de descontaminación. El cloruro de benzalconio debe neutralizarse con lecitina y no inocularse en un medio de cultivo con base de huevo
NaOH, 4%	Solución de descontaminación y concentración tradicional. El tiempo de exposición debe controlarse con cuidado hasta no más de 15 minutos. El NaOH al 4% logra acción mucolítica para promover la concentración por centrifugación
Fosfato trisódico, 13%	Puede utilizarse para la descontaminación de muestras cuando el tiempo de exposición puede controlarse por completo. No es tan eficaz como la mezcla TSP-cloruro de benzalconio
Ácido oxálico, 5%	Más útil en el procesamiento de muestras que contienen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como contaminante
Cloruro de cetilpiridio, 1%, más NaCl al 2% ^b	Eficaz como solución de descontaminación para muestras de esputo enviadas de centros clínicos ambulatorios. Los bacilos tuberculosos han sobrevivido el tránsito de 8 días sin una pérdida importante

^a Véase Shah and Dye.³¹³

^b Véase Smithwick et al.³²¹

lidad a los antibióticos para guiar el tratamiento temprano.⁹⁸ Muchas de las pruebas nuevas para identificar los perfiles de resistencia a los fármacos se basan sobre los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos. En consecuencia, puede ser necesario almacenar muestras o concentrados digeridos para efectuar pruebas futuras en los lotes o para el envío hasta un laboratorio de referencia alejado. Puede ser aconsejable tratar estas muestras para que no sean infecciosas en las primeras etapas del procesamiento a fin de reducir el peligro biológico para el personal del laboratorio. Williams y cols. observaron que la fijación con etanol de los sedimentos de esputo que contenían *M. tuberculosis* servía para volver a las bacterias no viables, mientras conservaba todavía la integridad del DNA genómico en un estado apropiado para la evaluación mediante técnicas de PCR.³⁸⁷ En sus estudios, diluyeron 0,25 mL de sedimentos de esputo con 0,583 mL de etanol al 100% para llevar la concentración final del etanol hasta el 70%. Estos autores recomiendan el almacenaje de las muestras tratadas con etanol a 4 °C para diferir las pruebas de PCR. Zwadyk y cols. revisaron varios métodos para hacer que las muestras sean seguras para otras pruebas⁴¹¹ y explicaron los efectos destructivos y la preservación del DNA genómico de las micobacterias en las muestras después del tratamiento con diversos desinfectantes. También introdujeron la técnica de calentar las muestras a 100 °C durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo o en una estufa con circulación forzada de aire, tanto con micobacterias muertas como lisadas, lo que libera fragmentos cortos de DNA apropiados para la amplificación.

Centrifugación

Rickman y Moyer han llamado la atención sobre la importancia de controlar con cuidado la fuerza centrífuga en el aislamiento de las micobacterias de las muestras clínicas, sobre todo en la correlación de los frotis positivos con los cultivos positivos.²⁸⁴ El centro de su estudio fue comprender las características físicas singulares que confieren a las micobacterias el alto contenido de lípidos de la pared celular (de hasta un 30% del peso seco). El lípido tiene el efecto de disminuir mucho la densidad de los microorganismos. Para que la sedimentación del microorganismo sea máxima durante la centrifugación de la muestra, la densidad del líquido de suspensión debe ser mínima y la fuerza centrífuga que se aplica a la muestra debe ser la más alta posible. Se observó una mejoría en el aislamiento de las micobacterias por cultivo a medida que se aumentó la fuerza centrífuga relativa (FCR) desde 1 260 hasta 3 000 g (cuadro 19-2).²⁸⁴ Cuando se aumentó la FCR hasta 3 800 g, se observó un aumento de dos veces en la correlación de los frotis positivos con los cultivos positivos del 40% al 82%, o un aumento mayor de tres veces de la correlación cuando la FCR fue sólo de 1 260 g.

La evaluación ulterior para el aislamiento de micobacterias de las muestras de esputo sembradas con concentraciones conocidas de microorganismos luego de la centrifugación confirmó que la tasa de aislamiento aumenta con el tiempo y la velocidad de centrifugación.²⁷⁷ Sin embargo, las tasas de aislamiento en estas muestras experimentales no fueron significativamente más bajas cuando se utilizó una FCR de 2 074 g durante 20 minutos (67-71%) en comparación con las tasas de aislamiento en las FCR de 3 005 g y 3 895 g durante 15 minutos (76-80%). La sensibilidad de los frotis ácido-alcohol resistentes para 25 000 muestras procesadas con una FCR de 3 800 g durante 20 minutos fue del 71%. Sin embargo, la sensibilidad siguió siendo del 69%, según lo determinaron otras 30 000

Cuadro 19-2 Efecto del aumento de la fuerza centrífuga sobre los frotis y cultivos positivos para micobacterias

	FUERZA CENTRÍFUGA RELATIVA (g)		
	1 260	3 000	3 800
Frotis positivos	1,8%	4,5%	9,6%
Cultivos positivos	7,1%	11,2%	11,6%
Correlación de frotis/cultivos positivos	25%	40%	82%

Adaptado de la referencia²⁸⁴.

muestras procesadas en forma similar, pero con una FCR de 2 000 g. Los autores arribaron a la conclusión de que las tasas reales de aislamiento de micobacterias viables de las muestras clínicas también dependen del método de tratamiento y de las especies individuales y las diferencias de las cepas de micobacterias para la tolerancia a los álcalis. Por lo tanto, aunque la centrifugación a una FCR de 3 000 g durante 15 minutos puede ser óptima para el aislamiento de micobacterias en las muestras clínicas, las posibilidades de aislamiento no estarán sustancialmente comprometidas en los laboratorios donde existan centrifugas de menor costo que alcanzan sólo un máximo de 2 074 g, si el tiempo se aumenta hasta 20 minutos. Como lo señalaron Sommers y Good, con las fuerzas de centrifugación producidas en una FCR de 3 000 g o más altas, los tubos centrifugos de vidrio o plástico pueden romperse o colapsar y deben colocarse en recipientes sellados.³²⁴ Además, las velocidades elevadas generan un calor considerable y pueden requerirse centrifugas refrigeradas cuando las FCR exceden los 3 000 g.

Muestras de médula ósea y muestras de biopsia

Mycobacterium tuberculosis es un parásito intracelular facultativo que puede estar presente en macrófagos de médula ósea, hígado, sangre y ganglios linfáticos de pacientes con infecciones diseminadas. Como las biopsias tisulares no suelen estar contaminadas por otros microorganismos, pueden ser homogeneizadas e inoculadas directamente en los medios de cultivo sin utilizar una solución descontaminante. Es mejor cultivar los trayectos fistulosos u otras lesiones cutáneas sospechosas de albergar micobacterias obteniendo una pequeña porción de tejido infectado o secreción. También se están utilizando biopsias con aguja fina con mayor frecuencia para obtener material para el cultivo tisular de distintas lesiones subcutáneas y viscerales profundas. En un estudio de 390 casos en los cuales se obtuvieron muestras de biopsia con aguja para diagnosticar una sospecha de linfadenitis tuberculosa, la tasa global de positividad de los frotis fue del 23,6% y la positividad de los cultivos fue del 35%.²⁷³ Fue más probable que las lesiones caseificadas produzcan cultivos positivos (40%) que las no caseificadas (9%).

Otras muestras líquidas

Las muestras líquidas (p. ej., LCR, líquido pleural u otros) deben centrifugarse, teñirse para bacilos ácido-alcohol resistentes e inocularse directamente en medios de cultivo líquidos

o sólidos. Las muestras de líquido pleural son diluidas con buffer en algunos laboratorios para disminuir la densidad, lo que mejora así la sedimentación de las micobacterias. Las muestras líquidas con bajo contenido en proteínas, como LCR, pueden filtrarse a través de una membrana de nitrato de celulosa de 0.22 μm . La membrana puede cortarse en pedazos, los cuales se colocan luego en diferentes tipos de medios de cultivo sólidos y líquidos.

Las centrifugas utilizadas para el procesamiento de muestras que potencialmente contienen bacilos ácido-alcohol resistentes deben estar equipadas con recipientes para centrifuga de 50 o 250 mL con tapas que no contengan aerosoles y que puedan adaptarse para sostener tubos de centrifuga de 50 mL. Estas centrifugas no deben ventilarse hacia el exterior por el peligro del flujo aéreo invertido a través de las tuberías durante las tormentas de viento. Se deben tomar precauciones para evitar la rotura espontánea de las membranas de tensión superficial del líquido cuando se inoculan cultivos en caldo o muestras líquidas. Por ejemplo, si se rompe una de estas membranas en un ansa de inoculación, se pueden crear gotitas de aerosol que persisten en el aire durante períodos prolongados. Todas estas transferencias deben realizarse en una campana de seguridad biológica.

Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes

Las paredes celulares de las micobacterias, debido a su alto contenido en lípidos, tienen la capacidad singular de unirse al colorante fucsina de modo que no sea eliminado (desteñido) por alcohol ácido. Esta reacción de tinción ácido-alcohol resistente de las micobacterias, junto con su tamaño y forma característicos, es un auxiliar útil en la detección temprana de infección y en la monitorización del tratamiento para la enfermedad por micobacterias. La presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo, combinada con el antecedente de tos, pérdida de peso y pruebas en la radiografía de tórax de un infiltrado pulmonar, sigue siendo evidencia presuntiva de tuberculosis activa.

Se ha calculado que cuando se utilizan técnicas de concentración convencionales, es necesario detectar alrededor de 10 000 bacilos ácido-alcohol resistentes por mililitro de esputo con el microscopio óptico.¹³⁴ Los pacientes que presentan una enfermedad extensa eliminan gran cantidad de micobacterias, con una buena correlación entre un frotis positivo y un cultivo positivo. Muchos pacientes tienen una enfermedad mínima o menos avanzada, y la correlación de los extendidos positivos con los cultivos positivos en este grupo puede ser sólo del 25-40%.

Los frotis ácido-alcohol resistentes también son útiles para seguir la respuesta al tratamiento. Una vez iniciada la administración de antibióticos, los cultivos se vuelven negativos antes de que lo hagan los frotis, lo que sugiere que los microorganismos no son capaces de replicarse pero pueden unirse a la tinción. Con el tratamiento continuo, se destruyen más microorganismos y se eliminan menos, de modo que la evaluación de la cantidad de microorganismos en el esputo durante el tratamiento puede proporcionar una medida objetiva incipiente de la respuesta. Si la cantidad de microorganismos no disminuyera después de iniciado el tratamiento, se debe considerar la posibilidad de resistencia a los fármacos, y se deben obtener cultivos y estudios de sensibilidad adicionales.

Se utilizan comúnmente dos tipos de tinciones ácido-alcohol resistentes (cuadro 19-3):

1. Tinciones de carbolfucsina: una mezcla de fucsina con fenol (ácido carbólico)
 - a. Ziehl-Neelsen (tinción caliente)
 - b. Kinyoun (tinción fría)
2. Tinción con fluorocromos: auramina O sola o con el agregado de un segundo fluorocromo, la rodamina.

Los colorantes de carbolfucsina y auramina O utilizados en estas técnicas funcionan uniéndose a ácidos micólicos en la pared celular de las micobacterias. Los frotis teñidos con la técnica de carbolfucsina deben observarse con un objetivo de inmersión en aceite. Esto limita el área total del portaobjetos que se puede observar en una unidad dada de tiempo. A diferencia de las tinciones de carbolfucsina, los frotis teñidos por el procedimiento de auramina pueden observarse con un objetivo 25 $\times$, lo que aumenta el campo de visión y reduce el tiempo necesario para explorar un área dada del portaobjetos. Los frotis teñidos con fluorocromo necesitan una fuente luminosa intensa: un quemador de vapor de mercurio de 1 200 W o una luz azul intensa con un filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Las bacterias teñidas con fluorocromos son amarillo brillantes (rodamina) o rojo anaranjadas (rodamina) contra un fondo oscuro, lo que permite recorrer el portaobjetos bajo una ampliación menor sin perder sensibilidad. El contraste pronunciado entre las micobacterias de color brillante y el fondo oscuro ofrece una ventaja definida al explorar el portaobjetos (véase lámina en color 19-1A). Las modificaciones de la tinción con el fluorocromo auramina incluyen el agregado de rodamina, lo cual da un aspecto dorado a las células o el uso de naranja de acridina como contratinción, lo que conduce a un fondo rojo a anaranjado. Las reacciones positivas falsas pueden deberse a la fluorescencia de tejido inespecífico o restos celulares que pueden ser confundidos con bacilos con el objetivo 25 $\times$. Se debe utilizar el objetivo 40 $\times$ para confirmar cualquier forma sospechosa. Las células micobacterianas muertas también se tiñen con rodamina y auramina, lo que conduce a una situación de cultivo negativo y frotis positivo alrededor del 10% de las veces. También es importante recordar esta característica cuando se utilizan frotis con tinción ácido-alcohol resistente para evaluar la eficacia del tratamiento —la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en los frotis teñidos con fluorocromo no siempre indica un fracaso terapéutico— y también deben realizarse tinciones de carbolfucsina. Los frotis teñidos con fluorocromo deben teñirse luego con carbolfucsina; no se aplica la situación opuesta.

Con la carbolfucsina, la tinción para bacterias ácido-alcohol resistentes (AFB) brilla de rojo contra un fondo azul o verde, según la contratinción utilizada (véase lámina en color 19-1B). Aunque en teoría las técnicas de Ziehl-Neelsen y de Kinyoun son las mismas, según algunas experiencias la primera es más sensible para detectar microorganismos que tienen una tinción leve, sobre todo ciertas micobacterias de crecimiento rápido. La propiedad de ácido-alcohol resistencia se debe a la cápsula gruesa y cerosa que rodea a las células de las micobacterias. Para que la carbolfucsina acuosa penetre a través de la cera, la cápsula debe estar “reblandecida”. Esto se hace con calor en el procedimiento de Ziehl-Neelsen, en forma muy similar a la fusión de una película de parafina por los rayos calientes del sol. El colorante que penetra la cápsula reblandecida por el calor se une a la pared celular; cuando las células bacterianas se enfrían luego de eliminado el calor, la cera se endurece otra vez, lo que protege al colorante unido de la acción decolorante del alcohol ácido (“ácido-alcohol resistente”). En la técnica de

Cuadro 19-3 Procedimiento para la tinción ácido-alcohol-resistente		
PROCEDIMIENTO DE ZIEHL-NEELSEN	PROCEDIMIENTO DE FRÍO DE KINYOUN	PROCEDIMIENTO DEL FLUORURO DE AURAMINA
Carbolfucsina: disolver 3 g de fucsina básica en 10 mL de etanol al 90–95%. Agregar 90 mL de solución acuosa al 5% de fenol	Carbolfucsina: disolver 4 g de fucsina básica en 20 mL de etanol al 90–95% y luego agregar 100 mL de una solución acuosa al 9% de fenol (9 g de fenol disueltos en 100 mL de agua destilada)	Auramina fenólica: disolver 0,1 g de auramina O en 10 mL de etanol al 90–95% y luego agregar a una solución de 3 g de fenol en 87 mL de agua destilada. Almacenar la tinción en un frasco marrón
Alcohol ácido: agregar <i>lentamente</i> 3 mL de HCl concentrado a 97 mL de etanol al 90–95%, en este orden. ¡La solución puede calentarse!	Alcohol ácido: agregar <i>lentamente</i> 3 mL de HCl concentrado a 97 mL de etanol al 90–95% en este orden. ¡La solución puede calentarse!	Alcohol ácido: agregar 0,5 mL de HCl concentrado a 100 mL de alcohol al 79%
Contratinción de azul de metileno: disolver 0,3 g de cloruro de azul de metileno en 100 mL de agua destilada	Contratinción con azul de metileno: disolver 0,3 g de cloruro de azul de metileno en 100 mL de agua destilada	Permanganato de potasio: disolver 0,5 g de permanganato de potasio en 100 mL de agua destilada
Procedimiento Cubrir un frotis desecado y fijado con calor con un rectángulo pequeño (2 × 3 cm) de papel de filtro Aplicar 5 a 7 gotas de tinción de carbolfucsina al papel de filtro cuidadosamente humedecido Calentar el portaobjetos cubierto con la tinción hasta el vapor, pero no permitir que se seque El calentamiento puede realizarse mediante un mechero de gas o sobre una cubeta de tinción (eléctrica) Retirar el papel con pinzas, enjuagar el portaobjetos con agua y escurrir Quitar el color con alcohol ácido hasta que no aparezca más tinción en el lavado (2 min) Contrateñir con azul de metileno (1–2 min) Enjuagar, escurrir y secar con aire (1–2 min) Examinar con objetivo de inmersión en aceite 100× Las micobacterias se tiñen de rojo y el fondo de azul claro	Procedimiento Cubrir un frotis desecado y fijado con calor con un rectángulo pequeño (2 × 3 cm) de papel de filtro Aplicar 5–7 gotas de tinción de carbolfucsina para humedecer minuciosamente el papel de filtro. Permitir que se deposite durante 5 min Agregar más tinción si el papel se seca. ¡No calentar al vapor! Retirar el papel con pinzas, enjuagar el portaobjetos con agua y escurrir Quitar el color con alcohol ácido hasta que ya no aparezca tinción en el lavado (2 min) Contrateñir con azul de metileno (1–2 min) Enjuagar, escurrir y secar al aire (1–2 min) Examinar con objetivo de inmersión en aceite 1003. Las micobacterias se tiñen de rojo y el fondo de azul claro	Procedimiento Cubrir un frotis desecado y fijado con calor con carbol auramina y permitir que se tiña durante 15 min. No calentar ni cubrir con papel de filtro Enjuagar con agua y escurrir Quitar el color con alcohol ácido (2 min) Enjuagar con agua y escurrir Irrigar el frotis con permanganato de potasio como mínimo durante 2 y no más de 4 min Enjuagar con agua corriente. Escurrir Examinar con el objetivo 253 utilizando un mechero de vapor de mercurio y un filtro BG-12 o una luz azul fuerte Las micobacterias se tiñen de amarillo-anaranjado contra un fondo oscuro

Kinyoun o de “frío”, se utiliza un agente activo superficialmente para aumentar la permeabilidad del colorante a través de la cápsula cerosa; sin embargo, la nueva formación de la cápsula cerosa puede ser incompleta, lo que permite extraer la mayor parte del colorante unido, si no todo, mediante el alcohol ácido decolorante. Sin duda, las células micobacterianas provistas de una cápsula cerosa delgada serán más sensibles a la decoloración, como puede suceder con muchas cepas de crecimiento rápido. En estas circunstancias, el uso de un decolorante menos estricto, como HCl al 1% (tinción “ácido-alcohol resistente parcial”) puede revelar la propiedad innata de la ácido-alcohol resistencia. El procedimiento basado sobre carbolfucsina se describe en el protocolo 19-2.

Aunque algunos laboratorios pueden estar en favor del método de tinción con carbolfucsina mientras que otros lo están a favor del de la fluorescencia, la especificidad de la detección de las micobacterias con ambos métodos es aproximadamente la misma, con la posible excepción de la tinción de las bacterias de crecimiento rápido. En un estudio de 15 cepas de *M. fortuitum*, cinco de ellas no se tiñeron con auramina, pero las 15 se tiñeron con carbolfucsina.¹⁶³ Uribe-Botero y cols., que utiliza-

ron la tinción de auramina-rodamina de Truant de los aspirados y las biopsias de médula ósea con procesamiento de rutina, describen un éxito considerable en la detección de las micobacterias con este método.³⁵⁷ Estudiaron 51 muestras de médula ósea de 47 pacientes HIV positivos y detectaron micobacterias en el 72%. Si la tinción fluorescente era positiva, el valor predictivo positivo para el cultivo de micobacterias era del 87%. McCarter y Robinson estudiaron 782 frotis primarios de esputo evaluados a ciegas mediante el método de la rodamina-auramina tanto a temperatura ambiente como a 37 °C y observaron que la preparación teñida a temperatura ambiente detectaba sólo el 85,7% de los frotis positivos; el 43,3% de los frotis tenían más bacilos ácido-alcohol resistentes en los teñidos a 37 °C, en comparación sólo con un 13,3% más de bacilos ácido-alcohol resistentes en los teñidos a temperatura ambiente.²¹⁹ Estos autores arribaron a la conclusión de que la tinción a 37 °C con este método aumenta la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes. Independientemente de que los frotis se elaboraran a partir de la centrifugación o de la concentración con NALC-NaOH tradicional, Woods y cols. no observaron ningún aumento en la detección de bacilos ácido-alcohol resis-

tentes en 844 frotis de esputo citocentrifugados y teñidos con auramina O cuando se compararon con el método de concentración NALC-NaOH tradicional.³⁹⁸

La tinción con fluorocromo ofrece la ventaja de una mayor sensibilidad en comparación con el método de la carbolfucsina, dado que se puede rastrear un área significativamente mayor por unidad de tiempo con la tinción de fluorocromo de auramina. Algunos investigadores utilizan el método de fluorocromo a los fines del barrido y luego confirman sus hallazgos volviendo a examinar la preparación después de desteñir y volver a teñir con el método de la carbolfucsina. Una vez que el personal del laboratorio se ha familiarizado con el método de fluorocromo de auramina, la mayoría los prefiere sobre el procedimiento de la carbolfucsina. La introducción de iluminadores de luz azul de relativamente bajo costo ha hecho que la microscopía de fluorescencia se encuentre disponible para los laboratorios clínicos donde se ofrece la detección y el aislamiento de las micobacterias como servicio.²⁶⁷ En los laboratorios que no puedan adquirir iluminadores costosos, el uso del adaptador UV ParaLens (Becton Dickinson, Sparks, MD), un epiiluminador liviano, manual y económico es una alternativa. Patterson y cols. observaron una sensibilidad y una especificidad comparables en la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes fluorescentes utilizando el adaptador UV ParaLens cuando se compararon con los frotis teñidos con Kinyoun.²⁵³ La implementación de este adaptador ofrece aplicaciones en el examen de preparados de muestras para la detección de otros microorganismos, como *Giardia* y *Pneumocystis*, que han sido teñidos con reactivos de fluoresceína.

Cabe señalar que ni la tinción de auramina ni la de fluorocromo de auramina-rodamina son técnicas antígeno-anticuerpo fluorescentes; más bien, cada una de ellas es una unión fisicoquímica directa de la tinción con la pared celular rica en ácido micólico. Se describió el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia para ayudar en la identificación de distintas especies de micobacterias, pero no se los utiliza comúnmente ni se los encuentra en el comercio.

En el cuadro 19-4 se presentan las recomendaciones de la American Lung Association para el informe de micobacterias observadas en los frotis con tinción ácido-alcohol resistente. Estas recomendaciones son seguidas por muchos laboratorios para dejar constancia de las observaciones entre los técnicos en un laboratorio dado y unificar los informes de un laboratorio a otro. En los protocolos 19-2 y 19-3 se resumen las técnicas basadas sobre carbolfucsina y fluorescencia para la tinción de las micobacterias.

Cultivo de muestras para el aislamiento de micobacterias

Medios de cultivo

El aislamiento de micobacterias de los medios de cultivo en agar fue bajo cuando se lograron los primeros intentos ya avanzado el siglo XIX. A través de la experimentación se observó que un medio de cultivo que contenía huevos enteros, harina de papas, glicerol y sales, solidificado por el calentamiento a 85-90 °C durante 30-45 minutos era eficaz para el aislamiento de *M. tuberculosis*. El proceso de solidificación del medio que contiene proteínas por acción del calor se conoce como espesamiento. Un medio de cultivo espesado está más sometido a licuefacción por los efectos de las enzimas proteolíticas producidas por las bacterias contaminantes que un medio solidificado por el agregado de agar. Sin embargo, pronto se descubrió

Cuadro 19-4 Método para comunicar la cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes observados en los frotis teñidos^a

CANTIDAD DE BACILOS OBSERVADOS	INFORME DEL MÉTODO DE LOS CDC	
0	Negativo	—
1-2/300 campos	Número observado ^b	±
1-9/100 campos	Promedio número/100 campos	1+
1-9/10 campos	Promedio número/10 campos	2+
1-9/campo	Promedio número/campo	3+
Más de 9/campo	Más de 9/campo	4+

^a Se acepta un examen de 800× a 1000×. La amplificación de menos de 800× debe establecerse con claridad. Si un microscopista utiliza un procedimiento constante para el examen de los frotis, para el médico las comparaciones relativas de múltiples muestras deben ser fáciles, independientemente de la amplificación utilizada. Para igualar la cantidad de bacilos observados a menos de 800× con los observados con un objetivo de inmersión en aceite, adaptar los recuentos como sigue: para amplificaciones de alrededor de 650×, dividir el recuento por 2; cerca de 450×, dividir por 4; cerca de 250×, dividir por 10; por ejemplo, si se observaron 8 bacilos por 10 campos a 450×, el recuento en 1 000× sería equivalente a aproximadamente 2/10 campos (8 ÷ 4).

^b Los recuentos de menos de 3/3 000 campos a 800× a 1 000× no se consideran positivos; se debe procesar otra muestra (o la repetición del frotis de la misma muestra) si se encuentra disponible.

Adaptado de la American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis 1981;123: 343-358.

que el uso de colorantes de anilina, como verde malaquita o violeta de genciana, en el medio espesado ayudaba a controlar a las bacterias contaminantes. La concentración del colorante debe controlarse con cuidado; si la concentración es demasiado alta, se puede inhibir también el crecimiento de las micobacterias junto con las bacterias contaminantes. El verde malaquita es el colorante incorporado con mayor frecuencia en medios de cultivo no selectivos, en concentraciones que varían entre 0,0025 g/100 mL y 0,052 g/100 mL (cuadro 19-5).

Medios de cultivo no selectivos para el aislamiento de micobacterias

En el cuadro 19-5 se mencionan varios de los medios de cultivo con base de huevo para el aislamiento de micobacterias. El medio de Löwenstein-Jensen (LJ) es el más utilizado en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico; es menos inhibidor del crecimiento de las micobacterias que el medio de Petragani, el cual se utiliza sobre todo para aislar micobacterias de muestras muy contaminadas con bacterias. Por el contrario, el medio de la American Thoracic Society (ATS), que sólo contiene 0,02 g/100 mL de verde malaquita, es menos inhibidor para el crecimiento de las micobacterias y se recomienda para muestras que suelen ser estériles, como LCR, líquido pleural y biopsias tisulares.

Como el medio de LJ es menos sensible en el aislamiento de las micobacterias de las muestras clínicas que los medios de cultivo en caldo y el medio de agar Middlebrook 7H10, y como la detección del crecimiento se difiere cuando es positiva, se ha suspendido su utilización en muchos laboratorios. El uso de los medios de cultivo en caldo seguido de la identificación molecular a menudo establece la identificación del microorganismo antes de que sea visible el crecimiento en el agar inclinado del medio de LJ. Los estudios cromogénicos y las pruebas bioquí-

Cuadro 19-5 Medios de aislamiento no selectivos para micobacterias

MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR	MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR
Löwenstein-Jensen	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, harina de patata	Verde malaquita, 0.025 g/100 mL	Middlebrook 7H10	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, dextrosa	Verde malaquita, 0.0025 g/100 mL
Petragnani	Huevos enteros coagulados, yema de huevo, leche entera, patata, harina de patata, glicerol	Verde malaquita, 0.052 g/100 mL	Middlebrook 7H11	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, hidrolizado de caseína al 0,1%	Verde malaquita, 0.0025 g/100 mL
Medio de la American Thoracic Society	Yemas de huevo frescos coagulados, harina de patata, glicerol	Verde malaquita, 0.02 g/100 mL			

micas son más precisos cuando se realizan en subcultivos del medio de LJ. Por lo tanto, los cultivos de caldo positivos son transferidos al medio de LJ cuando pueden ser necesarias las pruebas bioquímicas.

Medios de Cohen y de Middlebrook

Durante la década de 1950, Cohen y Middlebrook crearon diversos medios de cultivo definidos para uso en investigación y en laboratorios clínicos. Estos medios se prepararon a partir de sales y sustancias químicas orgánicas definidas; algunos contenían agar, pero se observó que todos requerían el agregado de albúmina para el crecimiento óptimo de las micobacterias. Los medios de Middlebrook que contienen agar son transparentes y permiten la detección del crecimiento luego de 10 a 12 días, en lugar de los 18 a 24 días de incubación necesarios con otros medios. Esto se debe en parte a la inclusión de biotina y catalasa para estimular el aislamiento de los bacilos dañados en las muestras clínicas. También se incorpora albúmina para que se una a las cantidades tóxicas de oleato y otros compuestos que podrían ser liberados de la hidrólisis espontánea del Tween 80. La albúmina no parece ser metabolizada por los bacilos.³⁷⁴

En la actualidad no se utilizan muchos de los primeros medios de cultivo de Cohen y Middlebrook. Sin embargo, 7H9 es un medio líquido popular y tanto el medio de agar 7H10 como 7H11 se utilizan ampliamente para el aislamiento y las pruebas de sensibilidad.³⁹⁶ Se debe incorporar antibióticos en el medio inmediatamente antes de que se solidifique para reducir la pérdida de actividad que se sabe que ocurre con ciertos fármacos durante el largo período de calentamiento necesario para preparar los medios espesados con base de huevo. Esta aplicación se explicará con detalles más adelante en este capítulo. El medio 7H11 difiere del 7H10 sólo en que contiene hidrolizado de caseína al 0,1%, un aditivo que mejora la velocidad y la cantidad del crecimiento de las micobacterias resistentes a la isoniazida (INH).⁵² Ambos contienen verde malaquita, pero un décimo de la cantidad de lo que suele utilizarse en los medios con base de huevo, lo que explica en parte la mayor incidencia de contaminación.

Otra ventaja del uso del agar de Middlebrook es que los micobacteriólogos experimentados a menudo pueden hacer una identificación presuntiva de *M. tuberculosis* y otros grupos

de micobacterias dentro de los 10 días al examinar las microcolonias tempranas en agar de Middlebrook y observar algunas características morfológicas bien definidas.²⁹⁶ En la lámina en color 19-1C (*M. tuberculosis*) y la lámina en color 19-2A y 2B (complejo MAI) se muestran microfotografías de microcolonias representativas.

Aunque esencialmente todos los medios de cultivo arrojan un mayor crecimiento y colonias más grandes de micobacterias cuando son incubados en CO₂ al 5-10%, los medios de Middlebrook requieren en forma absoluta la incubación con CO₂ para un rendimiento correcto. La exposición de 7H10 y 7H11 a una luz fuerte o el almacenamiento de los medios a 4 °C durante más de 4 semanas puede conducir al deterioro y la liberación de formaldehído, una sustancia química muy inhibidora de las micobacterias.²³¹

Medios selectivos

Se utilizan medios de cultivo que contienen antibióticos para suprimir la contaminación bacteriana y micótica. Aunque se sabe que algunos antibióticos reducen la contaminación, también pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias. Por lo tanto, se debe controlar con cuidado el tiempo de exposición. El uso de medios selectivos puede conducir a un aislamiento muy mejorado de micobacterias. En el cuadro 19-6 se enumeran los nombres y los componentes de varios medios selectivos.

En la actualidad, se utiliza comúnmente el medio selectivo descrito por Gruft, que consiste en el medio de Löwenstein-Jensen con penicilina, ácido nalidíxico y RNA.¹¹⁷ Petran describió luego un medio selectivo que contiene cicloheximida, lincomicina y ácido nalidíxico para controlar los contaminantes micóticos y bacterianos.²⁵⁹ Al variar las concentraciones de estos agentes, el medio se puede preparar con Löwenstein-Jensen o con base 7H10.

El medio 7H11 selectivo es una modificación de un medio de agar-ácido oleico descrito por primera vez por Mitchison.²³² El medio estaba diseñado en su origen para utilizarlo con muestras de esputo sin el uso de un agente descontaminante. El medio de Mitchison contiene carbenicilina, polymixina, trimetoprim lactato y anfotericina B. McClatchy sugirió reducir la concentración de carbenicilina desde 100 µg/mL hasta 50 µg/mL y utilizar el medio 7H11 en lugar de agar-ácido olei-

Cuadro 19-6 Medios selectivos para el aislamiento de micobacterias

MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR	MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR
Modificación de Gruft del medio de Löwenstein-Jensen	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, harina de patata, RNA, 5 mg/100 mL	Verde malaquita, 0,025 g/100 mL Penicilina, 50 U/mL Ácido nalidíxico, 35 mg/mL	Middlebrook 7H10	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa	Verde malaquita, 0,0025g/100 mL Cicloheximida, 360 µg/mL Lincomicina, 2 µg/mL Ácido nalidíxico, 20 µg/mL
Lowenstein-Jensen	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, harina de patata	Verde malaquita, 0,025 g/100 mL Cicloheximida, 400 µg/mL Lincomicina, 2 µg/mL Ácido nalidíxico, 35 µg/mL	Selectivo 7H11 (medio de Mitchison)	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa, hidrolizado de caseína	Carbenicilina, 50 µg/mL Anfotericina B, 10 µg/mL Polimixina B, 200 U/mL Lactato de trimetoprim, 20 µg/mL

co.²²⁰ Este autor denominó a esta modificación 7H11 selectivo o S7H11. Con el uso del medio S7H11 más Löwenstein-Jensen y 7H11 se mejora definitivamente el aislamiento de micobacterias, sobre todo cuando se utiliza el medio S7H11 con el procedimiento de descontaminación de NALC-NaOH al 1%.²²⁰

Después de esta comunicación, un estudio de 3 años de duración que comparó el medio S7H10 con muestras no descontaminadas ha mostrado significativamente menos contaminación en las placas de S7H10 con muestras homogeneizadas que en el medio 7H10 con descontaminación, utilizando NaOH al 2% con NALC. Además, el medio S7H10 aisló un 18% más de cultivos positivos, habitualmente con más colonias por cultivo y con menos contaminación que los cultivos inoculados en 7H10 después de una descontaminación con NALC-NaOH al 2%. A diferencia de la descontaminación en el informe de McClatchy, la carbenicilina se mantuvo en 100 µg/mL en lugar de 50 µg/mL. Las muestras inoculadas directamente en placas de 7H10 fueron homogeneizadas luego del agregado de cantidades iguales de NALC en citrato de sodio 0,1 M a un pH de 8,1 y se las dejó asentar durante 15 minutos antes de la centrifugación. La inoculación de muestras concentradas, pero no descontaminadas puede predisponer al aislamiento de micobacterias parcialmente dañadas o con requerimientos especiales de cultivo, con preservación del daño adicional por la exposición a NaOH. Aunque mediante las muestras no descontaminadas en S7H10 se aislaron más especies de micobacterias que los medios no selectivos, los antibióticos en el medio tienen un efecto inhibidor distinto sobre el crecimiento y el aspecto de las colonias de algunas especies. Durante el desarrollo de medio de caldo de 1-[¹⁴C]-ácido palmítico 7H12, se observó que las cantidades menores de antibióticos eran tan eficaces como las concentraciones más altas utilizadas en S7H11. Se pueden agregar antibióticos al cultivo en caldo antes de la inoculación de la muestra no descontaminada.

Incubación

Las diferentes especies de micobacterias muestran una dependencia notable sobre la temperatura de incubación para un crecimiento óptimo. Las especies que tienden a infectar la piel (como *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. haemophilum*) cre-

cen mejor a la temperatura de ésta (30-32 °C) y muy poco o en absoluto a 37 °C. *M. tuberculosis* crece mejor a 37 °C y poco o nada a 30 °C o 42-45 °C (la temperatura corporal de los pájaros). *Mycobacterium xenopi*, una especie poco común como causa de infección en seres humanos, crece mejor a 42 °C y ha sido implicada como contaminante ambiental en el sistema de agua caliente de un hospital grande.¹¹⁵

El aislamiento óptimo de las diferentes especies de micobacterias depende de la incubación al menos de parte de la muestra concentrada a una temperatura que muy probablemente promueve el crecimiento de esa especie. Se debe utilizar una estufa de incubación regulada a 30 °C para todas las muestras de infecciones micobacterianas cutáneas o subcutáneas sospechosas. Si no se cuenta con ella, las muestras pueden mantenerse en una caja cerrada con monitorización de la temperatura y resguardada de las corrientes cálidas o frescas. La temperatura de la caja debe mantenerse entre 24 °C y 25 °C y registrarse todos los días. Una estufa de incubación mantenida a 42 °C puede ser útil para aislar *M. xenopi*.

Las micobacterias crecen mejor en una atmósfera con CO₂ al 3-11% (fig. 19-2). Es obligatorio el uso de CO₂ en el medio de Middlebrook 7H11. Sin embargo, si la falta de espacio en la estufa de incubación para mantener los cultivos constituye un problema, se puede retirar los cultivos de la atmósfera de CO₂ después de 7-10 días porque los microorganismos estarán en una fase logarítmica de crecimiento y son menos dependientes del CO₂. Por razones todavía no conocidas, las micobacterias no crecen bien en jarras de anaerobiosis por extinción con vela. La concentración de CO₂ en las estufas debe controlarse todos los días y se debe mantener un registro tanto de la temperatura de la estufa como de su concentración de CO₂.

Métodos rápidos para establecer un diagnóstico

Sensibilidad de los frotis ácido-alcohol resistentes

Uno de los métodos más prácticos y más fáciles de conseguir para mejorar el diagnóstico rápido de tuberculosis es aumentar la FCR aplicada a las muestras clínicas para mejorar la sedimentación de las células micobacterianas cargadas de lípidos.²⁸⁴ La mejor correlación entre los frotis positivos con los

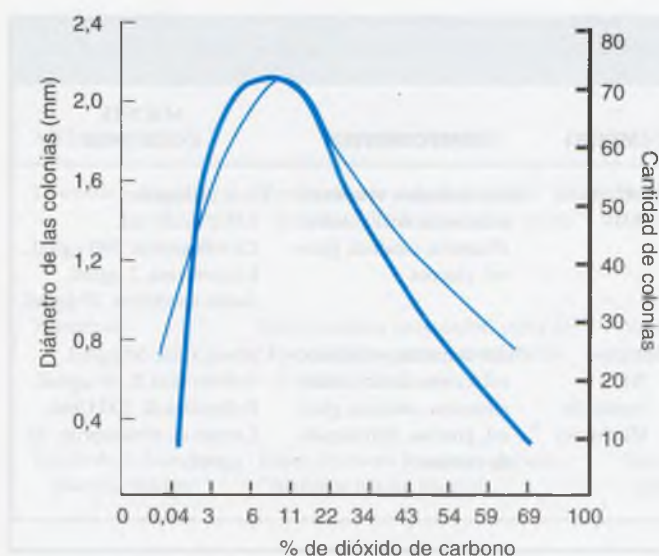


Figura 19-2 Efecto del CO₂ sobre el crecimiento (tamaño de las colonias y cantidad de colonias) de *M. tuberculosis* después del aislamiento primario del esputo. (Extraído de David HL. Bacteriology of the Mycobacterioses. DHEW Publication No. [CDC] 76-8316, Atlanta: Rama de Micobacteriología de los Centers for Disease Control and Prevention, 1976).

cultivos positivos ha vuelto algo más confiable el examen de un frotis con tinción ácido-alcohol resistente como índice de infección por micobacterias. En una revisión de los factores que afectan el valor clínico de la microscopia para los bacilos ácido-alcohol resistentes, Lipsky arribó a la conclusión de que cuando se consideran los resultados globales de todas las muestras de cada paciente, el frotis ácido-alcohol resistente tiene un valor predictivo superior al 96% y sigue siendo una de las pruebas realizadas con mayor facilidad en la detección de las infecciones por micobacterias.²⁰⁷

Cromatografía gas-líquido y cromatografía líquida de alto rendimiento

El análisis de los ácidos grasos celulares de cadena larga mediante cromatografía gas-líquido se ha utilizado para ayudar a la caracterización de las micobacterias. El método de gas-líquido por pirólisis de Reiner, en el cual los ácidos micólicos de cadena larga son divididos en productos de escisión característicos, está limitado en gran parte a los laboratorios de investigación.²⁸⁰ Tisdall ideó un procedimiento de cromatografía gas-líquido para saponificar microorganismos en NaOH metabólico que permite la identificación correcta de la mayoría de las especies de micobacterias.³⁴⁶ Guerrant y cols. utilizaron la metanólisis ácida para el aislamiento de los ésteres metílicos del ácido micólico de las células bacterianas, un método que no sólo lleva menos tiempo que la saponificación sino que también es más sensible para detectar una pequeña cantidad de células.¹¹⁸ Se puede utilizar tan sólo un puñado de 1 mm de microorganismos y el tiempo total para el análisis es inferior a 2 horas.²⁸⁸

Un sistema comercial aprobado por la FDA, el MIDI Sherlock Microbial Identification System® (Microbial ID, Newark DE), que consiste en cromatografía líquida de alto rendimiento 1100 y un ordenador es un método rápido y confiable para la confirmación con cultivo de las micobacterias. El sistema computarizado incluye una colección de 40 perfiles posi-

bles de lípidos de la pared celular para las especies de *Mycobacterium* de mayor importancia clínica, derivadas de los aislamientos adquiridos de la American Type Culture Collection que incluye muchos aislamientos clínicos. El uso de la espectrometría de masa negativa para iones para detectar el ácido tuberculoesteárico en las muestras clínicas también parece promisorio para la detección rápida de micobacterias en estas muestras para los laboratorios equipados con los instrumentos necesarios.¹⁹⁵

Se ha empleado la cromatografía líquida de alto rendimiento que utiliza detección por fluorescencia de ésteres de ácido micólico 6,7-dimetoxicumarina para la identificación rápida de *M. tuberculosis* y *M. avium* directamente de muestras de esputo con frotis positivo teñidas con fluorocromos y cultivos BACTEC 12B® con crecimiento incipiente. En un estudio de 132 muestras de esputo positivas para *M. tuberculosis* y 48 positivas para *M. avium-intracellulare*, la cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de detección de fluorescencia hizo identificaciones directas con sensibilidades del 56,8% y del 33,3%, respectivamente.¹⁶⁴ Cuando se realizó el examen con esta prueba de los cultivos que crecen en frascos de BACTEC 12B®, se lograron sensibilidades del 99% y el 94,3%. La especificidad fue del 100% en ambas evaluaciones. Cagle también identificó con éxito 117 de 126 especies de micobacterias (93%) que crecieron en el medio BACTEC 7H12B complementado con ácido oleico.⁶ Glickman y cols. describieron un archivo computarizado que contenía los patrones de los ácidos micólicos característicos de 45 especies de *Mycobacterium*.¹⁰⁷ Con el uso de su sistema en la evaluación de 1 333 cepas que representaban 24 especies de *Mycobacterium*, el 97% fue identificado correctamente (la identificación de *M. tuberculosis* tuvo una exactitud del 99,85%; la del complejo MAI, una exactitud del 98%). Por lo tanto, para aquellos que poseen el equipamiento y utilizan los perfiles de reconocimiento de patrones computarizados, se pueden identificar con precisión y rapidez las micobacterias utilizando los datos cromatográficos generados por cromatografía líquida de alto rendimiento. Estos sistemas están en competencia directa con los métodos basados sobre ácidos nucleicos para la identificación rápida de micobacterias.

Uso de medios de cultivo en caldo

Durante muchos años, los que utilizaron los frascos de cultivo en caldo BACTEC 12B lograron una tasa mayor de aislamiento de *M. tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium* 1 a 2 semanas antes que los grupos que utilizan sólo medios de cultivo sólidos. Por lo tanto, se recomienda ahora altamente el uso de un medio de cultivo en caldo para el aislamiento temprano de las micobacterias; de hecho, esto se ha agregado como un elemento de deficiencia de fase a la Lista de Control de Inspección y Acreditación del College of American Pathologists. A continuación se describen brevemente los sistemas semiautomatizados, automatizados y manuales para el cultivo de las micobacterias.

Sistemas de detección automatizados

Existen cinco sistemas semiautomatizados y automatizados para la detección de micobacterias: el sistema BACTEC 460, honrado por el tiempo y bien evaluado (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) y sistemas no radiométricos más nuevos, el sistema MGIT 960® (BD Diagnostic Systems), el siste-

ma MBA/BacT (BioMérieux, Durham, NC), el frasco para hemocultivo BACTEC MYCO/F Lytic (BD Diagnostic Systems) y el ESP Culture System II (Trek Diagnostic). Dos alternativas viables son el Septi-Chek System manual (BD Diagnostic) y la versión manual del sistema MGIT (BD Diagnostic) para utilizar en los laboratorios sin sistemas automatizados.

Sistema BACTEC AFB

Los componentes del sistema automatizado BACTEC 460 (BD Diagnostic) incluyen un contador de centelleo, una conexión para aspiración con aguja y un cursor extraíble sobre el cual se pueden colocar hasta 60 frascos de cultivo. Este cursor se alinea de modo que cada frasco de cultivo pasa, a su vez, por debajo del ensamblaje de aspiración con aguja a la velocidad aproximada de uno por cada 80 segundos. Cuando el frasco de prueba está inmediatamente por debajo del ensamblaje con aguja, se hace atravesar la aguja hacia abajo a través de la tapa de goma del espacio superior. Se aspira una muestra del gas de la parte superior y se la coloca en la cámara del contador de centelleo. El gas de la parte superior es reemplazado por un bolo fresco de CO₂ al 10% inmediatamente después de aspirar la muestra. El sistema se acondiciona con una cubierta que proporciona aire filtrado con HEPA bajo presión negativa en el área de prueba y una fuente de luz ultravioleta como elemento de seguridad agregado. Se esteriliza con calor eléctrico la aguja durante el intervalo previo a la toma de la muestra del siguiente frasco.

El frasco de cultivo en caldo BACTEC 12B es la clave para la operación. Consiste en un frasco ampolla de vidrio de 20 mL con un cuello corto, cuya boca está cerrada con una tapa delgada de goma. Este frasco contiene 4 mL del medio de cultivo con una base de caldo Middlebrook 7H9; albúmina de suero bovino (BSA); hidrolizado de caseína, catalasa y estearato de polioxileno como reforzadores del crecimiento; pequeñas cantidades de una mezcla antibiótica de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina para suprimir el crecimiento de los contaminantes; y ácido palmítico marcado con ¹⁴C como detector del crecimiento. El frasco se inocula con 0,5 mL de la muestra procesada y se coloca en una estufa de incubación a 35 °C. Si se presentan micobacterias en el inóculo, se libera ¹⁴CO₂ en el espacio superior, cuya cantidad es proporcional al grado de crecimiento en el frasco ampolla. Se utiliza el sistema detector de radiactividad muy sensible porque las micobacterias de metabolismo lento producen sólo cantidades muy pequeñas de CO₂. Cuando ha pasado un período designado de incubación, habitualmente de unos 3 días, los frascos ampollas se colocan sobre el cursor del sistema BACTEC 460 preparados para su lectura. Se mide la cantidad de radiactividad en el gas de la parte superior aspirada, lo cual se traduce en un valor numérico denominado índice de crecimiento. Un índice de crecimiento mayor de 10 se considera positivo; sin embargo, las tinciones ácido-alcohol resistentes se deben realizar sobre una alícuota pequeña de caldo, porque otras bacterias pueden abrirse paso a través de la inhibición del antibiótico.

Con el uso del sistema BACTEC se logra un aumento del rendimiento de cultivos positivos de las muestras clínicas y una disminución del tiempo hasta la detección, en comparación con los medios sólidos convencionales.^{246,308} El tiempo de detección para *M. tuberculosis* promedia 9-14 días; puede ser inferior a 7 días para algunas cepas de micobacterias distintas de *M. tuberculosis*. Las desventajas del sistema son el costo de la instrumentación, la incapacidad para observar la morfología de las colonias y detectar cultivos mixtos, el sobrecimiento por con-

taminantes, la necesidad de la eliminación de los materiales radiactivos y el uso extenso de agujas. Se han comunicado casos de infecciones pseudomicobacterianas cuando la aguja se esteriliza en forma incompleta luego de la aspiración de un frasco ampolla con una alta concentración del microorganismo.^{57,239} No se pueden utilizar muestras procesadas que requieren reactivos distintos de NALC-NaOH (como cloruro de benzalconio o Zephiran-fosfato trisódico) con el sistema BACTEC porque las cantidades residuales en el caldo pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias.

Los estudios iniciales de la sensibilidad de este sistema en la monitorización del crecimiento de las micobacterias mostraron que un inóculo de 200 bacilos viables de *M. tuberculosis* se podría detectar en 12-13 días, mientras que si se esperaba durante 14-17 días, se podían detectar hasta 20 bacilos viables.²²⁶

Se ha demostrado el valor del sistema BACTEC en la detección de micobacterias de las muestras de esputo, sangre y otras muestras clínicas en varios ensayos y estudios de correlación clínica.^{15,34,112,134} En un estudio cooperativo multicéntrico, se logró el aislamiento de *M. tuberculosis* en las muestras clínicas que se sabían que eran positivas mediante el sistema BACTEC en 14 días, en comparación con 21 días por el método de cultivo estándar.²⁸⁷ En este mismo estudio, el tiempo total para el aislamiento y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de *M. tuberculosis* se completó en un promedio de 18 días mediante el método radiométrico en comparación con un promedio de 38 días con los procedimientos estándares. Asimismo, las muestras con frotis negativo y cultivo positivo fueron positivas para el crecimiento de *M. tuberculosis* en un promedio de 14 días con el método radiométrico, en comparación con 25 días con el procedimiento de cultivo estándar.^{67,236}

La capacidad para realizar estudios rápidos de sensibilidad a los antimicobacterianos es otra ventaja del sistema BACTEC.¹²⁶ También se lo puede utilizar para diferenciar *M. tuberculosis* y *M. bovis* de micobacterias no tuberculosas utilizando frascos de hemocultivo que contienen *p*-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP). *M. tuberculosis* y *M. bovis* no pueden crecer en medios de cultivo que contengan NAP y, por lo tanto, no producen un GI positivo luego de varios días de incubación. La prueba NAP se presenta en el protocolo 19-4. La detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas contaminadas también se puede lograr utilizando un frasco de cultivo 7H12A que contenga los mismos antibióticos utilizados en el agar S7H11, sólo en concentraciones más pequeñas (polimixina, 50 µg/mL; anfotericina, 5 µg/mL; carbenicilina, 25 µg/mL y trimetoprim, 2,5 µg/mL (PACT)).

Aunque el sistema BACTEC 360 posiblemente representa hasta la fecha el mejor sistema con base de caldo para el aislamiento rápido de las micobacterias, está siendo reemplazado por los sistemas no radiométricos, debido en gran parte a los problemas asociados con el mantenimiento de los materiales radiactivos y la eliminación de sus desechos.

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, tubo indicador de crecimiento de micobacterias) y MGIT 960

El sistema MGIT (BD Diagnostic) consiste en un tubo de vidrio con base redonda de 16 × 100 mm que contiene 4 mL de base de caldo 7 H11 modificado, al cual se ha agregado 0,5 mL de enriquecimiento OADC (ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa) y 0,1 mL de una mezcla antibiótica PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina). La mezcla de antibióticos inhibe el crecimiento de las bacterias contaminantes; el suplemento OADC

proporciona ácido oleico, un importante estimulante metabólico para las micobacterias; albúmina, que se une a los ácidos grasos libres tóxicos; dextrosa, como fuente de energía; y catalasa, para destruir los peróxidos tóxicos que pueden presentarse en el medio. Se introduce un compuesto fluorescente en siliconas en la parte inferior del tubo, el cual es sensible al oxígeno disuelto en el caldo; es decir, la presencia de oxígeno en el medio uniloculado sirve para apagar la emisión de luz fluorescente. A medida que las bacterias que crecen activamente consumen el oxígeno disuelto, la fluorescencia es desenmascarada y puede detectarse observando el tubo bajo luz ultravioleta de onda larga (lámpara de Wood). También se puede detectar crecimiento observando la turbidez heterogénea o pequeños gránulos o copos en el medio de cultivo.

Al realizar la prueba, se agregan al tubo en condiciones asepticas 0,1 mL de mezcla PANTA y 0,5 mL de mezcla OADC y se reconstituye el medio liofilizado. Esto es seguido de 0,5 mL de la muestra o de concentrado de la muestra; el agregado de más de 0,5 mL de la muestra puede afectar adversamente el rendimiento del tubo. Se reemplaza la tapa, se mezcla los ingredientes invirtiendo el tubo varias veces y se coloca el tubo en una estufa de incubación a 37 °C. Se leen los tubos día por medio comenzando el segundo día después de la inoculación con la aplicación manual. Se leen los tubos con lámpara de Wood, se coloca el tubo con la mezcla de prueba entre un control positivo (solución de sulfito de sodio) y un control negativo (tubo de MGIT inoculado). Se usan gafas protectoras contra los rayos UV cuando se busca un color anaranjado brillante en la parte inferior de los tubos positivos; también se observa un reflejo anaranjado en el menisco. Los tubos positivos se tiñen para bacilos ácido-alcohol resistentes, de preferencia con el uso de la técnica de Ziehl-Neelsen. Se retornan los tubos negativos a la rejilla de incubación y se observa nuevamente a intervalos regulares hasta durante 6 semanas. Ahora se cuenta con una plataforma automática que examina cada tubo periódicamente para detectar positividad.

Hanna y cols. utilizaron el sistema MGIT a fin de evaluar 193 muestras (44 pacientes) de distintos sitios corporales para detectar la presencia de especies de *Mycobacterium*.¹²⁴ Se estudiaron las concentraciones en el esputo de 32 pacientes de los cuales se observó por lo menos un frotis ácido-alcohol resistente positivo. Los cultivos de MGIT fueron positivos en 31 (complejo *M. tuberculosis*, 25; MAI, 4 y *M. haemophilum*, 2) casos. Los tubos MGIT fueron positivos en otros tres pacientes con frotis negativos; la única prueba MGIT falsa negativa ocurrió en un paciente en el que se observaron muy pocos bacilos ácido-alcohol resistentes en el frotis. El tiempo medio transcurrido hasta la detección fue de 10,4 días (rango, 4 a 26). Las dos cepas de *M. haemophilum* se aislaron agregando un disco X (hemina) al tubo MGIT e incubando a 30 °C. Todas las reacciones positivas con este sistema deben confirmarse mediante una tinción ácido-alcohol resistente, dado que otras bacterias que consumen oxígeno pueden abrirse paso a través de la mezcla de antibióticos PANTA. Una desventaja importante es el costo de cada tubo, pero esto puede superarse en cierta medida porque se observa fluorescencia visualmente y no requiere un equipamiento elaborado ni costoso.

El MGIT 960 es un sistema automatizado no radiométrico que utiliza medios BD BBL MGIT y sensores para detectar la fluorescencia que se interpreta visualmente en la versión manual descrita antes. Tiene 960 tubos de plástico, que son controlados con cuidado. En una de las primeras comparaciones de esta técnica con BACTEC 460 y el medio de LJ utilizando 2 567 muestras clínicas, Tortoli y cols. observaron que

MGIT 960 tenía el tiempo medio más corto hasta la positividad en 13,3 días, en comparación con 14,8 días para el sistema BACTEC 460 y 25,6 días para el medio de LJ.³⁴⁹ Sin embargo, el mejor rendimiento fue el del sistema BACTEC 460 (201 aislamientos), seguido de 190 aislamientos con el sistema BACTEC MGIT 960 y 168 aislamientos con el medio de LJ. En esta comparación, el MGIT 960 también tuvo la tasa más alta de contaminación (10%), en comparación con el sistema radiométrico (3,7%) y el medio de LJ (17%). La tasa de contaminación ha sido mejorada por otros, con sólo un aumento leve en el tiempo hasta la positividad.³⁸⁴

Sistema de detección de micobacterias MB/BacT

El MB/BacT® es un sistema automatizado para detectar micobacterias, de diseño similar al sistema de hemocultivo BacT/Alert. Los frascos de MB/BacT contienen 10 mL de caldo de Middlebrook 7H9 reforzado en una atmósfera de CO₂, nitrógeno y oxígeno al vacío. Por lo tanto, este frasco proporciona condiciones nutricionales y ambientales apropiadas para aislar las especies de *Mycobacterium* halladas con mayor frecuencia en muestras clínicas distintas de la sangre. Se agrega en cada frasco un suplemento reconstituido de antibióticos antimicobacterianos (0,5 mL), que contiene anfotericina B, azlocilina, ácido nalidíxico, polymixina B, trimetoprim y factores de crecimiento patentados, inmediatamente antes de su uso para aumentar la proliferación de las especies de *Mycobacterium* y restringir la de las bacterias contaminantes que pueden sobrevivir a la descontaminación y al procedimiento de concentración. Se coloca un sensor permeable al gas en la parte inferior de cada frasco de caldo que pasa del verde oscuro al amarillo brillante cuando se produce CO₂ en el caldo al metabolizar las micobacterias. Se colocan los frascos con la parte inferior hacia abajo dentro de celdas individuales en la cámara de incubación y se utiliza la luz reflejada para controlar continuamente la producción del CO₂ generado por los microbios.

Los ensayos multicéntricos de campo patrocinados por el fabricante indican que el sistema MB/BacT aísla un porcentaje mayor de micobacterias con menos tiempo hasta la detección respecto de los métodos convencionales y se comparó favorablemente en los cultivos paralelos con el sistema BACTEC 460 TB. Gil-Setas y cols. compararon el sistema MB/BacT, las placas de agar de Middlebrook 7H11 utilizando el método de las microcolonias para la detección de crecimiento y el medio de LJ convencional para el aislamiento de micobacterias de 2 101 muestras no seleccionadas consecutivas.¹⁰⁵ De las 111 muestras positivas para *M. tuberculosis*, 100 fueron aisladas con el sistema MB/BacT, 99 de las placas de agar M7H1 y 86 del medio de LJ. El tiempo hasta la detección fue de 11 días para las placas de agar M7H11, de 16 días para el sistema MB/BacT y de 19,5 días para el medio de LJ. Este sistema también puede utilizarse como un medio confiable para realizar pruebas de sensibilidad basadas sobre caldo.¹⁸ Una ventaja definida es la detección no radiométrica y calorimétrica del crecimiento de micobacterias, que elimina la necesidad de manipular y descartar los radioisótopos. Se han realizado otros estudios que examinan la utilidad de este método de detección automatizado.^{9,19,142,202,265,291,388}

Sistema de cultivo ESP II

El sistema de cultivo ESP II® (Trek Diagnostic) es una adaptación del sistema de hemocultivos ESP. Cuando se coloca cada frasco de hemocultivo en un cajón especial en el módulo de

incubación está unido a un sensor, que consiste en una cámara plástica, una aguja retráctil y una membrana hidrófoba. Por lo tanto, cada frasco se controla en forma continua para detectar algún cambio en la presión del gas debido a la actividad metabólica de los microorganismos en el frasco de cultivo. Un cambio importante en la presión puede estar señalado tempranamente por el consumo de oxígeno o más tarde, con la producción de gases por los microorganismos metabolizadores.

Los frascos contienen medio 7H9 de Middlebrook modificado, Casitone®, glicerol y esponjas de celulosa. Las esponjas proporcionan un soporte para el crecimiento de las micobacterias, que simulan los alvéolos de los pulmones. Inmediatamente antes de la inoculación de las muestras, se coloca un suplemento en cada frasco con una mezcla de antibióticos que contiene polimixina B, vancomicina, ácido nalidíxico y anfotericina B (PVNA).

Los ensayos de campo patrocinados por el fabricante indican que el porcentaje total de cultivos positivos detectados por el sistema ESP MYCO se compararon favorablemente con el sistema BACTEC 460. Cabe señalar que las muestras de los pacientes que recibieron tratamiento antituberculoso a veces no fueron positivas en ninguno de los sistemas de caldo, lo que indicó la necesidad de inocular medios de cultivo sólidos en paralelo con los frascos de caldo. Los resultados de este estudio indican además que el sistema ESP MYCO® detectó cultivos positivos por primera vez con una frecuencia aproximadamente tres veces mayor que el sistema BACTEC 460 y más de 7 días antes en alrededor del 50% de los cultivos, presumiblemente sobre la base de la señal incipiente obtenida durante la fase de consumo de oxígeno del ciclo de crecimiento. Williams-Bouyer y cols. compararon el sistema de cultivo ESP II con el BACTEC MGIT 960 y el agar selectivo de Middlebrook 7H11 y 7H11 y examinaron un total de 3 151 muestras.³⁸⁸ Las tasas de aislamiento para todas las micobacterias fueron del 71,2% para el ESP II, del 63,9% para el MGIT 960 y del 61,8% para los medios de Middlebrook. Sin embargo, con la exclusión de *M. gordonae*, las tasas de aislamiento para las micobacterias restantes fueron del 70,2%, el 72,6% y el 66,3%. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Para las cepas aisladas en ambos sistemas automatizados, los tiempos medios hasta la detección de todas las micobacterias y los miembros del complejo de *M. tuberculosis*, respectivamente, fueron de 15,8 y 17,4 días para ESP II y de 12,5 y 11,9 días para BACTEC MGIT 960 ($p < 0.05$). Se presentaron menos a menudo señales positivas falsas con los cultivos BACTEC MGIT 960 (23% [0,7%]) en comparación con los cultivos ESP II (84 [2,7%]) ($p < 0.01$). En relación con el sistema BACTEC 460, se observó que el ESP II era comparable para las pruebas de sensibilidad.²⁹⁵ El método de detección no radiométrico utilizado también excluye la necesidad de manipular y eliminar materiales radiactivos.

BACTEC MYCO/F LYTIC

El frasco de cultivo BACTEC MYCO/F LYTIC® contiene un agente lítico para liberar las micobacterias que han sido fagocitadas por los leucocitos. Se incuba y controla automáticamente en forma similar a otros frascos de hemocultivo BACTEC. Además de aislar micobacterias, es un buen sistema de cultivo para bacterias y hongos que pueden presentarse en el torrente circulatorio.^{100,361} En una comparación directa de muchos de los productos comerciales, Crump y cols. evaluaron el rendimiento de los sistemas BACTEC 13A (BD Diagnostic),

BACTEC MYCO/F LYTIC (BD Diagnostic), BacT/ALERT MB (BioMérieux) y de centrifugación-lisis ISOLATOR 10 (Wampole Laboratories) para la detección de micobacterias en los adultos.⁶⁴ De los 600 pacientes evaluados, en 85 (14%) se aisló el complejo *M. avium/M. intracellulare* (MAI) y en 9 (2%) otras especies de micobacterias. De 26 conjuntos completos (tres frascos y un tubo) y llenados en forma adecuada (5 ± 1 mL) de los cuales se aisló MAI, BACTEC 13A fue positivo para 19 (73%), BACTEC MYCO/F LYTIC fue positivo para 21 (81%), BacT/ALERT MB fue positivo para 22 (85%) e ISOLATOR 10 fue positivo para 21 (81%). De las seis posibles comparaciones bidireccionales, los tiempos medios hasta la detección para el aislamiento de MAI de cada frasco en los conjuntos suficientemente apareados fueron 15,3 días para BACTEC 13A frente a 12,8 días para BACTEC MYCO/F LYTIC para 33 de 340 pares; 14,1 días para BACTEC 13A frente a 11,6 días para BacT/ALERT MB para 38 de 380 pares; 12,6 días para BACTEC 13A frente a 20 días para ISOLATOR 10 para 26 de 261 pares; 12,8 días para BACTEC MYCO/F LYTIC frente a 11 días para BacT/ALERT MB para 33 de 340 pares; 13,2 días para BACTEC MYCO/F LYTIC frente a 20,4 días para ISOLATOR 10 para 24 de 230 pares; y 9,9 días para BacT/ALERT MB frente a 19 días para ISOLATOR 10 para 24 de 257 pares. No se observó ninguna diferencia en los rendimientos entre los sistemas. Sin embargo, hubo diferencias en el tiempo medio hasta la detección entre los sistemas. El tiempo hasta la detección fue más corto para BacT/ALERT MB, seguido de BACTEC MYCO/F LYTIC y BACTEC 13A y luego ISOLATOR 10. Estos autores observaron que los sistemas con monitorización continua (BACTEC MYCO/F LYTIC y BacT/ALERT MB) son sensibles y, en el balance, más rápidos para la detección de bacteriemia por MAI que los sistemas ISOLATOR 10 manual estándar y BACTEC 13A radiométrico. Otros autores también observaron que este método es superior a los métodos tradicionales.²¹⁶

Sistemas de detección manuales

Los sistemas manuales MGIT y Septi-Chek AFB son las dos opciones de sistemas de cultivo para micobacterias manuales con base de caldo disponibles en el comercio. El MGIT manual se describió antes, junto con la versión automatizada, el MGIT 960.

Sistema Septi-Chek AFB

El sistema Septi-Chek AFB® es un frasco con tapa que contiene 20 mL de caldo de Middlebrook 7H9 modificado bajo CO₂ al 20%. Un segundo componente es un tubo de plástico, al que se ajusta en un extremo una tapa a rosca extraíble, dentro de la que está encerrada una paleta de dos caras, a ambos lados de la cual están introducidos medios de cultivo sólidos. Una superficie de la paleta está cubierta por agar de Middlebrook 7H11; el lado inverso está dividido en dos secciones: una contiene el medio de LJ modificado y la otra, agar chocolate para detectar el crecimiento de las bacterias contaminantes. El sistema se procesa retirando la tapa del frasco que contiene el medio de cultivo, al cual se agrega 1 mL de un suplemento reconstituido que también provee el fabricante, compuesto por glucosa, glicerina, ácido oleico, piridoxina, HCl, catalasa, albúmina, azlocilina, ácido nalidíxico, trimetoprim, polimixina B y anfotericina B. Se inocula a continuación el caldo con

suplemento con 0,5 mL de una muestra procesada con NALC-NaOH. Se retira la tapa a rosca de la parte inferior de la paleta y se asegura el conjunto al frasco de cultivo en caldo. Se inoculan los medios de cultivo sólidos de la paleta invirtiendo el conjunto, lo que permite que la mezcla de cultivo en caldo bañe todas las superficies del agar. Luego se coloca el sistema en una estufa de incubación a 35 °C en posición vertical. Las superficies del agar y los medios de cultivo se examinan cada tres días para detectar proliferación, después de lo cual, si es negativo, se invierte nuevamente el conjunto para volver a inocular el medio de agar. Si se observa proliferación, se pueden realizar frotis ácido-alcohol resistentes de las colonias aisladas que crecen sobre la superficie del agar y se pueden realizar subcultivos del caldo en medios selectivos apropiados o pueden ser preparados para el análisis con sonda de DNA.

En un estudio de cuatro centros en los cuales se estudiaron más de 3 000 muestras clínicas, Isenberg y cols. observaron que el sistema Septi-Chek era más sensible que LJ, 7H11 y caldo BACTEC en el porcentaje de aislamientos de micobacterias.¹⁵⁰ Los autores llegaron a la conclusión de que esta tasa mejor de aislamiento podía atribuirse a la naturaleza bifásica del sistema y a la ventaja obtenida de la exposición temprana y repetida del medio de agar a los microorganismos en proliferación activa en la fase de caldo. En comparación con LJ y 7H11, la cantidad promedio de días para el aislamiento de las micobacterias fue inferior para el sistema Septi-Chek AFB, que promedió 3 días menos para la detección de *M. tuberculosis* y 9 días menos para MAC. Aunque el tiempo de aislamiento con el sistema BACTEC fue inferior en un promedio de 3 días para *M. tuberculosis* y de 12 días para MAC en comparación con el sistema Septi-Chek, el primero no abastece las colonias aisladas; por lo tanto, el tiempo hasta la identificación final fue casi igual entre los dos sistemas. Se observaron resultados similares en un estudio de seguimiento de D'Amato y cols. del sistema Septi-Chek AFB revisado, en el cual se agregó agar de LJ a la paleta.⁶⁶ Un estudio ulterior también confirmó que tanto la tasa como el tiempo de aislamiento de *M. tuberculosis*, MAC y *M. gordonae* de las secreciones respiratorias con frotis positivos mejoraron con el sistema Septi-Chek AFB respecto del medio de LJ.³¹¹ En este estudio, los frascos de BACTEC 12A detectaron el crecimiento de estas especies de *Mycobacterium* antes que Septi-Chek; sin embargo, como se observó en el estudio de D'Amato y cols., el último proporcionó colonias aisladas antes y no requirió un equipamiento especial para la detección del crecimiento.

Identificación de micobacterias mediante métodos convencionales

Aunque se están utilizando cada vez más las aplicaciones de las técnicas moleculares para la detección directa de *M. tuberculosis* en muestras clínicas, la identificación de las micobacterias cultivadas y en los estudios epidemiológicos, la evaluación directa de las muestras clínicas mediante los métodos convencionales sigue siendo el estándar de la práctica en la mayoría de los laboratorios de micobacteriología clínica.¹³⁴ Los protocolos 19-1 a 19-16 proporcionan una presentación detallada de los principios, los reactivos, los procedimientos y la interpretación de las distintas técnicas de laboratorio, que incluyen los métodos de digestión-descontaminación, las pruebas bioquímicas (incluidas en el cuadro 19-7) y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Se explica por separado el uso de los ensayos moleculares, que incluyen el análisis de sondas de ácidos nucleicos.

Temperatura óptima para el aislamiento y velocidad de crecimiento

Cada especie de *Mycobacterium* tiene una temperatura óptima para el crecimiento y un intervalo para el aislamiento en cultivo (cuadro 19-7). El tiempo hasta el aislamiento varía de acuerdo con el tipo de medio utilizado; el tiempo promedio de aislamiento de las micobacterias en los medios con base de huevo es de unos 21 días, pero varía desde tan sólo 3-5 días hasta 60 días, según la especie. En general, el tiempo hasta el aislamiento en los medios sólidos es varios días más corto cuando se utiliza agar 7H10 o 7H11 si se usa la técnica de observación microscópica para microcolonias (descrita más adelante). El cultivo con base de caldo, para la inoculación de los hemocultivos en caldo y otros líquidos corporales, puede acortar considerablemente los tiempos de detección.^{66,177,287}

Se puede utilizar cualquier medio de cultivo no selectivo estándar cuando se evalúa el tiempo de crecimiento, ya sea en tubos con agar inclinados ("pico de flauta") o en placas de Petri. Una colonia bien aislada del microorganismo de prueba se subcultiva en un caldo 7H9 que contiene Tween 80 y se incubaba durante varios días o hasta que el medio esté ligeramente turbio. Se diluye el caldo 1:100 y se hacen líneas de aislamiento en el medio de prueba, ya sea en tubos con agar inclinados o en placas de Petri, para obtener colonias aisladas. Para determinar con precisión la velocidad de crecimiento, es necesario utilizar un inóculo lo suficientemente diluido como para producir colonias individuales. Un inóculo de gran cantidad de micobacterias de crecimiento lento puede formar una colonia visible en algunos días y da una impresión errónea de la velocidad de crecimiento. Se deben utilizar cultivos de reserva de *M. tuberculosis* con velocidades de crecimiento conocidas como control para los microorganismos de crecimiento lento; asimismo, se pueden utilizar cultivos de reserva de *M. fortuitum* como comparación de control para los microorganismos de crecimiento rápido.

Se prefieren las placas de Petri de agar 7H10 o equivalente al uso de los medios en tubo porque se puede estudiar la aparición de microcolonias en desarrollo con un microscopio de disección o de poco aumento. Con experiencia, una evaluación de la morfología de estas microcolonias puede ser útil para excluir ciertas micobacterias, y potencialmente la clasificación preliminar de otras. Runyon publicó pautas por medio de las cuales los que han obtenido experiencia con este enfoque pueden distinguir las microcolonias de distintas especies de micobacterias.²⁹⁶

En el laboratorio de microbiología clínica en la University of Illinois, Chicago, Koneman y cols. pudieron detectar las microcolonias de 29 aislamientos clínicos con frotis positivo de especies de *Mycobacterium* que crecen en agar 7H10 en un promedio de 6,1 días (intervalo, 3 a 12) en comparación con tiempos de aislamiento promedio con el uso de observaciones visuales estándares de 32,4 días con Löwenstein-Jensen y 27,9 días con agar 7H11 (comunicación personal). El tiempo de detección promedio para estos 29 aislamientos fue de 5,8 días por el sistema BACTEC, con el uso de los frascos 12B radio-métricos. Los resultados de este estudio indican que las micobacterias pueden detectarse observando microcolonias en el mismo período acortado que el logrado con el sistema BACTEC. El método de las microcolonias también permite una evaluación de la morfología de las colonias, lo que proporciona otra pieza de información que no brinda el sistema BACTEC, lo cual es útil para hacer una caracterización presuntiva temprana de una especie de *Mycobacterium* desconocida. En un estudio que examinó el tiempo hasta la detección, el tiem-

po promedio hasta la detección de microcolonias de *M. tuberculosis* fue de 11 días en agar de Middlebrook 7H11, mientras que fue de 16 días con los frascos de MB/BacT y de 19,5 días con el medio de LJ.¹⁰⁵

Algunas especies de *Mycobacterium*, como *M. marinum* y algunas de las bacterias de crecimiento rápido, crecen mejor a temperaturas que son ligeramente inferiores a la temperatura corporal central. Esto también puede asociarse con el hecho de que la enfermedad producida por estos microorganismos, sobre todo *M. marinum*, afecta sobre todo las extremidades, que se encuentran ligeramente más frías que la temperatura corporal central. Por lo tanto, los laboratorios deben incubar cultivos de micobacterias de muestras que pueden contener estos microorganismos (p. ej., biopsias cutáneas de las extremidades) y temperaturas ligeramente reducidas.

Producción de pigmento

La determinación de si una especie de *Mycobacterium* desconocida puede producir pigmentación de las colonias en la oscuridad (escotocromógeno) o sólo después de la exposición a la luz (fotocromógeno) no es muy útil para la identificación final de la especie, pero puede serlo para estrechar las posibilidades (véase protocolo 19-6). *M. tuberculosis* no produce pigmento, más allá de un color beige claro, aun después de la exposición a la luz. Las capacidades productoras de pigmento de otras especies de *Mycobacterium* se enumeran en el cuadro 19-7 (véase lámina en color 19-2C-E).

Acumulación de niacina

Todas las micobacterias producen niacina; sin embargo, sólo *M. tuberculosis*, *M. simiae* y cepas ocasionales de *M. africanum*, *M. bovis*, *M. marinum* y *M. chelonae* carecen de la enzima necesaria para convertir la niacina a ribonucleótido de niacina. Por lo tanto, la determinación de si la niacina se ha acumulado en el medio de cultivo es una prueba diferencial útil para identificar a estas especies de micobacterias, sobre todo *M. tuberculosis* (véanse los detalles en el protocolo 19-11). Se han creado tiritas de papel de filtro impregnadas con reactivo que eliminan la necesidad de utilizar bromuro de cianógeno, una sustancia altamente tóxica, como se requiere en el método original para realizar esta prueba. La aparición de un color amarillo en el medio de prueba incubado con una tirita reactiva es indicativa de la acumulación de niacina y una prueba positiva (véase lámina en color 19-1D). Es esencial tener el crecimiento suficiente en el medio primario con base de huevo, de otro modo aumenta el riesgo de obtener resultados falsos negativos.

Reducción de nitratos a nitritos

Sólo algunas especies de micobacterias, sobre todo *M. tuberculosis*, producen nitrorreductasa, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito. La aparición de un color rojo además del ácido sulfánico y *N*-naftiletilediamina a un extracto de un cultivo desconocido es indicativa de la presencia de nitrito y una prueba positiva (véase protocolo 19-12). La prueba debe realizarse con cuidado utilizando tres cultivos de control: uno conocido por dar una reacción positiva fuerte; uno, una reacción débil y el último, una reacción negativa. Además de apoyar la identificación de *M. tuberculosis*, la prueba de reducción de nitratos es clave para la identificación de *M. kansasii* y *M. szulgai* (véanse cuadro 19-7 y lámina en color 19-1E).

Hidrólisis de Tween 80[®]

Tween 80 es el nombre comercial de un detergente que puede ser útil para la identificación de micobacterias que tienen una lipasa que divide el compuesto en ácido oleico y sorbitol polioxietilado. Esta prueba es útil para identificar a *M. kansasii*, que puede producir un resultado positivo de la prueba tan sólo en 3 a 6 horas. Se pueden diferenciar dos escotocromógenos con colonias de aspecto similar: *M. gordonae* (positivo) y *M. scrofulaceum* (negativo), utilizando la prueba de hidrólisis de Tween 80. En el cuadro 19-8 se mencionan las reacciones de hidrólisis de Tween 80 para otras micobacterias; el procedimiento de la prueba se describe en detalle en el protocolo 19-15 y en la lámina en color 19-2G se muestra una reacción positiva.

Actividad de catalasa

La mayoría de las micobacterias producen catalasa; sin embargo, no todas las especies son capaces de producir una reacción positiva después del calentamiento del cultivo a 68 °C durante 20 minutos (catalasa termoestable). La mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* y otros miembros del complejo *M. tuberculosis* no producen catalasa termoestable, salvo por ciertas cepas resistentes a la isoniazida (INH), para las cuales los resultados de esta prueba tienen un valor particular como posible marcador reemplazante. La actividad de catalasa se evalúa en forma semicuantitativa midiendo la altura lograda por la columna de burbujas producida cuando se agrega peróxido de hidrógeno a las colonias en crecimiento en un cultivo en tubo (véase protocolo 19-7). Para realizar esta prueba, se deben verter los tubos del medio de Löwenstein-Jensen en posición erecta para producir una superficie plana en lugar de inclinada. Esta superficie recibe un inóculo importante de este microorganismo y se incuba durante 14 días antes de agregar el reactivo de peróxido de hidrógeno. Una columna de más de 45 mm se considera una prueba positiva (véase lámina en color 19-2H). Se puede determinar una evaluación rápida de la actividad de catalasa colocando algunas gotas de peróxido de hidrógeno en las colonias que crecen sobre la superficie del agar de Middlebrook 7H10 y observando la rápida efervescencia de las burbujas (lámina en color 19-2I).

Actividad de arilsulfatasa

La determinación de la actividad de la enzima arilsulfatasa en las micobacterias es útil para identificar ciertas especies, en especial para diferenciar las micobacterias de crecimiento rápido de las micobacterias no fotocromogénicas del grupo III (véase lámina en color 19-2J). *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. xenopi* también pueden producir pequeñas cantidades de esta enzima (véase cuadro 19-8). Sin embargo, estas especies de crecimiento más lento no producen la enzima suficiente como para dar una reacción constantemente positiva. La aparición de un color rojo en el medio de prueba, que indica la liberación de fenolfaleína libre, es un resultado positivo (véase protocolo 19-5).

Actividad de ureasa

La evaluación de la actividad de ureasa es una prueba importante para diferenciar *M. scrofulaceum* (positivo) de *M. gordonae* (negativo). También es útil para diferenciar *M. gastri* (posi-

tivo) de otros miembros de las micobacterias no cromogénicas del grupo III (véase cuadro 19-7). La determinación de si cualquier especie de micobacteria dada puede producir ureasa se puede realizar inoculando el microorganismo en agua destilada que contiene un concentrado con base de urea o con el uso de discos de papel de filtro que contienen urea que se agrega al agua destilada.^{253,391} En el protocolo 19-16 se presentan los detalles de la prueba de la ureasa según se aplica a la identificación de las especies de *Mycobacterium* (véase también lámina en color 19-2K).

Pirazinamidasa

Otra prueba útil para distinguir *M. kansasii* y *M. marinum*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* débilmente niacina positivos y los miembros del complejo de *M. avium* de otras especies es la prueba para la pirazinamidasa (todos positivos). La pirazinamidasa es una enzima que desamina la pirazinamida para formar ácido pirazinoico, que produce una banda roja en el medio de cultivo.³⁷³ En el protocolo 19-13 se presentan los detalles de esta prueba y se muestra la reacción final en la lámina en color 19-12L.

Cuadro 19-7 Características diferenciales de las micobacterias

	TEMPERATURA DE AISLAMIENTO Y TIEMPO PARA CRECIMIENTO ÓPTIMOS	CRECIMIENTO CON PIGMENTACIÓN EN		PRUEBA DE LA NIACINA	REDUCCIÓN DE NITRATO	HIDRÓLISIS DE TWEEN 80 –10 DÍAS
		Luz	Oscuridad			
<i>M. tuberculosis</i>	37 °C 12-25 d	Color beige	Color beige	+	+	V
<i>M. africanum</i>	37 °C 31-42 d	Color beige	Color beige	V	V	–
<i>M. bovis</i>	37 °C 24-20 d	Color beige	Color beige	V	–	–
<i>M. ulcerans</i>	32 °C 28-60 d	Color beige	Color beige	–	–	–
<i>M. kansasii</i>	37 °C 10-20 d	Amarillo	Color beige	–	+	+
<i>M. marinum</i>	30 °C 5-14 d	Amarillo	Color beige	V	–	+
<i>M. simiae</i>	37 °C 7-14 d	Amarillo	Color beige	+	–	+/-
<i>M. asiaticum</i>	37 °C 10-21 d	Amarillo	Color beige	–	–	+
<i>M. szulgai</i>	37 °C 12-25 d	Amarillo a naranja	Amarillo–37 °C Color beige–25 °C	–	+	V
<i>M. scrofulaceum</i>	37 °C 10 d	Amarillo	Amarillo	–	–	–
<i>M. gordonae</i>	37 °C 10 d	Amarillo a naranja	Amarillo	–	–	+
<i>M. thermoresistible</i>	45 °C 7 d	Amarillo	Amarillo	–	+	+
<i>M. flavescens</i>	37 °C 7-10 d	Amarillo	Amarillo	–	+	+
<i>M. xenopi</i>	42 °C 14-28 d	Amarillo	Amarillo	–	–	–
Complejo <i>M. avium</i>	37 °C 10-21 d	Color beige a amarillo pálido	Color beige a amarillo pálido	–	–	–
<i>M. haemophilum</i>	30 °C 14-21 d	Gris	Gris	–	–	–
<i>M. malmoense</i>	37 °C 21-28 d	Color beige	Color beige	–	–	+
<i>M. shimoides</i>	37 °C 14-28 d	Color beige	Color beige	–	–	+
<i>M. genavense</i>	37 °C 14-28 d	Color beige	Color beige	–	–	+
<i>M. celatum</i>	37 °C 14-28 d	Color beige	Color beige	–	–	–
<i>M. gastii</i>	37 °C 10-21 d	Color beige	Color beige	–	–	+
Complejo <i>M. terrae</i>	37 °C 10-21 d	Color beige	Color beige	–	V	+
<i>M. triviale</i>	37 °C 10-21 d	Color beige	Color beige	–	+	+
<i>M. fortuitum</i>	37 °C 3-5 d	Color beige	Color beige	–	+	V
<i>M. chelonae</i>	28 °C 3-5 d	Color beige	Color beige	V	–	V
<i>M. abscessus</i>	35 °C 3-5 d	Color beige	Color beige	–	–	V
<i>M. smegmatis</i>	37 °C 3-5 d	Color beige a amarillo	Color beige a amarillo	–	+	+

+, positivo; –, negativo; V, variable; espacios en blanco, pocos datos o ninguno.

Captación de hierro

Las micobacterias de crecimiento rápido tienen muchas similitudes. La capacidad de *M. fortuitum* para captar sales solubles de hierro del medio de cultivo y para producir un aspecto pardo oxidado con el agregado de una solución acuosa de citrato de amonio férrico al 2%, es una característica útil que diferencia a este microorganismo de *M. chelonae* y de *M. abscessus*, que carecen de esta propiedad (véase protocolo 19-10).³⁷⁴

Inhibición del crecimiento por la hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico

La hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico (T2H) inhibe selectivamente el crecimiento de *M. tuberculosis*, mientras que la mayoría de las otras micobacterias pueden crecer en un medio que contiene este compuesto; esto es muy útil para diferenciar ciertas cepas de *M. bovis* (véanse protocolo 19-9 y lámina en color 19-1F). Por ejemplo, el 30% de las cepas de BCG de *M. bovis* pueden ser débilmente niacina positivas, y

	CATALASA			UREASA	PIRAZINA-MIDASA	INGRESO DE HIERRO	CRECIMIENTO EN		
	Semi-cuantitativa	pH 7,0; 68 °C	ARILSULFATASA 3 DÍAS				T ₂ H (1 µg/mL)	5% NaCl 28 °C	Agar de MacConkey
<i>M. tuberculosis</i>	< 45	—	—	+	+	—	+	—	—
<i>M. africanum</i>	> 45	—	—	V	—	—	+	—	—
<i>M. bovis</i>	< 45	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>M. ulcerans</i>	> 45	+	—	V	—	—	+	—	—
<i>M. kansasii</i>	> 45	+	—	+	+	—	+	—	—
<i>M. marinum</i>	> 45	—	V	+	+	—	+	—	—
<i>M. simiae</i>	> 45	+	—	+	—	—	+	—	—
<i>M. asiaticum</i>	> 45	+	—	—	—	—	+	—	—
<i>M. szulgai</i>	> 45	+	—	+	—	—	+	—	—
<i>M. scrofulaceum</i>	> 45	+	—	+	V	—	+	—	—
<i>M. gordonae</i>	> 45	+	—	—	V	—	+	—	—
<i>M. thermoresistible</i>	> 45	+	—	+	—	—	—	+	—
<i>M. flavescens</i>	> 45	+	—	+	+	—	+	V	—
<i>M. xenopi</i>	> 45	+	+	—	+	—	+	—	—
Complejo <i>M. avium</i>	< 45	—	—	—	+	—	+	—	V
<i>M. haemophilum</i>	< 45	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>M. malmoense</i>	< 45	V	—	V	V	—	+	—	—
<i>M. shimoidei</i>	< 45	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>M. genavense</i>	> 45	+	—	+	+	—	+	—	—
<i>M. celatum</i>	< 45	+	+	—	+	—	+	—	—
<i>M. gastii</i>	< 45	—	—	+	—	—	+	—	—
Complejo <i>M. terrae</i>	> 45	+	+	—	V	—	+	—	V
<i>M. triviale</i>	> 45	+	V	—	V	—	+	+	—
<i>M. fortuitum</i>	> 45	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>	> 45	+	+	+	+	—	+	—	—
<i>M. abscessus</i>	> 45	+	+	+	+	—	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	> 45	+	—	—	—	+	+	—	—

Cuadro 19-8 Nomenclatura de micobacterias seleccionadas en orden de presentación

NOMBRE RECONOCIDO DE LA ESPECIE	PATOGENICIDAD RELATIVA PARA LOS SERES HUMANOS	GRUPO EQUIVALENTE DE RUNYON	NOMBRE COMÚN ACEPTABLE	NOMBRES NO RECONOCIDOS Y COMENTARIOS
<i>M. tuberculosis</i>	+++		Bacilo tuberculoso humano	Produce tuberculosis humana –altamente contagiosa
<i>M. bovis</i>	+++		Bacilo tuberculoso bovino	Produce tuberculosis bovina y humana; se utilizan las cepas avirulentas para las vacunas del bacilo de Calmette-Guérin (BCG)
<i>M. ulcerans</i>	+++			Asociada con infecciones cutáneas en el trópico – <i>M. buruli</i>
<i>M. africanum</i>	+++			Forma intermedia entre <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> . Se encuentra en el norte y centro de África
<i>M. kansasii</i>	+++	Fotocromógeno I		Cepas raras, no pigmentadas, escotocromógenas y niacina positivas
<i>M. marinum</i>	+++	Fotocromógeno I		<i>M. balnei</i> , <i>M. platypeocilus</i> ; asociados con infecciones cutáneas
<i>M. simiae</i>	++	Fotocromógeno I		<i>M. habana</i> : patógeno facultativo; la fotorreactividad puede ser inestable; niacina positivo
<i>M. genavense</i>	++			Crece sólo en cultivo en caldo. Tendencia a producir enfermedad diseminada pulmonar en pacientes con SIDA
<i>M. asiaticum</i>	++	Fotocromógeno I		Similar a <i>M. simiae</i> pero difiere antigénicamente
<i>M. scrofulaceum</i>	++	Escotocromógeno II		<i>M. marinum</i> y MAI; pueden producir linfadenitis cervical
<i>M. szulgai</i>	+++	Fotocromógeno I a 25 °C Escotocromógeno II a 37 °C		Asociado con enfermedad pulmonar y extrapulmonar crónica; composición lipídica definida de las paredes celulares
<i>M. xenopi</i>	++	No fotocromógeno III		<i>M. littorale</i> , <i>M. xenopi</i> ; crece lentamente; mejor a 42 °C; puede contaminar los sistemas de agua corriente

<i>M. celatum</i>	+			Tendencia a producir infecciones respiratorias en pacientes con SIDA. Se asemeja estrechamente a <i>M. xenopi</i>
<i>M. gordonae</i>	0/+	Escotocromógeno II	Escotocromógenos del agua corriente	<i>M. aquae</i> ; en ocasiones patógeno para los seres humanos
<i>M. thermoresistible</i>	+	Escotocromógeno II		Crecimiento a 52° C. Potencialmente patógeno. Crecimiento lento
<i>M. avium/M. intracellulare</i>	+++	No fotocromógeno III ^a	Bacilo de Battey	<i>M. batteyi</i> , <i>M. battey</i> ; a menudo resistente a los fármacos A menudo causa compleja de infección en pacientes con SIDA
<i>M. terrae</i>	Rara	No fotocromógeno III	Bacilo del rábano	Puede estar estrechamente relacionado con <i>M. triviale</i>
<i>M. shimoides</i>	+			Se asemeja al complejo <i>M. terrae</i> Casos raros de infecciones pulmonares
<i>M. triviale</i>	0/+	No fotocromógeno III	Bacilo V	Ha sido denominado <i>Mycobacterium</i> atípico-atípico
<i>M. malmoense</i>	+++	No fotocromógeno III		<i>Mycobacterium</i> de crecimiento lento que suele causar enfermedad pulmonar
<i>M. haemophilum</i>	+++	No fotocromógeno III		Asociado con infecciones cutáneas habitualmente en pacientes inmunosuprimidos
<i>M. fortuitum</i>	++	Bacilo de crecimiento rápido IV		<i>M. ranarum</i> ; <i>M. minetti</i> : infecciones cutáneas y pulmonares. Puede causar enfermedad en huésped inmunosuprimido. Puede causar infección hospitalaria
<i>M. chelonae</i>	++	Bacilo de crecimiento rápido IV		Puede causar infecciones cutáneas, sobre todo en personas con inmunidad celular comprometida. Causa importante de enfermedad pulmonar en pacientes con enfermedad respiratoria crónica
<i>M. abscessus</i>	++	Bacilo de crecimiento rápido IV		Puede causar infecciones cutáneas, sobre todo en personas con inmunidad celular comprometida. Causa importante de enfermedad pulmonar en pacientes con enfermedad respiratoria crónica
^a Las cepas aisladas en pacientes con SIDA a menudo son escotocromógenas. Adaptado de Sommers HM. <i>The Clinically Significant Mycobacteria</i> . Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1974.				

otras pueden ser reductores débiles del nitrato, lo que a veces dificulta la diferenciación de estas cepas de *M. tuberculosis*.

Crecimiento en cloruro de sodio al 5%

La capacidad de crecer en un medio de cultivo con base de huevo que contiene NaCl al 5% cuando se lo incubaba a 28 °C es una característica compartida por *M. triviale*, algunas cepas de *M. flavescens*, *M. fortuitum* y *M. abscessus* (véase cuadro 19-8). Otras micobacterias no toleran este aumento de las concentraciones de sales. Existen porciones inclinadas del medio de Löwenstein-Jensen que contienen NaCl al 5%. La prueba no se puede realizar en un medio con base de agar (véase protocolo 19-14 para los detalles).¹⁸⁹

Crecimiento en agar de MacConkey

El agar de MacConkey, del cual se ha eliminado el violeta de genciana ("cristal violeta"), es el sustrato de crecimiento de las micobacterias de crecimiento rápido. Sin embargo, la mayoría de las otras especies de *Mycobacterium* no pueden crecer en este medio. El procedimiento de prueba se detalla en el protocolo 19-8.

Clasificación de las micobacterias

El reconocimiento de que un microorganismo desconocido es "ácido-alcohol resistente" suele ser el primer indicio de que puede ser una micobacteria. La denominación de *ácido-alcohol resistente* se utiliza para describir bacterias que resisten a la decoloración con alcohol acidificado una vez que han sido teñidas con carbolfucsina. Algunas especies de bacterias, sobre todo las de *Nocardia* y las de *Rhodococcus*, sólo retienen la carbolfucsina si se utiliza un agente decolorante menos restrictivo, como un ácido inorgánico en baja concentración; por ejemplo, H₂SO₄ al 1% o HCl al 1%. Estas especies se denominan "parcialmente ácido-alcohol resistentes".

Wayne y Kubica consideran que las especies de *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* están agrupadas en un supergénero basado sobre muchas similitudes.³⁷⁵ Designaron este grupo de microorganismos como grupo CNM. Se han presentado en otros sitios los detalles para la identificación de estas especies distintas de las micobacterias. El lento crecimiento, la presencia de bacilos ligeramente curvos o rectos grampositivos arrosariados que pocas veces se ramifican, la resistencia a la lisozima y los patrones de reacciones en las pruebas bioquímicas presentadas antes son las características que permiten el reconocimiento de las micobacterias y por medio de las cuales se pueden identificar las especies. Sin embargo, la taxonomía y la clasificación de las especies de *Mycobacterium* se han vuelto algo complejas. Las relaciones y la identidad de estos microorganismos se están redefiniendo a través de la secuenciación del DNA.

A finales de la década de 1950, a medida que se encontraban especies de micobacterias distintas de *M. tuberculosis* con una frecuencia creciente en el ejercicio médico, Runyon propuso el agrupamiento de estos microorganismos "atípicos" sobre la base de la velocidad de crecimiento y la producción de pigmento (recuadro 19-2). Los progresos en nuestro conocimiento de la genética, la estructura celular y las propiedades fenotípicas no convencionales de las cepas de micobacterias ya conocidas y de las recién descubiertas han adelantado nuestro conocimiento más allá de la categorización impecable de las especies bajo el

sistema de Runyon clásico de clasificación, que ha servido a los laboratorios de microbiología durante las tres últimas décadas. Además, Sommers y Good señalan que algunas cepas de *M. kansasii*, por ejemplo, tienen pigmento en la oscuridad o son no pigmentadas (lo que califica para el grupo II o grupo III de Runyon, respectivamente).³²⁴ También se han hallado especies pigmentadas en el complejo MAI. Por lo tanto, puede ser engañoso confiar en estos criterios fenotípicos, y Sommers y Good aconsejan que cada aislamiento debe ser identificado y considerado en forma definitiva por su identidad individual a la luz de los posibles síndromes patológicos asociados. Asimismo, Woods y Washington han sugerido una clasificación con orientación clínica de las micobacterias (recuadro 19-3), refinada a partir de una propuesta publicada anterior de Wolinski.^{393,399}

No obstante, para el micobacteriólogo con entrenamiento tradicional, la separación de *M. tuberculosis* (y de *M. bovis*) de las micobacterias distintas de *M. tuberculosis* ("*Mycobacterium* other than *M. tuberculosis*", MOTT) y la separación preliminar de MOTT en los cuatro grupos de Runyon seguirá proporcionando una orientación inicial significativa. El hecho de que ciertas cepas de *M. kansasii* habitualmente fotocromógenas pueden ser no pigmentadas o incluso escotocromógenas, que algunas cepas del complejo MAI pueden ser levemente pigmentadas, e incluso que *M. szulgai* es escotocromógena a 37 °C pero fotocromógena a 25 °C (lo que altera por cierto el esquema de Runyon) no sugiere que las orientaciones pasadas deban descartarse por completo, sino más bien que se debe reconocer la variabilidad fenotípica de estos microorganismos y se la debe incorporar en los esquemas de identificación convencionales.

Identificación de laboratorio de las micobacterias y síndromes clínicos relacionados

La identificación de las micobacterias por los métodos tradicionales no es difícil pero requiere paciencia, familiaridad con los parámetros de las diferentes características de identificación y un conjunto de cepas control. No es preciso que todo laboratorio cuente con la capacidad de identificar todas las especies de micobacterias. La cantidad de pacientes con tuberculosis en cualquier hospital de los Estados Unidos no es grande, y puede ser prudente utilizar los servicios de un laboratorio de referencia para proporcionar las identificaciones definitivas y las pruebas de sensibilidad de las cepas de importancia clínica aisladas en el laboratorio de atención primaria. Cada director del laboratorio o supervisor de microbiología debe determinar el grado de los servicios provistos para cubrir las necesidades del ejercicio clínico local. El cuadro 9-9 es una lista de las

Recuadro 19-2 Esquema de clasificación de Runyon^a

- Grupo I: fotocromógenos
- Grupo II: escotocromógenos
- Grupo III: no fotocromógenos
- Grupo IV: de crecimiento rápido

^a No incluye complejo *M. tuberculosis*, incluido *M. bovis*.

Recuadro 19-3 Esquema de clasificación de Woods y Washington, actualizado**Especies potencialmente patógenas en seres humanos***Complejo M. avium/M. intracellulare**M. kansasii*De crecimiento rápido: *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus**M. scrofulaceum**M. xenopi**M. szulgai**M. malmoense**M. simiae**M. genavense**M. marinum**M. ulcerans**M. haemophilum**M. celatum***Micobacterias saprófitas que pocas veces causan enfermedad en seres humanos***M. goodii**M. asiaticum**M. terrae**M. triviale**M. shimoidei**M. gastri**M. nonchromogenicum**M. paratuberculosis***Especies con velocidad de crecimiento intermedia***M. flavescens***Otras especies de crecimiento rápido***M. thermoresistible**M. smegmatis**M. vaccae*Complejo *M. parafortuitum**M. phlei*

opciones del grado o el nivel de los servicios, de acuerdo con las pautas de inspección y acreditación provistas por el College of American Pathologists.

La experiencia en los últimos años con el estudio Special Mycobacterial Interlaboratory Survey del College of American Pathologists ha mostrado que cada vez más laboratorios están limitando sus servicios para infecciones por micobacterias a la preparación y la interpretación de los frotis teñidos para bacilos ácido-alcohol resistentes, el establecimiento de cultivos primarios y la derivación de los cultivos positivos a laboratorios de referencia para la identificación y las pruebas de sensibilidad.^{323,397} Las medidas de restricción de costos impuestas en la mayoría de los laboratorios clínicos y la disponibilidad comercial de sondas de ácidos nucleicos, que pueden proporcionar resultados más exactos y rápidos están estimulando a los laboratorios a brindar no más servicios que los requeridos para los laboratorios de nivel 1 o, a lo sumo, de nivel 2.

Revisión de las especies de *Mycobacterium*: características del laboratorio y correlaciones clínicas

Aunque se puede hacer un diagnóstico presuntivo de tuberculosis pulmonar sobre la base de la anamnesis, los síntomas de presentación, el examen físico, las pruebas radiológicas de enfermedad y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo, el diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de los microorganismos causales en cultivo o su demostración mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En la actualidad, se reconocen varias especies de *Mycobacterium* distintas de *M. tuberculosis* como patógenos pulmonares importantes, cada una con un potencial diferente para causar enfermedad y a menudo con perfiles singulares de sensibilidad a los antibióticos que deben ser determinados con las pruebas de laboratorio. Se puede aislar una amplia variedad de especies de *Mycobacterium* en sitios extrapulmonares, como sangre, piel, tejidos blandos, y huesos y articulaciones. En el recuadro 19-4 se enumeran las características de los cultivos de laboratorio y las manifestaciones clínicas de enfermedades humanas seleccionadas producidas por micobacterias.

COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

***Mycobacterium tuberculosis*.** *Mycobacterium tuberculosis*, la causa más frecuente de enfermedad por micobacterias en los seres humanos, es a menudo un foco importante de la identificación definitiva en muchos laboratorios. Tradicionalmente, se ha enseñado que las cepas clásicas de *M. tuberculosis* pueden diferenciarse fenotípicamente de *M. bovis* y las especies intermedias, *M. microti* y *M. africanum*.³⁷⁵ Sin embargo, varios parámetros, entre ellos, análisis de extractos antigénicos, epítomos diana para anticuerpos monoclonales y estudios antigénicos y de relación de DNA, indican que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum* representan una única especie considerada actualmente bajo el término general "complejo *M. tuberculosis*".

Se necesitan algunas pruebas relativamente simples para identificar a la mayoría de los aislamientos del complejo *M. tuberculosis*. Algunas son más fáciles en los laboratorios donde se utilizan cultivos con base de caldo. Las siguientes son características fenotípicas por medio de las cuales se puede realizar una identificación de *M. tuberculosis*:

1. Formación de colonias no pigmentadas, rugosas y color beige después de 14 a 28 días de incubación a 37 °C en los medios de Löwenstein-Jensen o de Middlebrook (véase lámina en color 19-1G y H).
2. Aparición de microcolonias luego de 5 a 10 días de incubación en los agares de Middlebrook 7H10 o 7H11, con formación de cordones en serpentina debido a la producción del "factor cordón" (véase lámina en color 19-1C e I).
3. Acumulación de niacina (*M. simiae*, algunas cepas de *M. bovis* y cepas ocasionales de *M. marinum* y *M. chelonae* también pueden ser niacina positivas); por lo tanto, se debe utilizar esta característica junto con los otros hallazgos (véase lámina en color 19-1D).
4. Reducción de nitratos a nitritos (véase lámina en color 19-1E).
5. Capacidad para crecer en presencia de hidrazida de ácido tiofeno-2-carboxílico (T2H; véase lámina en color 19-1F).
6. Falta de actividad de catalasa.

Cuadro 19-9 Extensiones o niveles de servicio autodeterminados por el laboratorio según lo propone el College of American Pathologists y la American Thoracic Society

EXTENSIONES DE SERVICIO DEL COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS PARA LA PARTICIPACIÓN EN LOS ESTUDIOS DE COMPARACIÓN INTERLABORATORIO PARA MICOBACTERIAS	NIVELES DE SERVICIOS DE LA AMERICAN THORACIC SOCIETY PARA LOS LABORATORIOS DE MICOBACTERIAS
1. No se realizan procedimientos para micobacterias	Nivel I 1a. Recogen muestras clínicas suficientes, que incluyen esputos inducidos por nebulizaciones 1b. Transportan las muestras a un laboratorio de nivel superior para el aislamiento y la identificación 1c. Pueden preparar y examinar frotis para el diagnóstico presuntivo o como medio de seguir el progreso de los pacientes diagnosticados que reciben tratamiento antibiótico
2. Tinción ácido-alcohol resistente de exudados, derrames y líquidos corporales, con inoculación y derivación de los cultivos a laboratorios de referencia para una mejor identificación	Nivel II 2a. Pueden realizar todas las funciones de los laboratorios de nivel I y procesar muestras como sea necesario para cultivo en medios estándares basados sobre agar y huevo 2b. Identifican <i>M. tuberculosis</i> 2c. Se pueden realizar estudios de sensibilidad a fármacos contra <i>M. tuberculosis</i> con agentes antituberculosos primarios 2d. Retienen los cultivos de micobacterias durante un tiempo razonable
3. Aislamiento de micobacterias; identificación de <i>M. tuberculosis</i> e identificación preliminar de las formas atípicas como fotocromógenos, escotocromógenos, no fotocromógenos y bacilos de crecimiento rápido. Se pueden realizar o no pruebas de sensibilidad a los fármacos 4. Identificación definitiva de las micobacterias aisladas en la medida necesaria para establecer un diagnóstico clínico correcto y ayudar en la selección de un tratamiento seguro y eficaz. Se realizan pruebas de sensibilidad a los fármacos	Nivel III 3a. Pueden realizar todas las funciones de los laboratorios de los niveles inferiores e identificar todas las especies de <i>Mycobacterium</i> de las muestras clínicas 3b. Realizan estudios de sensibilidad a fármacos contra micobacterias 3c. Retienen cultivos de micobacterias durante un tiempo razonable 3d. Pueden llevar a cabo una investigación y proporcionar entrenamiento

7. Inhibición selectiva del crecimiento en medios de cultivo en caldo que contienen NAP (véanse los detalles de este procedimiento en el protocolo 19-4).

La inhibición de NAP por *M. tuberculosis* se utiliza en muchos laboratorios como prueba clave para las identificaciones iniciales, sobre todo para los aislamientos en hemocultivos. NAP inhibe selectivamente el crecimiento de *M. tuberculosis*, y en el sistema BACTEC, la capacidad del microorganismo para liberar $^{14}\text{CO}_2$ del ácido palmítico 1- ^{14}C radiactivo contenido en el medio. En los sistemas de cultivo en caldo también se utiliza NAP para la inoculación de otras muestras frotis positivas para aumentar el aislamiento y acortar el tiempo hasta la detección. Aunque la identificación definitiva de la mayoría de las cepas de micobacterias NAP negativas requiere el aislamiento y la caracterización por el espectro de pruebas explicadas antes o métodos moleculares, los aislamientos que también producen microcolonias con formación de cordones serpentinos en agar 7H109 pueden ser identificarse presuntivamente como *M. tuberculosis* y confirmarse luego con otros estudios (véase lámina en color 19-1C). Las colonias aparecen "rugosas y color beige" después de 2-4 semanas de incubación en el medio de Löwenstein-Jensen (LJ). Estas observaciones son criterios suficientes para justificar el comienzo del tratamiento empírico cuando está indicado desde el punto de vista clínico.

La morfología celular típica de *M. tuberculosis* como se observa en las tinciones ácido-alcohol resistentes es un bacilo

delgado, ligeramente curvo que mide $0,3-0,6 \times 1-4$ mm, de tinción rojo intenso (fuertemente ácido-alcohol resistente), con un aspecto arrosariado definido (véase lámina en color 19-1B). En la preparación de los frotis provenientes de cultivos, a menudo es difícil dispersar las células individuales, las cuales parecen agregados irregulares o se ubican en bandas paralelas. Se pueden observar cordones definidos en las preparaciones de cultivos de caldo, en donde los agregados de bacilos ácido-alcohol resistentes forman largos cordones en serpentina. Se pueden observar micobacterias en la tinción de Gram como bacilos arrosariados grampositivos. El aspecto arrosariado se debe a la tinción no uniforme del bacilo. También se puede sospechar la presencia de una especie de *Mycobacterium* en las tinciones de Gram si se observan bacilos que se tiñen poco o nada rodeados por un halo claro (véase lámina en color 19-1J). El colorante violeta de genciana en el reactivo de la tinción de Gram no penetra la gruesa pared celular lipídica y cerosa de los microorganismos y pueden aparecer como una imagen arrosariada o casi negativa contra el fondo contrateñido.

Mycobacterium bovis. En la actualidad, *Mycobacterium bovis* está incluido en el complejo *M. tuberculosis*. Las características fenotípicas por las cuales *M. bovis* puede ser diferenciado de las cepas clásicas de *M. tuberculosis* son las siguientes:

1. La mayoría de las cepas son niacina negativas.
2. Los nitratos no se reducen a nitritos.
3. No se produce pirazinamidas.

Recuadro 19-4 Especies de *Mycobacterium*: orden de presentación**Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

M. tuberculosis
M. bovis
M. africanum
M. ulcerans (genéticamente relacionado con *M. marinum*)

Fotocromógenos

M. kansasii
M. marinum
M. simiae
M. genavense (genéticamente relacionado con *M. simiae* pero no cromógeno)
M. asiaticum

Escotocromógenos

M. scrofulaceum
M. szulgai (fotocromógeno a 25 °C)
M. xenopi
M. celatum
M. gordonae
M. flavescens

No fotocromógenos

Complejo *M. avium-intracellulare*
M. paratuberculosis
M. terrae y *M. triviale*
M. shimoidae

De crecimiento rápido

M. fortuitum
M. chelonae
M. abscessus
M. thermoresistibile

4. Inhibición selectiva del crecimiento por T2H; *M. bovis* no crece en un medio que contiene T2H.

Las cepas humanas clásicas tienen un ritmo de crecimiento muy lento, y producen colonias de aspecto “disgónico” en el medio de LJ. Por lo tanto, puede surgir un problema para reconocer *M. bovis* en los laboratorios donde se descartan los cultivos LJ después de 4 semanas, porque a menudo se necesitan 6 a 8 semanas para un crecimiento visible. El crecimiento de la mayoría de las cepas es mejor en el medio de LJ que en el medio de Middlebrook 7H11 o equivalentes. El medio más favorable para *M. bovis* contiene piruvato al 0,4% sin glicerol. Las colonias típicas son de color *beige*, bajas y pequeñas, y pueden parecer lisas o rugosas en el medio que contiene huevo. En agar de Middlebrook 7H11, las colonias son muy delgadas y a menudo muestran poca o ninguna formación de bandas (denominada “similar a gotitas de agua”). Estas colonias también pueden simular formas disgónicas de microorganismos en el complejo MAI. Sin embargo, los últimos son catalasa posi-

tivos a 68 °C, no producen ureasa y son pirazinamidasa positivos. Si se ha agregado piruvato al medio, las colonias pueden mostrar cordones serpentinados similares a los de *M. tuberculosis* eugónico.

Algunas cepas de laboratorio de *M. bovis*, conocidas como BCG (bacilo de Calmette-Guérin), utilizadas como vacuna en regiones altamente endémicas del mundo, simulan *M. tuberculosis* por ser “eugónicas” o tener un crecimiento más rápido (3 a 4 semanas en el medio de LJ), presentar un aspecto rugoso y de color *beige* y, en algunos casos, acumular niacina. Sin embargo, estas cepas siguen siendo sensibles al T2H y se las puede diferenciar sobre esa base.¹¹⁶ La morfología microscópica de las células de *M. bovis* en los frotis con tinción para ácido-alcohol resistentes no es característica.

FOTOCROMÓGENOS

***Mycobacterium kansasii*.** *M. kansasii* es una causa importante de enfermedad pulmonar que puede asemejarse desde el punto de vista clínico e histopatológico a la tuberculosis. Sin embargo, la enfermedad pulmonar debida a *M. kansasii* no tiene las mismas consecuencias para la salud pública que la tuberculosis y no es transmitida de una persona a otra. Conocido en un principio como el “bacilo amarillo”, luego de la primera descripción de Buhler y Pollak en 1953, *M. kansasii* es un fotocromógeno clasificado dentro del grupo I de Runyon. Aunque ocurren infecciones en todos los Estados Unidos, la mayoría de los casos han sido comunicados en los estados del sur (Texas, Louisiana y Florida), el medio oeste (Illinois) y California. Kim y cols. informaron una declinación en la incidencia global de la enfermedad en ese país en la última década.¹⁷⁵ Los varones se infectan más a menudo que las mujeres, con un cociente de aproximadamente 3:1. La enfermedad es infrecuente en los niños y en los individuos con ingresos más altos y mejores estándares de vida.³⁰¹

Características de laboratorio. Las cepas típicas de *M. kansasii* crecen casi al mismo ritmo o algo más rápidamente que *M. tuberculosis* a 37 °C. El rasgo característico es la dependencia de la exposición a la luz para la producción de un pigmento amarillo visible (véase lámina en color 19-2C y D) y la formación de cristales de caroteno rojizos con una incubación prolongada. En los casos típicos, las colonias son intermedias entre completamente rugosas y completamente lisas; sin embargo, algunas cepas son completamente una o la otra. Las microcolonias muestran centros elevados con bandas curvas de bacilos en los bordes externos más delgados que pueden confundirse con la formación de cordones serpentinados de *M. tuberculosis*. El grupo de propiedades fenotípicas, además de la fotocromogenicidad, por el cual se puede confirmar la identificación de *M. kansasii* incluye:

1. Hidrólisis rápida de Tween dentro de los 3 días.
2. Fuerte reducción de nitrato a nitrito.
3. Reacción rápida de catalasa, que incluye la prueba a 68 °C.
4. Actividad fuerte de pirazinamidasa.

Menos a menudo, se pueden hallar cepas escotocromógenas o no cromógenas, que incluyen algunas cepas con baja actividad de catalasa. En los casos característicos, las células bacterianas en los frotis ácido-alcohol resistentes son largas y anchas y definidamente con bandas transversales o enrejado (véase lámina en color 19-2M), tal vez por la utilización del material graso del medio. Aunque los micobacteriólogos experimentados pueden hacer una identificación presuntiva sobre la base de

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-1 *Mycobacterium tuberculosis*

El aislamiento de *M. tuberculosis* de muestras clínicas casi siempre se asocia con infección y se sabe que la tuberculosis es una enfermedad altamente transmisible. La mayoría de las infecciones comienzan en los pulmones donde se pueden observar infiltrados difusos, finamente nodulares o focales, que predominan en las porciones apicales de los lóbulos superiores, pero que también se extienden a otros focos en la forma miliar o como tuberculosis exudativa progresiva (véase lámina en color 19-3A). Son frecuentes las lesiones cavitarias, sobre todo en las regiones apicales de los lóbulos superiores y se puede observar un tuberculoma solitario o una "lesión numular" que puede formar parte del complejo de oro de Gohn (véase lámina en color 19-3B y C). Son frecuentes los brotes en poblaciones cerradas como escuelas, barcos y grupos familiares hacinados. En ciertas poblaciones ocurre la propagación diseminada o miliar de la infección, por lo habitual en personas con desnutrición, inmunosupresión u otras enfermedades debilitantes crónicas. Jereb y cols., utilizando el estudio de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) por PCR, pudieron rastrear la fuente de un brote de *M. tuberculosis* en 10 receptores de trasplantes de riñón de un hospital hasta un único paciente que tuvo una exposición postrasplante en otro hospital antes del traslado.¹⁵⁸ El tiempo medio de incubación para el inicio de la tuberculosis en los receptores de trasplantes renales con infecciones recientes fue de 7,5 semanas. Esta situación muestra de qué modo las nuevas técnicas moleculares pueden ser útiles para detectar fuentes puntuales de tuberculosis de manera que se pueda implementar un aislamiento temprano para evitar la transmisión hospitalaria de la enfermedad.

Las infecciones por *M. tuberculosis* son más frecuentes en las personas que participan en las siguientes ocupaciones:⁵⁶

1. Individuos con exposición ocupacional a tuberculosis: directores de funerarias y personal sanitario.
2. Individuos con exposición ocupacional al sílice: trabajadores de la construcción, albañiles y obreros que trabajan con ladrillo y piedra, carpinteros, operadores de máquinas para minería.
3. Ocupaciones de bajo nivel socioeconómico: preparación de los alimentos y empleados de servicios.
4. Riesgo desconocido: operarios de granjas, corredores y mecánicos de automóviles, carniceros, artistas.

La tuberculosis por reactivación o del tipo adulto es un proceso inflamatorio lentamente progresivo en los pulmones, caracterizado por una inflamación granulomatosa crónica intensa, casi siempre con la formación de muchas células gigantes de tipo Langhans, necrosis y caseificación, con una tendencia del proceso a erosionar los bronquios (véase lámina en color 19-3D). Cuando una cavidad se rompe, gran cantidad de bacilos tuberculosos se propagan hacia nuevos focos dentro del pulmón, y si la cavidad se rompe hacia un bronquio puede producirse una expectoración profusa, lo que potencialmente infecta a otros bronquios que se encuentran en las proximidades. Los signos y síntomas clínicos habituales de la tuberculosis pulmonar progresiva crónica son tos, pérdida de peso, fiebre leve, disnea y dolor torácico. Ésta es una descripción del tipo de tuberculosis producida por reactivación secundaria. En los pacientes con SIDA, la enfermedad recuerda más una tuberculosis progresiva primaria, y se caracteriza por una progresión más rápida, septicemia y diseminación miliar, menos fibrosis y caseificación focal, y diseminación miliar que afecta a cualquier órgano del cuerpo.

La meningitis tuberculosa es relativamente rara en los Estados Unidos y ocurre casi siempre como complicación de la tuberculosis pulmonar primaria. Los pacientes pueden estar asintomáticos, presentar cefaleas vagas, cambio del sensorio o, pocas veces, progresión con manifestaciones de meningitis grave. En la mayoría de los casos, estará alterada una de las tres mediciones de laboratorio del líquido cefalorraquídeo: aumento del recuento celular, habitualmente linfocitosis; disminución de las concentraciones de glucosa o aumento de las concentraciones de proteínas, aunque cualquiera de estos parámetros puede ser normal. En raros casos, los tres parámetros pueden ser normales, lo que brinda pocas pruebas objetivas para establecer el diagnóstico. Se pueden observar microorganismos ácido-alcohol resistentes en muestras centrifugadas en alrededor del 40% de los casos; este porcentaje es mayor cuando se realizan más extracciones de líquido cefalorraquídeo. Desde el punto de vista patológico, la afectación meníngea es más pronunciada en la base del encéfalo, donde los cambios visibles varían desde una opacidad difusa hasta la presencia de un exudado gelatinoso grueso, que se observa primariamente en el área que cubre la protuberancia y adyacente al quiasma óptico (véase lámina en color 19-3E).

Tradicionalmente se considera que la septicemia por *M. tuberculosis* es rara; sin embargo, Bouza y cols., en un estudio de 285 pacientes con tuberculosis probada por cultivos en los cuales se obtuvieron hemocultivos, observaron que 50 (14%) tenían bacteriemia.²⁹ De éstos, el 81% estaba infectado por HIV. En 14 pacientes, la sangre fue la primera muestra en la cual se aislaron microorganismos. Archibald y cols., cuando estudiaron a 517 pacientes con posibles infecciones del torrente circulatorio adquiridas en la comunidad en el África subsahariana, observaron que de los 145 pacientes con infección circulatoria comprobada, el 81% de los cuales estaba infectado por HIV, el patógeno aislado más a menudo fue *M. tuberculosis*, con un 39%.⁸

Más del 93% de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes no tratados son sensibles a los antituberculosos y responden con rapidez al tratamiento con dos o, de preferencia, tres fármacos. Más adelante en este capítulo se presentan las pruebas de sensibilidad de las micobacterias.

la tinción ácido-alcohol resistente, la determinación de las propiedades fenotípicas suele ser necesaria y se recomienda antes de hacer una identificación definitiva.

***Mycobacterium marinum*.** En 1926, mientras investigaba enfermedades infecciosas en peces de agua salada, Aronson descubrió una especie nueva de *Mycobacterium*, más tarde denominada *Mycobacterium marinum* ("del mar").^{10,376} El microorganismo también ha sido denominado *M. platypoecilus* por las infecciones observadas en los peces *platys* mexicanos y como *M. balnei* (nombre que se refiere al baño o al balneario). Todos son el mismo microorganismo.

Características de laboratorio. Cuando *M. marinum* se aísla en muestras clínicas crece en condiciones óptimas a 30 °C a 32 °C. El crecimiento es bajo, o no ocurre en absoluto, a 37 °C. Sin embargo, los subcultivos pueden crecer a esa temperatura.

Las colonias aparecen en 8 a 14 días; las que crecen en la oscuridad pueden parecer no pigmentadas. Cuando se expone a la luz, se desarrolla una pigmentación amarilla intensa. Las colonias varían entre estriadas y rugosas hasta lisas y hemisféricas, sobre todo si crecen en medios 7H10 o 7H11 (que contiene ácido oleico y albúmina). Desde el punto de vista microscópico, las células son bacilos relativamente largos con barras cruzadas frecuentes.

Por lo tanto, la fotocromogenicidad y la preferencia por el crecimiento a 30 °C son indicios iniciales para la identificación de *M. marinum*. Las siguientes son otras características por las cuales se puede hacer una identificación definitiva:

1. Algunas cepas pueden acumular niacina.
2. Los nitratos no se reducen a nitritos.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-2 *Mycobacterium bovis*

M. bovis causa tuberculosis típicamente en el ganado vacuno, pero puede infectar también otros animales, como perros, gatos, cerdos, conejos y tal vez, algunas aves de presa. Fanning y Edwards rastrearon 446 contactos de seres humanos con alces domesticados en Alberta, Canadá. 81 de los cuales tenían pruebas cutáneas positivas para *M. bovis*.⁹⁰ De éstos, 50 habían estado en contacto con animales con cultivos positivos, incluido un caso de infección pulmonar activa por *M. bovis* diagnosticada por una muestra de esputo positiva. Con los ensayos de huellas moleculares del DNA con IS6110 como marcador genético, Van Soolingen y cols. pudieron determinar que las cepas de *M. bovis* que causaban infección humana en la Argentina fueron transmitidas por el ganado vacuno, mientras que las que causaban enfermedad humana entre los individuos que vivían en Holanda fueron contraídas de animales distintos del ganado vacuno (varios animales salvajes y de zoológico).³⁶⁰ En algunas regiones de Escocia y el este de Europa, donde el ganado vacuno y las granjas lecheras siguen siendo el principal sustento, *M. bovis* puede constituir aun hasta el 39% de todos los casos de tuberculosis.³⁸⁶ La tuberculosis pulmonar bovina humana se asemeja estrechamente a la causada por *M. tuberculosis*, en deferencia a Robert Koch, cuya fama al final menguó entre sus colegas a medida que sostuvo firmemente la posición de que la tuberculosis bovina causaba sólo enfermedad intestinal en los seres humanos. En la actualidad se sabe que estas dos especies forman parte de un complejo y la tuberculosis pulmonar por *M. bovis* se trata en forma similar a la enfermedad causada por *M. tuberculosis*.

Durante la época en que los seres humanos ordeñaban a las vacas a mano, mucho más que en la actualidad, eran frecuentes las infecciones cutáneas de los dedos, a menudo con osteomielitis y artrosis subyacentes (véase lámina en color 19-3F). Un sitio frecuente de aislamiento de *M. bovis* en los laboratorios clínicos es en las muestras de orina, ya que la cepa del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se utiliza en irrigaciones vesicales como estimulante inmunológico para el tratamiento del carcinoma de las células uroteliales. Se debe considerar esta posibilidad cuando se aísla una micobacteria de crecimiento lento en muestras de orina, y cualquiera de estos aislamientos no debe ser considerado como un comensal. En algunos individuos, la cepa BCG por utilizar no está totalmente atenuada y puede causar cistitis.

3. Se hidroliza el Tween.
4. La ureasa es positiva.
5. Se produce pirazinamidasa.
6. No se produce catalasa termoestable.

***Mycobacterium simiae*.** Weiszfeiler y Karczag lo denominaron *M. simiae* en 1969,³⁷⁹ en reconocimiento del primer descubrimiento del microorganismo cuatro años antes por Karassova y cols.,^{378a} en monos *Macaca mulatta* importados a Hungría desde la India. Luego se descubrió que este microorganismo era idéntico a una cepa niacina positiva de una micobacteria del grupo III aislada en Cuba por Valdivia y cols. en pacientes con tuberculosis pulmonar. Estos autores denominaron al microorganismo *M. habana* y más tarde se observó que era el mismo microorganismo que *M. simiae*.³⁷⁵

Características de laboratorio. Las colonias de *M. simiae* se desarrollan en 2 a 3 semanas en medios con base de huevo y en los casos típicos son lisas. La mayoría de las cepas son fotocromógenas. Puede ser necesaria una exposición prolongada a la luz para los aislamientos que no producen pigmento. Las reacciones bioquímicas identificatorias claves son las siguientes:

1. Acumulación de niacina positiva.
2. Hidrólisis de Tween (puede ser lenta y necesita más de 10 días).
3. Actividad elevada de catalasa termoestable.

La escasa reproducibilidad de las reacciones de la prueba por algunas cepas puede hacer algo difícil la identificación. Algunas cepas de *M. simiae* pueden ser confundidas con miembros del grupo *M. avium*/*M. intracellulare*/*M. scrofulaceum* (MAIS).

***Mycobacterium asiaticum*.** *Mycobacterium asiaticum* es de muchas formas fenotípicamente similar a *M. gordonae*; ambos tienen actividad alta de catalasa, hidrolizan el Tween 80 y son negativos para ureasa y reducción de nitrato.³⁷⁶ Sin embargo, es fotocromógeno. También es bioquímicamente similar a *M. simiae*, salvo en que es niacina negativo. *M. asiaticum* tiene un perfil de rRNA 16S distinto, lo que justifica su condición de especie separada.³²⁹

Han aparecido raros casos de infección humana en la bibliografía. La primera indicación de que este microorganismo podría ser patógeno fue en un informe de Australia de Blacklock.²³ Dos de los cinco pacientes tuvieron una enfermedad pulmonar cavitaria progresiva; tres no tenían pruebas de una enfermedad pulmonar progresiva y se pensó que los aislamientos del esputo representaban la colonización secundaria. El primer caso de infección pulmonar causado por *M. asiaticum* en los Estados Unidos fue aislado en un hombre de 62 años que vivía en Los Ángeles.³⁴² También se han comunicado cuatro aislamientos en la Florida.¹⁰⁹ Dawson y cols. informaron el aislamiento de *M. asiaticum* del líquido aspirado de una bolsa olecraniana en un caso de infección posquirúrgica.⁶⁹ La infección desapareció con drenaje, cambios regulares de vendajes e inmovilización, sin necesidad de tratamiento antibiótico. *M. asiaticum* es fotocromógeno y similar desde el punto de vista bioquímico a *M. simiae*, pero es negativo para la producción de niacina.

ESCOTOCROMÓGENOS

***Mycobacterium scrofulaceum*.** El nombre de la especie *scrofulaceum*, derivado de *escrófula* fue acuñado en 1956 por Prissick y Mason en referencia a la forma más frecuente de enfermedad producida por este microorganismo: la linfadenitis cervical en los niños.²⁶⁹ Sin embargo, *M. scrofulaceum* no es la única micobacteria que produce linfadenitis cervical. Gill y cols. revisaron los casos de 16 niños con esta enfermedad; 6 fueron causados por *M. scrofulaceum*, 4 por *M. tuberculosis* y 4 por el complejo *M. avium*.¹⁰³ Por lo tanto, se necesita el cultivo y la identificación de la especie de los microorganismos aislados. *M. scrofulaceum* se asocia rara vez con el SIDA. Es mucho más probable que las micobacterias aisladas en la linfadenitis cervical en esta población de pacientes sean *M. tuberculosis* o miembros del complejo MAI.

Kirschner y cols. aislaron gran cantidad de *M. scrofulaceum* en agua de pantano en varios lugares de Georgia, West Virginia y Virginia, lo que indicó que es probable que las fuentes de agua ambientales estén relacionadas con la mayor incidencia de infecciones por *escrófula* observada en estas regiones.¹⁷⁹ Se observaron altas concentraciones de microorganismos en agua tibia con bajo pH, bajo contenido de oxígeno disuelto, altas concentraciones de cinc soluble y concentraciones elevadas de los ácidos húmico y fúlvico.

Características de laboratorio. Las colonias de *M. scrofulaceum* crecen lentamente (4 a 6 semanas) a distintas tempera-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-3 *Mycobacterium kansasii*

La enfermedad pulmonar crónica que simula la tuberculosis clásica es la manifestación más frecuente y afecta clásicamente los lóbulos superiores. Se aprecia cavitación con formación de cicatrices en la mayoría de los casos y la enfermedad es lentamente progresiva.³⁰¹ Las infecciones extrapulmonares o diseminadas son menos frecuentes, aunque se han comunicado casos de linfadenitis similares a una escrófula, infecciones cutáneas similar a esporotricosis, osteomielitis, infecciones de tejidos blandos y tenosinovitis. Dillon y cols. en particular citan el daño progresivo de las estructuras profundas de la muñeca y la mano que puede ocurrir en casos de tenosinovitis.⁷⁴ Se puede observar una enfermedad diseminada en presencia de inmunosupresión grave y se ha informado en pacientes con SIDA. Jacobson e Isenberg comunicaron un caso relacionado con SIDA de neumonitis intersticial granulomatosa difusa causada por *M. kansasii*, pero informaron que sólo el 0,2% de los pacientes con SIDA tienen infecciones superpuestas por ese microorganismo.¹⁵³ Sin embargo, Valanis y cols., en Louisiana, una región endémica para *M. kansasii*, en una revisión de 60 meses de pacientes que asistieron a dos centros importantes de derivación en New Orleans, observaron que el 31,9% de los pacientes con infección por HIV-1 estaban infectados, además, por *M. kansasii*.³⁵⁹ En un estudio retrospectivo de 35 pacientes llevado a cabo en Kansas City, la incidencia de infecciones por *M. kansasii* en los pacientes con SIDA fue tres veces más alta que las infecciones por *M. tuberculosis*.¹⁴ La mayoría de los pacientes respondieron a varias combinaciones diferentes de antituberculosos que incluyeron isoniazida, rifampicina, etambutol y ciprofloxacina. Algunos pacientes toleraron mal el tratamiento; se desarrolló una hepatitis inducida por isoniazida en uno. Los autores recomiendan utilizar al menos dos agentes activos, como etambutol y rifampicina.

En general, las infecciones por *M. kansasii* en los pacientes con SIDA ocurren durante los últimos estadios, cuando los recuentos de linfocitos CD4 son inferiores a 50, con complicaciones graves y potencialmente mortales en muchos casos. Levine y Chaisson revisaron a 19 pacientes con *M. kansasii* e infección por HIV, 14 de los cuales tenían una infección pulmonar exclusiva, tres enfermedad pulmonar y extrapulmonar y dos afectación extrapulmonar exclusiva.²⁰³ Todos los pacientes con infección pulmonar presentaron fiebre y tos de por lo menos 2 semanas de evolución. En las radiografías de tórax se observaron infiltrados focales en los lóbulos superiores, infiltrados intersticiales difusos o lesiones cavitarias de paredes delgadas o una combinación de ellas. Nueve pacientes que recibieron tratamiento antituberculoso mostraron la resolución de la fiebre y los síntomas respiratorios, con desaparición de los infiltrados radiológicos. Se han informado otros casos de infecciones por *M. kansasii* relacionados con el SIDA.^{137,306} En un caso, se observaron granulomas caseificados en la pared intestinal y en los ganglios linfáticos mesentéricos, con acumulación de histiocitos espumosos que se asemejaba a la enfermedad de Whipple. Giladi y cols. comunicaron un caso de peritonitis por *M. kansasii* asociada con catéter en una mujer de 62 años que se sometió a una diálisis peritoneal ambulatoria continua, presumiblemente la primera comunicación de uno de estos casos.¹⁰² Se logró una buena respuesta con terapia combinada de isoniazida y rifampicina y extracción del catéter. Tortoli y cols. observaron un grupo de cepas de *M. kansasii* que no hibridaron con la prueba de identificación por cultivo para *M. kansasii* AccuProbe (Gen Probe, San Diego, CA) y que se asociaron definitivamente con el estado del SIDA.³⁵⁴ Esto sugiere que *M. kansasii* puede diferir en virulencia y que pueden ser necesarias otras pruebas para la identificación de cepas AccuProbe-negativas.

Se han comunicado cepas de *M. kansasii* resistentes a la rifampicina. Wallace y cols. informaron sobre 36 pacientes en quienes se había aislado *M. kansasii* resistente a la rifampicina, el 90% de los cuales había recibido antes tratamiento con este agente.³⁶⁷ Sin embargo, la mayoría de los pacientes respondieron al régimen de cuatro agentes, sobre la base de los estudios de sensibilidad in vitro, y los cultivos de esputo se volvieron negativos en el 90% de los tratados en una media de 11 semanas.

turas (25 °C, 31 °C y 37 °C) y producen colonias típicamente lisas, de consistencia untuosa, globoides, con pigmentación que varía desde el amarillo claro hasta el anaranjado intenso (véase lámina en color 19-2D). La producción de pigmento no depende de la exposición a la luz; por lo tanto, el microorganismo es incluido en el grupo II de escotocromógenos de Runyon.

Las reacciones de pruebas bioquímicas claves incluyen las siguientes:

1. Falta de hidrólisis de Tween.
2. Los nitratos no se reducen a nitritos.
3. La prueba de la catalasa a 68 °C es positiva.
4. Se produce ureasa.

Otros escotocromógenos de crecimiento lento incluyen algunas cepas del complejo MAI, *M. gordonae* y *M. szulgai*. Se evalúa la hidrólisis del Tween (los dos últimos dan una prueba positiva [*M. szulgai* puede requerir 7 días o más], mientras que *M. scrofulaceum* es negativo) y la actividad de la ureasa (*M. scrofulaceum* hidroliza la urea, mientras que las otras especies, incluidas las cepas pigmentadas del complejo *M. avium*, son negativas). Dos grupos de microorganismos pigmentados dentro del complejo MAI, intermedios en reactividad bioquímica con *M. scrofulaceum*, han sido designados con el término complejo MAIS.¹²⁷ Un grupo de microorganismos MAIS produce una columna de espuma de más de 45 mm en la prueba de catalasa semicuantitativa y es ureasa negativo; el otro es catalasa negativo pero ureasa positivo.

***Mycobacterium szulgai*.** *M. szulgai*, comunicado oficialmente como una especie en 1972 por Marks y cols., recibe ese nombre en honor al microbiólogo polaco T. Szulga.^{215,375} La característica singular de esta especie es la producción de pigmento dependiente de la temperatura. Cuando crece a 37 °C, el microorganismo es escotocromógeno, mientras que es fotocromógeno cuando crece a temperatura ambiente (25 °C). Por lo tanto, para evaluar la fotocromogenicidad de una cepa desconocida de *M. szulgai*, se deben incubar las placas expuestas a la luz a temperatura ambiente y no a 37 °C. El pigmento escotógeno producido a la temperatura más alta enmascarará cualquier cambio para visualizar todo pigmento fotogénico que pueda producirse (véase protocolo 19-6).

Características de laboratorio. El crecimiento es relativamente rápido y se desarrollan colonias lisas o rugosas dentro de las 2 semanas a 37 °C. Se puede observar un pigmento anaranjado, que se intensifica con la exposición a la luz continua. En los preparados de frotis ácido-alcohol resistentes, las células bacterianas aparecen como bacilos moderadamente largos, con ciertas barras transversales, que recuerdan a *M. kansasii*.

Las reacciones de las pruebas bioquímicas claves para *Mycobacterium szulgai* son las siguientes:

1. Hidrólisis lenta de Tween.
2. Nitratos reducidos a nitritos.
3. Actividad de catalasa positiva.
4. Intolerancia a NaCl al 5%.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-4 *Mycobacterium marinum*

Las infecciones típicas por *M. marinum* afectan la piel y suelen ocurrir cuando la piel traumatizada entra en contacto con agua dulce o salada insuficientemente clorada (piscinas, acuarios de peces tropicales, torres de enfriamiento de agua). Fisher comunicó tres casos de infecciones cutáneas en salvavidas, y cita esta infección como un peligro del oficio.⁹³ En el artículo de este autor se incluyen buenas fotografías en color de las lesiones cutáneas. Varios casos se observaron en Denver, Colorado, en la década de 1950, secundarios a la contaminación masiva de una piscina de un balneario en la comunidad montañosa de Glenwood Springs. Hoyt y cols. comunicaron varias infecciones de tejidos profundos y tenosinovitis destructiva entre pescadores del área de la Bahía de Chesapeake.¹⁴¹ Otras varias citas de infecciones cutáneas profundas, casi siempre de las manos y asociadas comúnmente con la actividad acuática, como limpieza de peces, incluyen un caso de tenosinovitis, artritis y bursitis, y osteomielitis.^{17,48,143} Puede ser eficaz la antibioticoterapia con cierta combinación de fármacos, como rifampicina y etambutol, pero a menudo puede ser necesaria la cirugía. Es menos probable que la antibioticoterapia sea eficaz en los pacientes que fueron tratados con corticosteroides inyectables y evitar estos fármacos es la clave para el manejo exitoso.^{48,162}

Algunos pacientes presentan lesiones similares a la esporotricosis, con propagación linfática centripeta desde el área ulcerada del sitio primario de inoculación.²⁴⁶ Más típicamente, las lesiones se presentan como nódulos subcutáneos dolorosos a la palpación, rojos o azul rojizos, que afectan el codo, la rodilla, el dedo del pie y el dedo de la mano ("granuloma de la piscina"). Estas lesiones pueden confundirse con nódulos reumatoideos.¹¹ Estos autores citan otros casos de infecciones subcutáneas profundas, que en algunos casos afectan bolsas subcutáneas, vainas tendinosas, articulaciones y hueso.

En general, el tratamiento está dirigido a resecar las lesiones primarias siempre que sea posible (curetaje, electrodesecación, escisión). Puede ser necesario el tratamiento antituberculoso para curar los casos crónicos en los cuales se aprecia la propagación linfática. La mayoría de las cepas son sensibles a la rifampicina y el etambutol, pero resistentes a la isoniazida y la estreptomina.

***Mycobacterium xenopi*.** *M. xenopi* (*Xenopus*, un género de rana), fue aislado por primera vez en un sapo africano.³⁷⁵ Las aguas corrientes calientes y frías, como las de los tanques de almacenamiento de agua y los generadores de agua corriente de los hospitales, son fuentes potenciales para las infecciones hospitalarias. Antes considerado no patógeno, *M. xenopi* ha sido incriminado en varias infecciones. Wolinski comunicó 50 casos de infecciones humanas por *M. xenopi*, fundamentalmente en Inglaterra, Francia, Dinamarca, Australia y los Estados Unidos.³⁹³ Las aves que frecuentan las regiones costeras en Gran Bretaña constituyen un reservorio importante.

Características de laboratorio. Las colonias de *Mycobacterium xenopi* son de crecimiento lento, pequeñas, erectas y producen un pigmento amarillo característico (algunas cepas ocasionales son no pigmentadas). El crecimiento es más lento a 42 °C que a 37 °C y está ausente a 25 °C. Si bien antes fueron incluidas con las micobacterias no fotocromógenas, las colonias de pigmento amarillo brillante que suelen hallarse en aislamiento primario sugieren que sería mejor considerar al microorganismo con los escotocromógenos. Las colonias tienden a ser rugosas y puede observarse un micelio aéreo. El examen de microcolonias jóvenes en agar 7H10 pone en evidencia un aspecto característico en "nido de ave", con proyecciones en forma de palillos. Se presentan ramificación y extensiones fila-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-5 *Mycobacterium simiae*

Los informes de infección humana por *M. simiae* son relativamente pocos. Se han citado comunicaciones de infecciones pulmonares que ocurren en Francia, Israel, Tailandia y los Estados Unidos.²⁰⁴ Estos autores comunicaron un caso de un hombre de 43 años con SIDA en el cual se desarrolló una infección diseminada por micobacterias. Se aislaron microorganismos en sangre, líquido yeyunal, y biopsias duodenales y rectales. Aunque se han informado algunos otros casos de infecciones por *M. simiae* en pacientes con SIDA, la asociación es infrecuente y no sirve como marcador.²⁵⁷ La experiencia israelí con *M. simiae* es interesante, ya que se aislaron 399 cepas en 287 personas durante el período de 1975 a 1981, principalmente entre los habitantes de la llanura costera de Tel Aviv.¹⁹⁸ La mayoría de los aislamientos eran microorganismos comensales relacionados con fuentes de agua ambientales. Se produjeron algunas infecciones pulmonares entre los pacientes, de los cuales se aislaron diversas cepas, que complicaron trastornos pulmonares crónicos preexistentes.

Se informaron dos casos de enfermedad diseminada, con afectación renal luego de una infección pulmonar.²⁰⁴ Aunque la mayoría de las cepas de *M. simiae* son resistentes a los antituberculosos en las pruebas in vitro, se informó un caso de enfermedad intraabdominal que fue tratado con éxito con antibioticoterapia combinada.¹³²

mentosas en las colonias más antiguas, sobre todo en las que crecen en agar harina de maíz glicerol. Desde el punto de vista microscópico, los frotis ácido-alcohol resistentes muestran bacilos filamentosos largos aguzados en ambos extremos, con tendencia a disponerse en empalizada.

Las reacciones de prueba bioquímicas claves para *Mycobacterium xenopi* son las siguientes:

1. Crecimiento óptimo a 42 °C.
2. Pigmento escotocromógeno amarillo.
3. Sin acumulación de niacina.
4. Reducción de nitrato negativa.
5. Catalasa producida sólo a 68 °C.
6. Arilsulfatasa positiva.
7. Pirazinamidasa positiva.

***Mycobacterium celatum*.** *M. celatum* es el nombre propuesto para esta especie de *Mycobacterium* por Butler y cols.³⁵ Se asemeja más estrechamente a *M. xenopi* (de hecho, no fue descubierto hasta hace poco porque estaba oculto [*celatum*, "ocultar"] entre cepas de MAI y *M. xenopi*) y sólo difiere por su escaso crecimiento a 45 °C, el crecimiento de grandes colonias en agar 7H10 y la producción sólo de cantidades pequeñas del ácido graso 2-docanosol.^{246,353} Esta nueva especie ha sido aislada en cultivos de las vías respiratorias y, menos a menudo, en la sangre, heces y líquido cefalorraquídeo, en cultivos obtenidos de pacientes que residen en distintas localizaciones geográficas, incluidos los Estados Unidos, Finlandia y Somalia. En la comunicación original de Butler y cols., alrededor de un tercio de las cepas se aislaron en pacientes con SIDA.³⁵ También observaron reactividad cruzada para 8 de 20 cepas con *M. tuberculosis* utilizando la sonda de DNA marcada con éster de acridinio, AccuProbe (Gen-Probe, San Diego CA), un problema que, aunque se ha encarado, sigue sin resolución. Esta reactividad cruzada con *M. tuberculosis* y la necesidad de la secuenciación genómica o la cromatografía líquida de alto rendimiento de los ácidos micólicos de la pared celular para hacer

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-6 *Mycobacterium scrofulaceum*

La linfadenitis es el síntoma de presentación clásico de la infección por *M. scrofulaceum*, que ocurre principalmente en niños de 18 meses a 7 años, período en el cual se rompe la barrera de la mucosa bucal para la dentición. La siguiente incidencia mayor de enfermedad ocurre en adultos jóvenes cuando afloran los dientes molares. La linfadenitis es unilateral, afecta los ganglios de la parte superior del cuello adyacentes a la mandíbula y luego por detrás de las orejas (véase lámina en color 19-3G y H). Los ganglios a menudo drenan desde la superficie de la piel sin complicaciones, excepto por grados variados de formación de cicatrices residuales en los sitios de penetración superficial de los trayectos fistulosos. La enfermedad suele afectar a niños sanos; el dolor suele ser mínimo y los síntomas constitucionales están ausentes. Se presume que el sitio de origen es la colonización del microorganismo en la boca y las fauces. Se cree que la alta incidencia de enfermedad entre los niños pequeños está relacionada con la interrupción de las encías durante las erupciones cutáneas, edad durante la cual el sistema inmunitario sigue siendo bastante inmaduro. Sólo se han citado algunos casos de enfermedad pulmonar progresiva y diseminación a otros órganos, sobre todo en pacientes con una enfermedad debilitante grave.³⁰¹ La enfermedad local se trata mejor con incisión quirúrgica y drenaje de los ganglios afectados; sólo pocas veces se necesitan agentes antituberculosos.

Los patrones de sensibilidad varían hacia los agentes antituberculosos y otros antibióticos, como sulfamidas y eritromicina. El tratamiento de las infecciones graves debe comprender el uso de por lo menos tres de los siguientes fármacos: INH, estreptomycin, rifampicina y cicloserina.³⁰¹

una identificación correcta plantean problemas para quienes trabajan en los laboratorios clínicos. Tortoli y cols. informaron dos casos en pacientes con SIDA. En el primer paciente, *M. celatum* fue aislado en múltiples hemocultivos, primero un conjunto de cuatro cultivos positivos, seguido de otro de tres cultivos 9 meses más tarde.³⁵³ El segundo aislamiento se obtuvo en un cultivo de esputo y el trastorno pulmonar del paciente mejoró luego del tratamiento farmacológico combinado con claritromicina, ciprofloxacina y amikacina. Haase y cols. comunicaron un caso de linfadenitis cervical unilateral similar a la escrófula en un niño inmunocompetente.¹²¹

***Mycobacterium gordonae*.** *Mycobacterium gordonae* es una especie de *Mycobacterium* que pocas veces causa infecciones humanas, pero posiblemente sea la micobacteria que se aísla en

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-8 *Mycobacterium xenopi*

La mayoría de los casos humanos de infecciones por *M. xenopi* han sido pulmonares y se asemejan a los observados en pacientes con infecciones por *M. tuberculosis*, *M. kansasii* o MAI. A menudo se observan en las radiografías densidades multinodulares, que muestran cavitación y fibrosis. En general, las infecciones ocurren en pacientes con enfermedad pulmonar preexistente o trastornos predisponentes (alcoholismo, cáncer, diabetes mellitus). Contreras y cols., al revisar 89 casos de pacientes adultos con infecciones pulmonares, comunicaron que *M. xenopi* fue el segundo aislamiento en frecuencia (38% de los casos).⁵⁵ Asimismo, en una revisión de cultivos positivos para micobacterias no tuberculosas, excluido el complejo MAI y *M. gordonae*, de 86 pacientes en el State University of New York Health Sciences Center en Brooklyn, *M. xenopi* fue la especie aislada más a menudo (33 casos).³¹² La mayoría fueron aislamientos de muestras respiratorias en pacientes con SIDA. También se han comunicado 28 aislamientos de *M. xenopi* en pacientes que residían en la provincia de Ontario, Canadá.³¹⁷ En 19 pacientes, el aislamiento se consideró insignificante; nueve provinieron de varones de edad mediana con otras enfermedades pulmonares. En la provincia de Ontario, *M. xenopi* ha sido el segundo patógeno micobacteriano no tuberculoso más frecuente, sólo segundo al complejo MAI.

En general, la propagación intrapulmonar ocurre en pacientes con SIDA; en los casos diseminados, los microorganismos también pueden aislarse en aspirados de médula ósea.¹² Las infecciones por *M. xenopi* se encuentran pocas veces en los pacientes HIV positivos. En dos casos de varones infectados por HIV con infección pulmonar sintomática, se comunicaron sudores nocturnos, tos y dolor pleurítico.¹⁵⁴ Este microorganismo creció en cultivos de múltiples muestras respiratorias obtenidas de cada paciente. Ambos pacientes mejoraron con el tratamiento con múltiples fármacos que incluyó isoniazida y rifampicina, lo cual fue inesperado, aunque en un caso se demostró resistencia in vitro a isoniazida y rifampicina. Se comunicó un caso de infección pulmonar en un receptor de aloinjerto renal de 39 años.³⁷⁷ También se citaron casos aislados de infección extrapulmonar que afectaban hueso, ganglios linfáticos, epidídimo, trayectos fistulosos y una articulación temporomandibular protésica.³⁹³ Se informaron infecciones de la columna lumbar: un paciente fue una mujer de 77 años inmunocompetente que presentó un absceso paravertebral.^{270,274} Se comunicó un brote de 13 casos de infección pulmonar en residentes de un proyecto de alojamiento en Praga.³¹⁹ Se consideró que la fuente puntual era el suministro local de agua, a medida que se aislaron los microorganismos en las canillas de agua en cinco de los pisos. Tortoli y cols. revisaron los casos de 64 cepas de *M. xenopi* aisladas en pacientes que vivían en Florencia, Italia, durante un período de 15 años.³⁵³ La homogeneidad de los patrones bioquímicos, de cultivo y de sensibilidad a los antibióticos de estos aislamientos indica que pueden constituir un foco endémico en el área de Florencia.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-7 *Mycobacterium szulgai*

Maloney y cols. presentaron tres casos de infecciones humanas por *M. szulgai* y revisaron 24 casos comunicados previamente en la literatura antes de 1987.²¹⁴ En dos tercios de los casos se presentaron infecciones pulmonares, y las radiografías de tórax mostraron enfermedad apical unilateral o bilateral, con cavitación, que simulaba *M. tuberculosis*. También se informó un caso de enfermedad pulmonar persistente causada por *M. szulgai*.⁵³ Fiebre, tos, hemoptisis y pérdida de peso fueron los síntomas frecuentes. Las infecciones extrapulmonares por *M. szulgai* citadas en la revisión anterior incluyen bursitis olecránica, tenosinovitis y síndrome del túnel carpiano, osteomielitis y enfermedad cutánea localizada.

los laboratorios clínicos con mayor frecuencia. Se encuentra sobre todo en ambientes acuosos, lo que condujo a la designación alternativa de *M. aquae* o el "bacilo del agua corriente".³⁷⁵

Características de laboratorio. *Mycobacterium gordonae* es un escotocromógeno reconocido fácilmente por las colonias lisas con pigmentación amarilla intensa que se desarrollan luego de 7 días de incubación a 37 °C (véase lámina en color 19-2E y M). El microorganismo hidroliza el Tween 80 y produce una catalasa termoestable; es ureasa negativo y no reduce nitratos a nitritos. Es resistente a isoniazida, estreptomycin y ácido *p*-aminosalicílico pero es sensible a rifampicina y etambutol. Un microorganismo que puede ser confundido desde el punto de vista fenotípico con *M. gordonae* es *M. flavescens*,

que es un escotocromógeno; sin embargo, *M. flavescens* tiene actividad de ureasa y reduce los nitratos a nitritos, dos características no demostradas por *M. gordonae*. *M. flavescens* es un comensal para los seres humanos y no se sabe que produzca enfermedad.³⁷⁵

NO FOTOCROMÓGENOS

Complejo *Mycobacterium avium*/M. *intracellulare*. Las cepas de *M. avium* y *M. intracellulare* se denominan también a menudo complejo MAI (MAC). Este es el mismo microorganismo que produjo un brote de infecciones pulmonares en el Battey State Hospital en Rome, Georgia, en la década de 1950 y durante algún tiempo llevó la designación de "bacilo de Battey". MAI está ampliamente distribuido en el agua, el suelo, el polvo, los animales y las aves de corral. En los seres humanos, se lo consideraba de baja patogenicidad y pocas veces producía enfermedad. Sin embargo, la epidemia de SIDA ha demostrado su patogenicidad en personas con depleción de la inmunidad de células T y en la actualidad sólo se aísla *M. tuberculosis* con más frecuencia que MAI.¹⁰

Los miembros del complejo MAI de bacterias son ubicuos y pueden ser aislados en los estuarios de agua, piscinas, suelos, polvo doméstico, plantas y materiales para jardinería. Las fuentes naturales de agua, incluida el agua potable, plantean un riesgo considerable para la adquisición de infecciones humanas.³⁶⁴ Las aguas con una salinidad moderada (sal al 1-2%) y acidez relativamente alta (pH 4,5 a 6,5) que se localizan a menores altitudes son ideales para la proliferación de los microorganismos MAI.³² Las infecciones humanas por MAI pueden ocurrir por la ingestión de agua y alimentos contaminados (se considera que el aparato digestivo es la vía primaria de infección en los pacientes con SIDA) o por la inhalación de microorganismos contenidos en aerosoles acuosos. Wendt y cols. observaron microorganismos MAI en gotitas de un tamaño de 0,7 a 3,3 mm por encima de las superficies de aguas dulces, suficientemente pequeñas como para alcanzar los espacios alveolares y los microorganismos pueden tener una concentración alta en las corrientes en chorro que emanan de las interfaces aire-agua marina.³⁸¹ Aunque las aves de corral, los cerdos y otras especies de aves y animales se infectan y excretan microorganismos en las heces que se pueden mantener viables durante períodos prolongados en el suelo, la transmisión del animal al ser humano es un acontecimiento raro. La transmisión interhumana también se considera un factor de riesgo mínimo.¹⁴⁹

El complejo MAI tiene una distribución mundial; sin embargo, las regiones endémicas se han hallado en áreas geográficas templadas, que incluyen los Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña, Europa, los Países Bajos y Japón.¹⁴⁹ A partir de una encuesta realizada en 1979 en los Estados Unidos, la prevalencia global de MAI era de 3,2 casos por 100 000 habitantes con una incidencia máxima en Hawái (10,8 casos), Connecticut (8,9 casos), Florida (8,4 casos) y Kansas (6,8 casos).¹¹⁰ Aunque *M. gordonae* es la micobacteria no tuberculosa más frecuente aislada en fuentes humanas, los miembros del complejo MAI son los microorganismos asociados más a menudo con enfermedad humana. Las tasas de infecciones humanas en la población que no tiene SIDA se han mantenido estables o han disminuido ligeramente; en San Francisco, el aumento global en la incidencia de infecciones debidas al complejo MAI corrió paralelo a la incidencia de casos de SIDA al comienzo del curso de la epidemia.¹⁹⁹ Por ejemplo, de los 161 073 casos de SIDA informados a los CDC hasta diciembre de 1990, también se comunicaron más de 12 000 casos de infecciones por micro-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-9 *Mycobacterium gordonae*

Woods y Washington citaron varias comunicaciones aisladas de infecciones por *M. gordonae*: meningitis secundaria a derivaciones ventriculoauriculares, enfermedad hepatoperitoneal, endocarditis en una válvula aórtica protésica, lesiones cutáneas de la mano y posibles casos de afectación pulmonar.¹⁹⁹ El caso de peritonitis en un paciente que se sometió a diálisis peritoneal sugiere que las infecciones por *M. gordonae*, al ser tan prevalentes en el medioambiente, pueden surgir como un problema importante.²⁰⁹ Se piensa que no se lo debe eliminar automáticamente como contaminante cuando se lo aísla en material clínico.³⁷⁸ En junio de 1992 se publicó la clasificación de las características clínicas halladas en 23 casos humanos comunicados de infección por *M. gordonae* que se ajustaban a los criterios de inclusión.³⁷⁸ La distribución por órgano de estos casos previamente comunicados fue la siguiente: pulmones en ocho casos, tejido blando (siete), cavidad peritoneal (tres), córnea (uno) y enfermedad diseminada (cinco). Estos autores comunicaron otro caso de enfermedad diseminada en una niña de 11 años. Se observaron múltiples lesiones granulares redondeadas dispersas en ambos campos pulmonares durante una biopsia pulmonar a cielo abierto. Se observa inflamación granulomatosa necrosante en el examen histológico del material de biopsia, que incluye muchos bacilos ácido-alcohol resistentes en los frotis para esta tinción. En los medios sólidos crecieron colonias amarillas lisas, más tarde identificadas como *M. gordonae*, después de 14 días de incubación a 37 °C en CO₂ al 8%. El paciente se recuperó luego de 15 meses de tratamiento antituberculoso, y comenzó con una combinación de isoniazida, rifampicina, amikacina y etambutol, seguida de una serie de un año de rifampicina y etambutol.

Jarikre informó dos casos de infección por *M. gordonae*, cada uno de ellos en amas de casa de 40 años. Uno provino de una mujer con una infección urinaria crónica de la cual se aisló repetidas veces *M. gordonae* en muestras de orina; el otro era una paciente paquistaní con una infección sistémica, de la cual se aisló el microorganismo en el esputo y la orina.^{155 156} La biopsia hepática puso en evidencia múltiples granulomas en los cuales también se aisló *M. gordonae*. La segunda paciente respondió en forma espectacular a un tratamiento antituberculoso con estreptomicina, isoniazida, rifampicina y pirazinamida. Se comunicó un caso de infección cutánea nodular crónica que desde el punto de vista histológico presentaba granulomas tuberculoides clásicos llenos de bacilos ácido-alcohol resistentes, en los que se aisló *M. gordonae*.⁴⁰⁹

Sin embargo, Wayne y Sramek, después de revisar muchos de los casos alegados y comunicados de infección por *M. gordonae*, advirtieron que las descripciones de los microorganismos y las correlaciones clínicas convincentes a menudo faltan en muchos de los artículos y que se sigue cuestionando su verdadera patogenicidad.³⁷⁶ Cuando se aíslan en las muestras, cada aislamiento debe ser identificado con exactitud y se debe realizar una correlación clínica cuidadosa para determinar la importancia clínica para lo que en la mayoría de los casos será un contaminante.

bacterias no tuberculosas; en el 96% de éstas, el agente causal era un miembro del complejo MAI.¹⁴⁰ La infección por HIV es el factor de riesgo primario para las infecciones diseminadas por este microorganismo.²⁴⁴ La incidencia de infecciones diseminadas por MAI en los pacientes infectados por HIV ha disminuido en forma espectacular desde la introducción del tratamiento antirretroviral altamente activo.

Características de laboratorio. Los miembros del complejo MAI pueden presentarse como una de las tres variantes de colonias: 1) lisas, opacas y con forma de cúpulas; 2) lisas, transparentes y planas y 3) rugosas (véase lámina en color 19-2N y O). Las cepas aisladas con más frecuencia en pacientes

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-10 *Mycobacterium avium/M. intracellulare*

Los trastornos que predisponen a las infecciones pulmonares por miembros del complejo *M. avium/M. intracellulare* (MAI) incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica por cualquier causa primaria, bronquiectasias, neumonía aspirativa crónica o recurrente, tuberculosis inactiva o activa, neumoconiosis y carcinoma broncogénico.⁸⁶ También se informó una asociación con fibrosis quística.^{17c} Se observa, además, enfermedad pulmonar en mujeres de edad avanzada sin trastornos predisponentes, el denominado síndrome de lady Windermere, por el personaje victoriano de Oscar Wilde que tenía el hábito peculiar de inhibir la tos. En los pacientes sin inmunosupresión, las manifestaciones pulmonares de las infecciones por MAI son similares a las de *M. tuberculosis*: tos, fatiga, pérdida de peso, fiebre leve y sudores nocturnos. En general, se puede demostrar radiológicamente una enfermedad cavitaria o se pueden observar nódulos solitarios o infiltrados más difusos. En ocasiones, los pacientes están asintomáticos.

El máximo recrudescimiento de las infecciones por MAI durante la última década se observó en pacientes con SIDA, hasta el punto en que, en algunas circunstancias, se aísla más a menudo MAI que *M. tuberculosis*. En una revisión de infecciones por MAI en pacientes HIV positivos antes del uso amplio del tratamiento antirretroviral altamente activo (HAART), se observó que las infecciones por MAI eran casi siempre diseminadas y ocurrían tarde en el curso de la infección por HIV.²¹¹ El riesgo de contraer infecciones por MAI en pacientes con SIDA que tienen recuentos de CD4 por debajo de 50 es alto (45% dentro del año del diagnóstico).⁴⁴ Cuando los microorganismos se encontraban en el esputo o en el aparato digestivo, el 60% de los pacientes tuvieron una enfermedad diseminada. Por lo tanto, estos autores aconsejan que los pacientes con SIDA que tienen esputo o heces positivas para MAI reciban tratamiento profiláctico con rifabutin. Las infecciones diseminadas se caracterizan por fiebre intermitente, sudores, debilidad, anorexia y pérdida de peso rápidamente progresiva. En algunos se presentó dolor abdominal o diarrea con malabsorción. No se observó una afectación pulmonar importante, a pesar del aislamiento de microorganismos MAI en muestras de esputo. Se produce bacteriemia en más del 90% de los pacientes con enfermedad diseminada, y los microorganismos se encuentran dentro de los monocitos circulantes; por lo tanto, para el cultivo en estos pacientes se recomienda el hemocultivo para micobacterias. Se han comunicado recuentos de hasta 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, aunque son más frecuentes los recuentos en el intervalo de 10¹ a 10².³⁹⁴

En un estudio de infecciones por micobacterias en 94 pacientes con SIDA, sólo ocurrió una enfermedad pulmonar importante en un 25% de los pacientes con MAI, a diferencia del 83% de los pacientes con infecciones por *M. tuberculosis* que tenían enfermedad pulmonar.³³⁴ Además, la tuberculosis clásica causada por *M. tuberculosis* precedió al diagnóstico de SIDA en dos tercios de los casos, al contrario de las infecciones por MAI, que fueron complicaciones secundarias del SIDA en todos los casos estudiados. También se han aislado miembros del complejo MAI en 15 de 16 casos de meningitis tuberculosa.¹⁵¹ El aislamiento de los microorganismos en el líquido cefalorraquídeo siempre indicó enfermedad diseminada y el pronóstico en este grupo de pacientes fue malo. El aislamiento de MAI en muestras de esputo en esta población de pacientes también es un indicador de enfermedad diseminada.¹⁵² Sin embargo, la enfermedad diseminada causada por MAI se ha vuelto mucho menos frecuente desde la introducción del HAART para la infección por HIV.

A partir de nuestra experiencia, parecen evidentes las siguientes características de las infecciones por MAI en los pacientes con SIDA. La cantidad de microorganismos en los cortes de tejido de biopsia o de necropsia a menudo es extremadamente numerosa y se observan agregados bacterianos intracelulares dentro de los macrófagos espumosos grandes, que simulan las células de la lepra observadas en las infecciones por *M. leprae* (véanse láminas en color 19-2P y 19-3I y J). La afectación gastrointestinal también suele ser importante. En algunos casos, grandes macrófagos espumosos, que simulan las células observadas en la enfermedad de Whipple, predominan en las áreas de inflamación. Los pacientes que presentan pruebas histológicas de afectación gastrointestinal (y pulmonar) siempre tienen enfermedad diseminada.⁴⁴ Bien podría ser el modo principal de transmisión la ingestión de agua o alimentos contaminados. Las lesiones en otros órganos, en especial pulmones, hígado, bazo y ganglios linfáticos, también pueden mostrar una invasión masiva con bacilos ácido-alcohol resistentes. En algunos casos, se observa poca inflamación en el momento de la muerte. La inflamación necrosante, más que la formación de granulomas y la necrosis con caseificación, es más característica del aspecto histológico de estas lesiones. Otros investigadores también observaron cargas importantes de microorganismos y reacciones inflamatorias atípicas en pacientes con SIDA e infecciones por micobacterias, y citan particularmente la alta incidencia de septicemia por micobacterias y hemocultivos positivos en estos enfermos.^{126,344,408}

Los microorganismos MAI también causan linfadenitis cervical similar a la escrófula en los niños.^{176,193} Woods y Washington mencionan otras infecciones por MAI, como sinovitis granulomatosa, enfermedad urinaria, lesiones cutáneas, osteomielitis, meningitis y úlceras colónicas.³⁹⁹ En la enfermedad ulcerosa intestinal cada vez hay más pruebas³⁹⁹ de que existe una relación causal entre la enteritis regional o enfermedad de Crohn y las micobacterias, sobre todo una especie de micobacteria estrechamente relacionada con *M. avium* y probablemente clasificada dentro del complejo MAI, *M. paratuberculosis*.

producen la variante de colonias lisas, transparentes y planas, como se observa en las microcolonias (véase lámina en color 19-2A y B). Algunos autores consideran que estos tipos de colonias planas y translúcidas corresponden a cepas más virulentas que las que producen otros tipos de colonias.^{63,297,305} Aunque *M. avium* fue clasificado originariamente en Runyon III (no cromógenos), según diversas experiencias, la mayoría de las cepas aisladas en pacientes con SIDA tienen grados variados de pigmentación amarilla, que se intensifica a medida que la colonia envejece. Sin embargo, Doern y cols. observaron que la mayoría de sus cepas eran no pigmentadas.⁷⁷ Storrer y Falkingham determinaron que las cepas aisladas en pacientes HIV positivos no eran pigmentadas y era más probable que fueran resistentes a los antibióticos en comparación con las cepas pigmentadas.³³⁶

El examen microscópico de frotis con tinción para microorganismos ácido-alcohol resistentes pone en evidencia células que en los casos típicos son cortas y cocobacilares. Al comien-

zo del cultivo y en ciertas condiciones, se pueden observar bacilos largos y delgados. La tinción suele ser uniforme, sin arrosariado ni formación de bandas. Aunque en la mayoría de los laboratorios se utilizan tinciones basadas sobre carbolfucsina convencionales, como Ziehl-Neelsen y Kinyoun, la tinción de auramina-rodamina con microscopia fluorescente puede ser útil en algunos casos. Como pueden ocurrir infecciones mixtas, no se recomienda una identificación predicha sobre la base de la morfología microscópica aislada.

Desde el punto de vista fenotípico, las cepas del complejo MAI se caracterizan mejor con una serie de reacciones negativas (véase cuadro 19-7). El microorganismo no produce catalasa termoestable y tiene la capacidad de crecer en T2H; por otra parte, las reacciones bioquímicas son inertes. Con la disponibilidad de una sonda de ácidos nucleicos para la confirmación con cultivo de los miembros del complejo MAI, ya no se justifica la demora para obtener la identificación de la especie con los métodos convencionales. Aunque la aplicación de la

PCR para la identificación directa de micobacterias, incluidos los miembros del complejo MAI, en el esputo y otras muestras clínicas, está recibiendo mucha atención en los laboratorios de investigación. No existe un producto comercial para los laboratorios diagnósticos. Aunque es frecuente realizar la sonda de combinación para el complejo MAI, puede ser importante determinar si el agente causal es *M. avium* o *M. intracellulare*, dado que algunos autores sugieren que la enfermedad por *M. avium* parece más grave que la causada por *M. intracellulare*.⁴⁰⁴

La mayoría de las cepas del complejo MAI son resistentes a los antituberculosos de uso frecuente. El mecanismo subyacente de resistencia se basa sobre la impermeabilidad de la pared celular.²⁷⁶ No se ha demostrado la síntesis de enzimas inactivadoras de aminoglucósidos y péptidos, aunque algunas cepas producen betalactamasas.²³³ El efecto tensioactivo del Tween 80 sobre la pared celular puede potenciar la acción de ciertos antibióticos; el etambutol también tiene un efecto sobre la permeabilidad de la pared celular, lo que refleja el modo en que este agente puede funcionar en forma sinérgica para potenciar la acción de algunos otros antituberculosos.¹³⁹ Así, en el pasado, el etambutol era incluido habitualmente en el grupo de fármacos utilizados para tratar a los pacientes con infecciones causadas por el complejo MAI, como INH, rifabutina, clorfazimina y otros.² El agregado de macrólidos a los regímenes terapéuticos ha mejorado en forma espectacular los resultados para los pacientes no infectados por HIV que presentan enfermedad pulmonar por MAI.

Mycobacterium paratuberculosis y enfermedad de Crohn. Hermon-Taylor y cols. citan el trabajo de un cirujano de Glasgow, T. K. Dalziel, quien en 1913 publicó una descripción detallada de la enteritis crónica en los seres humanos.¹³⁶ Este autor propuso que la enfermedad era causada por los mismos microorganismos responsables de la enfermedad de Johne, un trastorno intestinal ulcerativo asociado con diarrea crónica en el ganado. La enfermedad de Johne había sido conocida desde 1895 y se creía que se asociaba con bacilos ácido-alcohol resistentes, los cuales podían observarse en los tejidos de los animales infectados pero, en estos primeros días, no podían ser cultivados. Sin embargo, no mucho después se aisló finalmente una micobacteria de crecimiento lento en la mucosa intestinal de los animales infectados, que al inicio se conoció como bacilo de Johne, pero que más tarde fue identificada como *M. paratuberculosis*.

En 1984, Chiodini y cols., que trabajaron con Hermon-Taylor y cols. en el St. George's Hospital en Londres, comunicaron el aislamiento de una especie de *Mycobacterium* no clasificada con requerimientos nutricionales extremadamente especiales en tres pacientes con enfermedad de Crohn.⁴⁶ Después de un esfuerzo considerable, estos investigadores identificaron que el microorganismo pertenecía al grupo Runyon III, estrechamente relacionado con los complejos MAI y *M. paratuberculosis*. Se han citado otros distintos casos que relacionan *M. paratuberculosis* y enfermedad de Crohn de los Estados Unidos, Holanda, Australia y Francia.⁴⁵ Otro indicio de que el microorganismo de la enfermedad de Crohn y *M. paratuberculosis* son una misma micobacteria fue provisto en otra publicación del grupo hospitalario del St. George, que halló fragmentos idénticos obtenidos por restricción de DNA en estos grupos de bacterias.²²¹

Gitnick y cols. comunicaron el aislamiento de micobacterias con requerimientos nutricionales especiales, que incluyen *M. paratuberculosis*, en 5 de 82 muestras intestinales resecadas quirúrgicamente de pacientes, 27 de los cuales tenían enfermedad de Crohn.¹⁰⁶ Estas cepas necesitaron entre 4 y 8 meses para

el cultivo, lo cual puede ser una razón de por qué este microorganismo no ha sido aislado en los laboratorios clínicos. Prantera y cols. proporcionaron indicios indirectos de la asociación entre la enfermedad de Crohn y *M. paratuberculosis* al demostrar concentraciones séricas elevadas de anticuerpos antibacterianos que fueron halladas en los pacientes que siguieron un tratamiento exitoso con dapsona, fenómeno similar al observado después del tratamiento de los casos clásicos de tuberculosis.²⁶⁸ Mediante PCR y la utilización de una porción de la secuencia de inserción de *M. paratuberculosis* IS900 como sonda, Sanderson y cols. pudieron identificar el DNA de *M. paratuberculosis* en el 65% de las muestras de biopsia rectal en pacientes con enfermedad de Crohn, en comparación con sólo un 4,3% y un 12,5% de pacientes con colitis ulcerosa e individuos sanos, respectivamente.³⁰² Asimismo, Fidler y cols. observaron que era mucho más probable que el material de granulomas de tejidos con enfermedad de Crohn (31 muestras de biopsias en el estudio) diera DNA específico de *M. paratuberculosis* en la amplificación por PCR que los tejidos no afectados por la enfermedad de Crohn (10 biopsias de colitis ulcerosa como controles negativos).⁹² Si realmente las micobacterias fueran la causa de las enfermedades intestinales, pueden estar indicados nuevos métodos de prevención y tratamiento de estos trastornos, en especial de la enfermedad de Crohn. La asociación no ha sido probada por los postulados de Koch (véase Cocito y cols. para un comentario sobre paratuberculosis⁵¹).

Mycobacterium terrae, M. gastri y M. triviale. Estas micobacterias también son bacterias no fotocromógenas de crecimiento lento, no reconocidas en el pasado como patógenos, pero que pocas veces se encuentran en el laboratorio clínico. Se las puede diferenciar por las características mencionadas en el cuadro 19-7. Las colonias de *M. triviale* pueden asemejarse a las del complejo MAI y en algunos casos pueden ser tan rugosas que se confunden con bacilos tuberculosos; sin embargo, estas cepas son niacina negativas y pueden crecer en medios que contienen

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-11 *Mycobacterium terrae* y *Mycobacterium triviale*

Si bien *M. terrae* y *M. triviale* eran agrupadas antes en un complejo, también pueden considerarse por separado. Estas micobacterias han sido incriminadas en varios casos de infecciones humanas, según lo cita Woods y Washington: artritis séptica causada por *M. triviale* en un lactante, sinovitis y osteomielitis causadas por *M. terrae* en un hombre joven con pancitopenia de Fanconi y una posible infección diseminada por *M. terrae* en una mujer joven con tuberculosis miliar previa.³⁹⁹ Se han informado varios casos de infección pulmonar por *M. terrae*.^{191,347} Krishner y cols. comunican un caso y citan seis casos previos de infección respiratoria.¹⁸⁷ Peters y Morice informaron sobre un caso de infección pulmonar por *M. terrae* en una mujer de 64 años con carcinoma de ovario, que se presentó como infiltrados miliares caseificados en las radiografías de tórax y acompañados por una erupción en los miembros.²⁵⁶ Las lesiones pulmonares y cutáneas se resolvieron luego de 6 semanas de tratamiento con isoniazida, rifampicina y pirazinamida, a pesar de la "resistencia" de estos fármacos, según lo determinaron las pruebas de sensibilidad in vitro. Petrini y cols. informaron de un caso de tenosinovitis de la mano por *M. terrae*.^{120,261} Tanto el tendón como las vainas tendinosas se encontraban tumefactos y se observó desde el punto de vista histológico inflamación crónica, formación de granulomas y necrosis. Se comunicó un caso de tenosinovitis del dedo de la mano en un pescador de edad mediana que sufrió heridas punzantes mientras manipulaba aletas de mojarra.¹⁸⁶

NaCl al 5%. *M. triviale* también hidroliza Tween 80 dentro de los 5 días, mientras que los microorganismos del complejo MAI son Tween negativos. *M. gastri* y *M. terrae* son otras especies no fotocromógenas que pueden necesitar una diferenciación bioquímica (véase cuadro 19-7). *M. terrae* también se conoce como el “bacilo del rábano”, dado que fue aislado inicialmente en el agua de lavado de estos vegetales. Las colonias de *M. terrae* tienden a ser más lisas que las colonias rugosas de *M. triviale*.

Mycobacterium shimoidei. *M. shimoidei* es el nombre propuesto para un microorganismo similar a *M. terrae* aislado en múltiples ocasiones en un período de 11 años en un residente de 56 años de Japón que sufría una enfermedad pulmonar similar a la tuberculosis.³⁷⁵ En 1988, sobre la base de estudios de homología de DNA, Imaeda y cols. oficializaron a *M. shimoidei* como una especie distinta.¹⁴⁸ Este difiere fenotípicamente de los miembros del complejo *M. terrae* por las reacciones de catalasa negativa y beta-galactosidasa positiva y de *M. malmoense* por una reacción de fosfatasa ácida positiva. Como las reacciones de beta-galactosidasa y fosfatasa ácida pocas veces se realizan en los laboratorios clínicos, puede ser difícil establecer la identificación de la especie sobre la base de las propiedades fenotípicas.

Se han informado otros casos clínicos de infecciones causadas por *M. shimoidei* desde la comunicación del caso inicial. Se ha comunicado este microorganismo como causa de infecciones pulmonares en pacientes que viven en Australia y en Alemania, y el último caso complicó una silicosis de larga data.^{129,376} El tratamiento inicial con isoniazida, propionamida y rifampicina fracasó porque el microorganismo fue tanto resistente a la isoniazida como a la rifampicina; se logró una curación con una serie de 14 días de estreptomycinina e isoniazida. Por lo tanto, cuando una especie de *Mycobacterium* es fenotípicamente similar al complejo *M. terrae* o se aísla *M. malmoense* en muestras respiratorias obtenidas de pacientes con infecciones pulmonares, se debe considerar *M. shimoidei* y se debe intentar una identificación de la especie.

Mycobacterium malmoense. En 1977, Schroder y Juhlin aislaron una nueva especie de *Mycobacterium* en cuatro pacientes con enfermedad pulmonar.³⁰⁸ Estos autores denominaron el microorganismo *Mycobacterium malmoense*, por la ciudad sueca de Malmö, en la cual vivían los pacientes. También se ha observado la enfermedad en Escocia.⁹⁶ Se comunicó el aislamiento de los microorganismos en los Estados Unidos: 12 cepas por Good y cols. en 1980,¹¹⁰ y más recientemente, en cuatro pacientes con enfermedad pulmonar crónica por Albers y cols., en dos de los cuales se desarrolló una enfermedad progresiva.

Características de laboratorio. En los casos típicos, este microorganismo crece lentamente, algunas cepas ya se observan en 2 a 3 semanas de incubación a 37 °C; sin embargo, algunas pueden requerir hasta 12 semanas antes de que las colonias se vuelvan visibles. Esta necesidad de una incubación prolongada, más allá de un período utilizado en la mayoría de los laboratorios clínicos, puede conducir a un subdiagnóstico. Las colonias típicas de *M. malmoense* son blanco grisáceas, lisas, brillantes, opacas y tienen cúpula. Son incoloras y la exposición a la luz no produce pigmentación. En los frotis con tinción para microorganismos ácido-alcohol resistentes aparecen formas cocoides o bacilares cortas sin bandas transversales.

Las reacciones de pruebas bioquímicas claves de *Mycobacterium malmoense* son las siguientes:

1. No hay acumulación de niacina.
2. No reduce el nitrato a nitrito.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-12 *Mycobacterium malmoense*

En la última década, se ha comunicado *M. malmoense* con frecuencia creciente como patógeno pulmonar. Se informaron más de 180 casos y la mayoría afectan a pacientes con enfermedades pulmonares previas, a menudo hombres de edad mediana con neumoconiosis.⁴¹⁰ En los casos típicos, las radiografías muestran un cuadro indistinguible de *M. tuberculosis*. Jenkins y Tsukamura¹⁵⁷ describieron dos casos de adenitis cervical, mientras que Warren y cols.³⁷¹ presentaron a un paciente de los Estados Unidos con enfermedad pulmonar crónica. Albers y cols. creen que las infecciones por *M. malmoense* pueden ser más frecuentes en los Estados Unidos de lo que se sospechaba y están subcomunicadas, ya que algunas cepas necesitan 8 a 12 semanas o más de incubación antes de que ocurra un crecimiento visible, un período más prolongado de lo que se mantienen los cultivos en la mayoría de los laboratorios.⁶ El crecimiento es significativamente más rápido en las muestras que crecen en frascos de caldo BACTEC en comparación con el crecimiento diferido en el medio de Lowenstein-Jensen.¹⁰⁹ Se debe utilizar en paralelo un medio de cultivo en caldo para mejorar el rendimiento de las cepas de crecimiento muy lento.¹³⁸ Otras comunicaciones de casos incluyen linfadenitis en una niña de 5 años, infección cutánea séptica en un paciente con tricoleucemia y varios casos de infección en pacientes HIV positivos.^{37,49,60,264,389,407} En un caso, la infección fue tratada con éxito con etambutol, cicloserina e isoniazida, a pesar de la multiresistencia en las pruebas de sensibilidad in vitro.³⁷ Se comunicó hace más de una década la falta de correlación clara entre las pruebas de sensibilidad in vitro y la respuesta clínica.¹⁵ En la experiencia de estos autores, la omisión del etambutol del régimen terapéutico, aun cuando mostrara resistencia en los estudios in vitro, condujo a una respuesta poco satisfactoria.

3. Hidroliza el Tween 80.
4. Produce catalasa a 68 °C.
5. La prueba de pirazinamidasa es positiva.

La mayoría de las cepas son resistentes a isoniazida, estreptomycinina, ácido *p*-aminosalicílico y rifampicina, pero son sensibles a etambutol (1 g/mL) y cicloserina (16 g/mL).

Mycobacterium haemophilum. Sompolinsky y cols. aislaron por primera vez *M. haemophilum* en 1978 en una lesión subcutánea de un paciente israelí con enfermedad de Hodgkin.³²⁶ Como lo indicaría el nombre de la especie, *M. haemophilum* requiere hemoglobina o hemina para el crecimiento. Agar chocolate, agar de Colombia sangre de carnero al 5%, agar de Mueller-Hinton con suplemento de Fildes o medio de LJ que contiene citrato amónico férrico al 2% son apropiados para el aislamiento de este microorganismo.³⁹⁹ McBride y cols. comunicaron el éxito en el aislamiento de *M. haemophilum* utilizando un medio que contiene base de Casman, sangre de carnero al 5% calentada y violeta de genciana.²¹⁸ Debido a la posibilidad remota de aislar este microorganismo en la mayoría de los laboratorios en los Estados Unidos, el uso de una tira de factor X en el área de inoculación en agar 7H10, como lo sugieren Vadney y Hawkins, ofrece una alternativa apropiada en los casos sospechosos.³⁵⁸

La mayoría de las infecciones afectan la piel y el tejido subyacente, lo que posiblemente refleja la tendencia del microorganismo a crecer a una temperatura más baja.¹⁸⁸ Gupta y cols. comunicaron un caso de osteomielitis e infección cutánea en un paciente con SIDA, que fue tratado con éxito con minociclina.¹²⁰ Kiehn y cols. informaron cuatro casos en pacientes inmu-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-13 *Mycobacterium haemophilum*

Los nódulos subcutáneos dolorosos, las tumefacciones y las úlceras que pueden progresar hasta abscesos y fístulas que drenan son presentaciones clínicas frecuentes de *M. haemophilum*. Rogers y cols. comunicaron casos de enfermedad diseminada en pacientes con SIDA, en los cuales las lesiones cutáneas fueron múltiples, y afectaron el brazo, las manos y los pies (remítase a este artículo para obtener excelentes radiografías en color de estas lesiones).²⁹⁰ En un estudio de 13 pacientes con infecciones por *M. haemophilum* recogidos de siete hospitales metropolitanos en Nueva York, las manifestaciones clínicas incluyeron lesiones cutáneas diseminadas, bacteriemia y enfermedades de los huesos y las articulaciones, los ganglios linfáticos y los pulmones.³³⁸ Los autores de este estudio destacan que las técnicas de cultivo incorrectas pueden diferir o incluso omitir un diagnóstico de laboratorio, y que las infecciones pueden ser más frecuentes de lo que se reconoce.

Se han informado otros casos en pacientes con SIDA, que incluyen el aislamiento en la muñeca y el tobillo en sitios de tenosinovitis grave, y el aislamiento en una lesión cutánea, un ganglio linfático y el ojo de un paciente que representó el primer caso comunicado de infección por *M. haemophilum* en Canadá (un segundo caso de linfadenitis en una niña canadiense de 3 años que también estaba incluida en este informe).^{213,345} Los pacientes con linfopenia tienen un riesgo muy alto de sufrir infecciones: se ha demostrado que la diálisis renal y el tratamiento con corticosteroides son trastornos predisponentes de la infección por *M. haemophilum*.^{113,237}

nodeprimidos: dos tenían SIDA y dos eran receptores de alo-trasplantes de médula ósea.¹⁷¹ Debido a los requerimientos únicos de hierro y a la temperatura más baja para el crecimiento óptimo, estos autores sugieren que se debe considerar *M. haemophilum* cuando de las muestras de pacientes inmunodeprimidos con una enfermedad inexplicable no se aíslan micobacterias bajo condiciones de cultivo de rutina o cuando se observan bacilos ácido-alcohol resistentes en los frotis.

Características de laboratorio. El crecimiento óptimo ocurre a 28-32 °C; algunas cepas crecen a 20 °C; ocurre poco crecimiento o ninguno a 37 °C. El crecimiento es estimulado por una atmósfera de incubación de CO₂ al 10%. Las colonias típicas pueden ser rugosas o lisas después de 2 a 4 semanas de incubación a 32 °C en medio con huevo o agar 7H10 (con suplemento de hemina o sobre la superficie de la cual se ha colocado una "tira X", como ya se explicó). No se desarrolla pigmento, incluso después de la exposición a la luz. Bajo el microscopio, las células son cortas, curvas y fuertemente ácido-alcohol resistentes, sin formación de bandas ni arrosariado. Este microorganismo también es inerte desde el punto de vista bioquímico, con la producción de pirazinamidasa como única reacción positiva entre las pruebas comunes utilizadas para identificar las micobacterias.

ESPECIES DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Mycobacterium fortuitum, *M. chelonae* y *M. abscessus*. *M. fortuitum* fue descrito por primera vez en 1938 por daCosta Cruz y categorizado por completo en 1955 por Gordon y Smith.³⁷⁵ Se observó que este microorganismo era singular entre las micobacterias conocidas debido a su velocidad comparativamente rápida de crecimiento (3 a 5 días). Sin embargo, en la edición

de 1923 del *Manual de Bergey*, se describió otro microorganismo de crecimiento rápido denominado *M. chelonae*, que tenía varias características metabólicas en común con el microorganismo de daCosta Cruz. Estos dos microorganismos son dos de las micobacterias de crecimiento rápido más importantes y aisladas con mayor frecuencia. La tercera micobacteria de crecimiento rápido que merece mencionarse es *M. abscessus*, que puede considerarse parte del complejo *M. chelonae*. No es difícil diferenciar este microorganismo de *M. chelonae*, lo que es recomendado aquí, dado que puede causar una enfermedad grave y es altamente resistente al tratamiento antibiótico.^{33,65,303,402} Estas micobacterias son microorganismos terrestres y acuáticos ubicuos que contaminan los suministros de agua, incluidos los reactivos y las soluciones de lavado utilizadas en los hospitales.

Características de laboratorio. Se puede sospechar que un aislamiento desconocido es una micobacteria de crecimiento rápido si se observa el crecimiento del microorganismo ácido-alcohol resistente después de 2 a 4 días de incubación. Sin embargo, en algunos casos el crecimiento puede ser diferido. Las micobacterias pueden ser categorizadas como microorganismos de crecimiento rápido, por definición, si crecen dentro de los 7 días después del subcultivo. Las colonias jóvenes parecen lisas y hemisféricas, habitualmente con una consistencia untuosa o cerosa. En los casos típicos, las colonias son no cromogénicas, pero pueden tener color de hueso o ligeramente crema (véase lámina en color 19-2Q). *M. fortuitum* puede producir ramificación, extensiones filamentosas de colonias de 1 a 2 días en agar harina de maíz glicerol o agar de Middlebrook 7H1. Algunas cepas producen colonias más rugosas con hifas aéreas cortas, que se observan mejor bajo estereomicroscopia. *M. chelonae* carece de estas extensiones filamentosas.

Estas micobacterias a menudo tienen la capacidad de crecer en agar de MacConkey sin violeta de genciana. También aparecen como colonias lisas con forma de cúpula que pueden tener una pigmentación rosa claro (véase lámina en color 19-2R). Asimismo, se puede observar crecimiento con algunas cepas en agar sangre de carnero al 5%, que aparecen como pequeñas colonias puntiformes (véase lámina en color 19-2S). Los microbiólogos deben alertar sobre esta posibilidad y efectuar tinciones ácido-alcohol resistentes, además de las tinciones de Gram, para que la identificación sea correcta.

Desde el punto de vista microscópico, en los preparados con tinción ácido-alcohol resistente, las células bacterianas suelen ser pleomorfas y varían desde formas filamentosas largas hasta bacilos gruesos y cortos. No presentan ramificaciones o son rudimentarias; a veces las células pueden aparecer arrosariadas o tumefactas, con cuerpos ovoides que no se tiñen presentes en un extremo. Algunas cepas de *M. fortuitum* pueden crecer dentro de las 48 horas en agar sangre de carnero al 5% de rutina. Las células bacterianas aparecen como bacilos grampositivos cortos, delgados, filamentosos y de tinción débil (véase lámina en color 19-2T).

Silcox y cols. han identificado las siguientes características para definir una cepa como micobacteria de crecimiento rápido:³¹⁶

1. Ácido-alcohol resistente.
2. Ausencia de producción de pigmentación.
3. Proliferación en menos de 7 días en su temperatura óptima.
4. Pruebas de actividad de arilsulfatasa a los 3 días.
5. Crecimiento a 28 °C en agar de MacConkey especial (desprovisto de violeta de genciana).

Se pueden realizar otras pruebas para las características a fin de diferenciar *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*:

1. *M. chelonae* y *M. abscessus* no reducen los nitratos (*M. fortuitum* es positivo).
2. *M. chelonae* y *M. abscessus* son incapaces de asimilar hierro a partir de citrato amónico férrico, propiedad que posee singularmente *M. fortuitum* (véase protocolo 19-10).
3. *M. fortuitum* es sensible a la ciprofloxacina y al ácido pipemídico, pero resistente a la polimixina B; *M. chelonae* tiene las reacciones opuestas.³³²
4. *M. chelonae* no puede crecer en el medio de LJ que contiene NaCl al 5% a 28 °C, pero puede utilizar citrato, mientras que las reacciones opuestas definen a *M. abscessus*.

Es posible identificar subespecies de *M. fortuitum*, pero tiene poca importancia clínica; sin embargo, puede ser útil para ciertas aplicaciones epidemiológicas. *M. fortuitum* existe en tres biovariantes: biovariante *fortuitum*, biovariedades: *fortuitum*, *peregrinum* y una biovariedad sin nombre designada "tercer grupo".

M. smegmatis es otra micobacteria de crecimiento rápido que se asemeja estrechamente a *M. fortuitum*, y sólo difiere en su reacción negativa en la prueba de arilsulfatasa de 3 días, su capacidad para crecer a 45 °C y una producción diferida de pigmento después de 2 semanas de incubación.²⁴³

Mycobacterium thermoresistible. Como lo indica el nombre de la especie, *M. thermoresistible* tiene la característica singular de crecer a 52 °C. Este microorganismo es potencialmente patógeno; sin embargo, la poca frecuencia de comunicaciones de casos indica que la exposición es mínima o el microorganismo tiene muy baja virulencia. Weitzman y cols. comunicaron un caso de infección humana por *M. thermoresistible* en una mujer blanca inmunodeprimida con fiebre, tos y pérdida de peso.³⁸⁰ Se observó una enfermedad pulmonar cavitaria en las radiografías. Se aislaron microorganismos en el esputo y en una muestra de broncoscopio. El examen histológico de una biopsia pulmonar puso de manifiesto muchos microabscesos y granulomas con células gigantes de tipo Langhans, típicas de tuberculosis. Wolfe y Moore informaron sobre un caso de infección mamaria en una mujer luego de una mamoplastia de aumento.³⁹²

El microorganismo puede crecer lentamente como un escotocromógeno en medio para aislamiento primario y puede ser confundido con *M. gordonae*. La mayoría de las cepas de *M. gordonae* son ureasa negativas y no crecen en el medio que contiene cloruro de sodio al 6.5%.

OTRAS MICOBACTERIAS

Mycobacterium ulcerans. La mayoría de los casos de infecciones por *M. ulcerans* han sido comunicados en África Central y Occidental, Malasia, Nueva Guinea, Guyana, México y Australia. Se ha utilizado el nombre "úlceras de Bairnsdale" para las lesiones cutáneas de las infecciones por *M. ulcerans*, nombre en honor de la ciudad australiana donde Alsop y Searls reconocieron por primera vez el microorganismo en la década de 1930.²⁷² La mayoría de las infecciones humanas ocurren en las regiones tropicales luego de alteraciones de los bosques húmedos.¹³¹ Se propone que las micobacterias son transportadas desde el suelo a los sistemas lacustres de drenaje, donde se multiplican en meses o años. Los seres humanos se infectan por el contacto con estos microorganismos en los estuarios contaminados.

Características de laboratorio. *M. ulcerans* crece en condiciones óptimas a 33 °C y en absoluto a 37 °C. Las colonias rugosas, color beige claro o no pigmentadas, convexas o planas, con un borde irregular, que a menudo simulan las de *M. tuberculosis*, se desarrollan después de 6 a 12 semanas. Desde el punto de vista microscópico, las células ácido-alcohol resistentes son moderadamente largas y con forma de bacilos, sin formación de bandas ni arrosariado. *Mycobacterium ulcerans* es bioquímicamente inerte y sólo muestra actividad de catalasa termoestable entre las distintas pruebas que suelen utilizarse para identificar a las micobacterias.

Mycobacterium genavense. *M. genavense* es una micobacteria no tuberculosa, no pigmentada, de crecimiento lento y de aislamiento infrecuente que causa infección en los pacientes con SIDA. El microorganismo fue reconocido por Boettger y cols. por el hallazgo de un patrón único que utiliza DNA extraído de las micobacterias que crecen en medios de hemocultivo BACTEC 13A.²⁸ Se secuenciaron directamente los fragmentos genéticos amplificados y se determinaron los perfiles electroforéticos en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Los autores estudiaron 16 casos cuyos microorganismos tenían este perfil singular de secuencia de DNA y designaron oficialmente el microorganismo como *M. genavense* por el paciente de 28 años con SIDA que vivía en Ginebra del cual se aisló la primera cepa. Con posterioridad, Coyle y cols., utilizando ensayos para secuenciar el gen para rRNA 16S que había sido extraído de aislamientos no identificados de micobacterias de 15 hemocultivos obtenidos de siete pacientes con SIDA, también confirmaron la identidad de *M. genavense* como una especie separada.⁶¹ El patrón de secuencia se relacionó más estrechamente con *M. simiae*; sin embargo, la presentación clínica, la respuesta al tratamiento y las manifestaciones de la necropsia se asemejan más a las infecciones por complejo *M. avium*.²¹ Desde el punto de vista histopatológico, *M. genavense* en los pacientes HIV positivos produce lesiones caracterizadas por masas de histiocitos espumosos y granulomas bien definidos, cuyo desarrollo depende de la reactividad inmunitaria del huésped.²¹⁷ En una serie de necropsias, los más afectados fueron el intestino delgado, el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos; se respetaron los pulmones, el miocardio y el riñón, una distribución similar a la observada en los pacientes con enfermedad diseminada causada por un miembro del complejo MAI.

Los aislamientos iniciales fueron identificados en muestras obtenidas de pacientes con SIDA en Suiza (de ahí el nombre *genavense*), pero se describieron infecciones diseminadas en Europa, Estados Unidos y Australia.^{28,255} Esta distribución geográfica puede reflejar más el conocimiento del personal sanitario sobre esta especie nueva que las áreas seleccionadas de endemidad. *M. genavense* puede ser subreconocido porque sólo crece en medios de cultivo en caldo (como caldo BACTEC 13A, en el cual fue descubierto inicialmente) y requiere una incubación prolongada.²⁴⁶ Los síntomas más frecuentes son fiebre, pérdida de peso, diarrea, hepatoesplenomegalia y anemia.

Detección e identificación de las micobacterias mediante métodos moleculares

Como lo indica el algoritmo presentado antes en este capítulo, los laboratorios clínicos intentan alejarse de la tarea prolongada y tediosa de realizar las pruebas bioquímicas para hacer la identificación de una especie de las micobacterias aisladas en cultivo. Cada vez más a menudo se están utilizando métodos

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-14 Bacilos de crecimiento rápido: *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*

M. fortuitum, *M. chelonae* y *M. abscessus*, este último incluido en el complejo de *M. chelonae*, son las micobacterias de crecimiento rápido de mayor importancia clínica. Una amplia variedad de infecciones se han asociado con estas micobacterias, entre ellas las de los pulmones, la piel, el hueso, el sistema nervioso central, las válvulas cardíacas protésicas y la enfermedad diseminada.^{316,399} Las infecciones cutáneas son muy frecuentes y a menudo evolucionan en abscesos subcutáneos que drenan.¹²⁵ Wallace y Brown revisaron 100 aislamientos de *M. chelonae* en la piel, el tejido blando y el hueso en un período de 10 años.³⁶⁶ Se halló más frecuentemente infección cutánea (53%), celulitis u osteomielitis localizada (35%) e infecciones de catéteres (12%). Los factores de riesgo subyacentes para las infecciones fueron trasplante de órganos, artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios, traumatismo y procedimientos médicos invasivos. Wallace y cols. habían revisado antes 125 infecciones humanas causadas por micobacterias de crecimiento rápido.³⁶⁸ El 59% de estos casos involucró la piel (infecciones de heridas posquirúrgicas, traumatismo accidental e inyecciones con aguja).

Se comunicó un brote de infecciones cutáneas en una sala hospitalaria causado por *M. fortuitum* por la exposición a una máquina de hielo contaminada y la contaminación de una máquina de desinfección de broncoscopio automático como otras fuentes de infecciones hospitalarias.^{97,197} Se informó un síndrome cutáneo clínicamente definido, asociado con infecciones causadas por el entonces complejo *M. chelonae* (*M. abscessus* no era distinguido de rutina de *M. chelonae* en ese momento) en receptores de trasplantes renales, que consistió en lesiones nodulares indolentes y sensibles a la palpación sobre las extremidades.⁵⁸ La propagación esporotricoide de estas infecciones puede ocurrir en pacientes inmunosuprimidos y, pocas veces, las infecciones cutáneas con micobacterias de crecimiento rápido pueden representar la extensión de la enfermedad diseminada.^{79,238}

Se informaron otras distintas entidades clínicas causadas por micobacterias de crecimiento rápido. Se comunicaron varios casos de queratitis en personas que usan lentes de contacto blandas o duras.^{31,168} La mayoría de las infecciones siguen al traumatismo y a menudo el tratamiento antibiótico tópico fracasa; por lo tanto, suele requerirse una queratoplastia para lograr una curación. Se recomienda realizar frotis ácido-alcohol resistentes de los raspados corneanos en todo paciente con úlceras corneanas crónicas.²⁸³ Los pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria continua también están expuestos a adquirir peritonitis causada por micobacterias de crecimiento rápido.^{47,84,182,224,327} Las recomendaciones colectivas consisten en realizar cultivos para micobacterias en los pacientes con peritonitis asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua cuando los cultivos habituales no muestran microorganismos. Se deben considerar las micobacterias de crecimiento rápido cuando se examinan placas de cultivo y tinciones de Gram preparadas de aislamientos en líquidos peritoneales o diálisis que tienen el aspecto de difteroides mal caracterizados. La extracción del catéter, el drenaje de las colecciones líquidas y el uso adecuado de antibióticos suelen conducir a una rápida curación.

Cualquiera de estos microorganismos son causas importantes de infecciones pulmonares, pero las infecciones por *M. abscessus* pueden ser particularmente graves.³⁶⁹ Las micobacterias de crecimiento rápido son ubicuas en muchas fuentes acuosas y muchas colonizan las vías respiratorias de los pacientes que tienen los mecanismos de defensa local comprometidos, que están debilitados o inmunodeprimidos o que padecen una enfermedad pulmonar obstructiva crónica de larga data. Los procedimientos invasivos sobre las vías respiratorias también colocan a los pacientes en riesgo de sufrir una infección por *M. abscessus*. Burns y cols. estudiaron un brote de cultivos positivos de esputo para *M. fortuitum* en 16 pacientes que eran tratados en una sala de rehabilitación para alcoholismo.³⁴ La electroforesis de campo pulsado de grandes fragmentos de DNA genómico obtenidos con enzimas de restricción reveló que los 16 aislamientos eran idénticos. Se observó que la fuente era una canilla conectada a la vía de agua que proveía a las duchas que utilizaban estos pacientes; no ocurrieron otros casos después de desconectar y descontaminar esos artefactos.

Se han informado varios casos de infecciones de catéteres causadas por micobacterias de crecimiento rápido. Raad y cols. revisaron 15 pacientes oncológicos infectados en el M. D. Andersen Cancer Center. 9 causados por *M. fortuitum* y 6 por *M. chelonae*.²⁷¹ Cuatro pacientes con bacteriemia e infecciones asociadas de catéter se recuperaron después de extraído el catéter y de la institución rápida del tratamiento antibiótico. La bacteriemia se repitió en siete pacientes en los cuales el catéter quedó colocado y que fueron tratados sólo con antibióticos. Los pacientes con infecciones del túnel del catéter requirieron cirugía para lograr la curación. Se comunicaron tres casos de infecciones por *M. chelonae* en pacientes febriles con neutropenia, considerada un factor de riesgo definido para desarrollar una enfermedad progresiva y diseminada.²²²

Otras infecciones causadas por las micobacterias de crecimiento rápido incluyen un brote de otitis media por *M. chelonae* en un centro clínico, donde la transferencia ocurrió entre los pacientes por instrumentos contaminados, aortitis luego de reemplazo de válvula aórtica e infección de heridas externas por *M. fortuitum*; endocarditis por *M. fortuitum* en una mujer de 54 años con insuficiencia renal crónica que recibía hemodiálisis; una serie de infecciones relacionadas con bypass cardíaco; casos raros de hepatitis y sinovitis; un absceso retroperitoneal infectado por *M. chelonae* que complicó una herida por arma de fuego en el flanco; y un caso de infección diseminada por *M. fortuitum* en un paciente con SIDA.^{146,210,289,307,318,380,399} Se comunicaron dos casos de infecciones postraumáticas de los tejidos blandos por *M. smegmatis* en un varón de 21 años y en una mujer de 29 años que sufrieron accidentes automovilísticos.²⁴³ El primer paciente presentó una lesión secretante en la pierna izquierda y adenopatía inguinal y la última un área subcutánea de celulitis con secreción crónica de la cara posterolateral del muslo. Los autores también citan 12 casos de infecciones por *M. smegmatis* publicados, lo que disipa cierta duda de que este microorganismo sea no patógeno. Newton y Weiss informaron luego un caso de neumonía aspirativa causada por *M. smegmatis*.²⁴²

Las micobacterias de crecimiento rápido varían en su sensibilidad in vitro.¹⁴³ La amikacina es predeciblemente activa; otros aminoglucósidos, cefoxitina, doxiciclina y eritromicina también son selectivamente activos. Los agentes más nuevos que han mostrado actividad in vitro contra algunas cepas son imipenem-cilastatina, amoxicilina-clavulanato y ciprofloxacina.³⁰⁷

sin cultivo basados sobre biología molecular para la confirmación con cultivo de las cepas de especies de *Mycobacterium* aisladas en cultivo. Por ejemplo, los ensayos de sonda de ácidos nucleicos prácticamente han reemplazado a las pruebas bioquímicas convencionales en la identificación de *M. tuberculosis* y el complejo MAI. También se han producido sondas de

ácidos nucleicos para la identificación de *M. kansasii* y *M. goodii*. Varios grupos describieron la utilidad de estas sondas en el laboratorio clínico.^{62,227,282,304,352}

Existen cuatro aplicaciones principales para las técnicas moleculares cuyo uso se encuentra disponible en los laboratorios clínicos:

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 19-15 *Mycobacterium ulcerans*

La infección se presenta como un "furúnculo" o una masa indolora por debajo de la piel, que en los casos típicos se desarrolla en el sitio de un traumatismo previo y prosigue hasta una úlcera superficial que no cicatriza, con una base necrótica en algunas semanas. Algunas de las lesiones estudiadas por Igo y Murthy fueron muy graves y la necrosis por coagulación avascular se extendió en la profundidad del tejido subcutáneo.¹⁴⁷ También se pueden desarrollar nódulos satélite que se ulceran. Se ha comunicado un tratamiento exitoso con la aplicación de calor local, escisión e injertos.³⁰¹ Igo y Murthy proporcionan las características clínicas, histológicas y microbiológicas de 46 casos de infecciones por *M. ulcerans* estudiados en varios pueblos a lo largo del río Sepik en Nueva Guinea.¹⁴⁷ En general, las lesiones se encuentran sobre los miembros inferiores y consisten en úlceras poco profundas que aparecen en áreas de induración subcutánea en los sitios de un traumatismo previo. Se pueden desarrollar nódulos satélites y úlceras superficiales. En general, son indoloras a menos que haya una infección secundaria. Delaporte y cols. informaron sobre uno de los primeros casos de infecciones por *M. ulcerans* en una paciente con SIDA.⁷² Era una mujer de Zaire de 30 años, embarazada, con una lesión ulcerante crónica y dolorosa de la rodilla. Una biopsia en sacabocados no dio ningún microorganismo; sin embargo, una biopsia más profunda de la aponeurosis puso en evidencia muchos bacilos ácido-alcohol resistentes. La lesión cicatrizó con un régimen de 2 meses de isoniazida, rifampicina y etambutol. A pesar de la asociación de infección por *M. ulcerans* y SIDA en esta paciente, esta asociación es demasiado infrecuente como para servir como enfermedad marcadora.

1. Confirmación con cultivo de las cepas aisladas en muestras clínicas utilizando sondas de DNA.
2. Identificación de micobacterias a través de la secuenciación de DNA.
3. Detección directa de *M. tuberculosis* en esputo y otras muestras clínicas utilizando ensayos de amplificación de ácidos nucleicos.
4. Determinación de huellas moleculares de DNA y tipificación de cepas de especies de *Mycobacterium*.

La literatura médica relacionada con el diagnóstico molecular según se aplica a la identificación de las micobacterias es amplia. En este momento es difícil predecir cuál de las varias técnicas específicas soportará la prueba del tiempo; por lo tanto, también lo es determinar qué referencias y aplicaciones deben incluirse en un libro de texto general. Aunque las herramientas moleculares precisas utilizadas en los laboratorios de micobacteriología varían, casi todos los laboratorios modernos utilizan en cierta medida diagnósticos moleculares. Se están determinando los estándares para el uso del diagnóstico molecular. Independientemente de su empleo en el futuro, existe la necesidad de una experiencia continua con las técnicas convencionales que se siguen utilizando en la mayoría de los laboratorios clínicos. El estudio de estas técnicas también proporciona un conocimiento fundamental de la biología básica de las micobacterias y ayuda a determinar el mejor papel para las técnicas más nuevas cuando son introducidas en el laboratorio clínico. La detección y la caracterización de las micobacterias mediante métodos moleculares pueden separarse en métodos no basados sobre la amplificación y métodos basados sobre la amplificación. Después de la amplificación, el/los producto/s de la amplificación pueden ser analizados mediante secuenciación

de DNA para adquirir información de la identificación o mediante otras técnicas o tipificación. A continuación describimos las características sobresalientes de estas aplicaciones.

**Métodos de amplificación de señales
SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Las sondas de ácidos nucleicos constituyeron la primera técnica basada en ácidos nucleicos utilizada de rutina en el laboratorio de microbiología clínica para la identificación de micobacterias en cultivos positivos. Estas sondas, que al principio eran radiomarcadas, pero que ahora son no isotópicas, fueron utilizadas por primera vez y comercializadas por Gen-Probe (San Diego, CA). La precisión, la sensibilidad y la especificidad de estas sondas son muy altas cuando se las utiliza para identificar las micobacterias en cultivo, según las instrucciones del fabricante y han sido autenticadas en varios estudios.^{80,112,169,199,227,240,304} Existen sondas de ácidos nucleicos para la identificación de microorganismos del complejo *M. tuberculosis*, el complejo *M. avium/M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. También existen sondas separadas para *M. avium* y *M. intracellulare* si se desea la diferenciación de estas micobacterias.

En resumen, esta técnica utiliza sondas de DNA monocatenario marcadas con éster de acridina que forman híbridos con el RNA recombinante (rRNA) proveniente de la bacteria en estudio por acción de un agente lítico, calor y sonificación. El rRNA ribosómico es un punto diana genético útil para la identificación de los microorganismos, dado que a menudo contiene secuencias "firma" (*signature*) y está presente en las células y el cultivo en grandes cantidades secundarias al crecimiento del microorganismo (amplificación biológica). La sonda de DNA y el rRNA se hibridan según el apareamiento tradicional de bases de Watson y Crick para un complejo DNA:RNA estable.²⁸⁸ Después de la inactivación de la sonda no hibridada, se realiza un paso de generación de señales y se produce luz que es registrada por un equipo. La luz producida es proporcional a la cantidad de sonda presente y se utiliza un umbral predeterminado para establecer la positividad. Las dos horas necesarias para la determinación basada sobre sonda de la especie para la cual existen sondas genéticas representa un adelanto importante respecto de la identificación mediante métodos convencionales.^{227,304} Los aislamientos negativos por sonda requieren aún la identificación utilizando métodos fenotípicos para los laboratorios que no utilizan secuenciación de DNA, pero esto representa una minoría definida de aislamientos, habitualmente <10%. Los sistemas comerciales tienen una duración ampliada, que también extiende la utilidad a una gran cantidad de laboratorios. Véase el protocolo 19-17 para una descripción detallada de este procedimiento.

Una ventaja pronto reconocida fue el uso de estas sondas en los cultivos positivos en caldo, que aísla más rápidamente las micobacterias que los medios sólidos en la mayoría de los casos. Como el aislamiento de micobacterias en cultivo requiere 2 a 3 semanas, varios estudios indicaron que los ensayos de sonda podían realizarse en microorganismos aislados en cultivo en caldo, específicamente en frascos de BACTEC.^{87,258} La técnica implica la aspiración de 1 a 1,3 mL de líquido de un frasco de hemocultivo después de alcanzar por lo menos un índice de crecimiento de 100 (GI = 999 logra el máximo nivel de sensibilidad). Se coloca la alícuota de caldo de cultivo en un tubo de 1,5 mL con tapa de rosca y se lo coloca en una microcentrífuga. Se utiliza la centrifugación a 9 000 g durante 5 a 7 minutos para concentrar las bacterias. Después de descartar el sobrenadante, se suspende la píldora en un reactivo de sonica-

ción-lisado y se completa el procedimiento como ya se describió en este capítulo. Kiehn y Edwards combinaron el sistema BACTEC TB con la sonda de ácidos nucleicos dirigida al rRNA de *M. avium* para identificar con rapidez esta especie cuando era aislada en hemocultivos de pacientes con SIDA.¹⁶⁹ En un estudio llevado a cabo por Ellner y cols., la combinación del aislamiento en BACTEC y el ensayo con sonda de DNA identificó el 89% de 176 aislamientos de *M. tuberculosis* y el 89% de 110 aislamientos de *M. avium*.⁸⁷ Lo más impresionante fue la reducción de alrededor de 5 a 7 semanas del tiempo transcurrido hasta el resultado final en comparación con los métodos de aislamiento y bioquímicos convencionales. Asimismo, se hizo una identificación rápida de *M. tuberculosis* con la combinación BACTEC TB-sonda de DNA en el 83% de 64 casos y en el 92% de los aislamientos de *M. avium* y el 86% de los aislamientos de *M. intracellulare*.²⁵⁸

En un estudio de 359 aislamientos ácido-alcohol resistentes positivos en frascos BACTEC 12, se identificaron los siguientes porcentajes de microorganismos en el examen de detección directo inicial de las píldoras centrifugadas con AccuProbes quimioluminescentes no isotópicas específicas de especie (Gen-Probe): complejo *M. tuberculosis*, 87,2%; complejo *M. avium*, 78,6%; *M. kansasii*, 91,7% y *M. gordonae*, 85,9%.²⁸¹ Los autores llegaron a la conclusión de que el menor porcentaje de detección, cuando se compara con los estudios previos, es en parte el resultado de la fuerza centrífuga utilizada (3 000 g en lugar de 9 000 a 10 000 g). Cuando no se cuenta con centrifugas de alta velocidad, la extensión del tiempo de centrifugación hasta 30 minutos puede mejorar el rendimiento. En un esfuerzo similar por disminuir aún más el tiempo de detección, Forbes y cols. aplicaron amplificación con PCR para detectar *M. tuberculosis* aislado en cultivos en caldo BACTEC 12B.⁹⁴ Con la PCR, se pudo hacer el ensayo de los frascos BACTEC 12B cuando el GI alcanzaba 100 o más. El uso de la PCR en este estudio condujo a un tiempo medio hasta la detección de *M. tuberculosis* de 9 días, en comparación con 14 días utilizando sondas de ácidos nucleicos a partir del crecimiento de subcultivos BACTEC 12B en medios sólidos. Kaminski y Hardy sugieren que la observación de formación de cordones en tinciones ácido-alcohol resistentes realizadas en frascos BACTEC 12B positivos se puede utilizar como guía para seleccionar inmediatamente el ensayo por sonda de *M. tuberculosis*.¹⁶⁵

hibridación in situ

La hibridación in situ es una herramienta diagnóstica molecular utilizada durante años en anatomía patológica, pero que ha tenido poca repercusión en microbiología clínica. Esta técnica utiliza una sonda de oligonucleótidos marcada con una molécula detectora. Si la molécula detectora es fluoresceína y la interpretación se hace mediante observación directa utilizando un microscopio de fluorescencia, se denomina hibridación in situ por fluorescencia (FISH). Sin embargo, si la detección de la sonda hibridada se logra a través de una reacción secundaria y el color, más que la luz producida, la reacción se denomina hibridación in situ cromogénica (CISH). Varios investigadores han utilizado tanto las reacciones FISH como CISH para la detección de los agentes infecciosos. Más recientemente, la FISH ha sido utilizada para identificar patógenos bacterianos y levaduras en hemocultivos positivos. Esta técnica se ha empleado para identificar *M. tuberculosis* en cultivos que se vuelven positivos y en muestras respiratorias directas que contienen bacilos ácido-alcohol resistentes. También ha sido utilizada por

los patólogos para identificar micobacterias en tejidos fijados con formalina e introducidos en parafina y para confirmar la identidad de *M. leprae*. Lamentablemente, no existen sistemas comerciales para micobacterias, pero puede haberlos, ya que los hay para *S. aureus* y *C. albicans*.

Métodos de amplificación de ácidos nucleicos APLICACIONES COMERCIALES

En pocas ocasiones, la cantidad de microorganismos de la muestra clínica es lo suficientemente grande como para lograr la detección con una sonda génica quimioluminescente. Sin embargo, muchas veces este método es muy poco sensible para su uso directo en muestras clínicas.⁴³ Se recomienda un ensayo basado sobre la amplificación de ácidos nucleicos si se va a intentar la identificación directa de micobacterias a partir de las muestras clínicas. A finales de la década de 1990 dos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos comerciales para la detección de *M. tuberculosis* recibieron la aprobación por la FDA para su uso en muestras respiratorias. Estas pruebas, tanto el ensayo PCR para *M. tuberculosis* AmpliCor (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) como la prueba directa para *Mycobacterium tuberculosis* amplificada (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct test, AMTD), que utiliza amplificación mediada por transcripción, han sido aprobadas para uso con muestras con frotis positivos, mientras que sólo la última se aprobó para muestras respiratorias con frotis negativos. Ésta es la culminación de diversos estudios del desarrollo y ensayos de campo en varios años, que condujeron a los productos que están estandarizados y diseñados para reducir los problemas de contaminación con DNA extraño e inhibición de las reacciones de amplificación por inhibidores endógenos. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos tienen buen rendimiento en las muestras con frotis positivos, pero en forma subóptima en las muestras respiratorias con frotis negativos, cuando se compara con el cultivo.^{73,250,299}

Escapa al alcance de este libro revisar todos los trabajos de otros investigadores publicados sobre la evolución de las aplicaciones de AMTD y PCR en las pruebas directas para la detección de micobacterias en las muestras clínicas, pero existen muchos.^{27,229,263} Se describen varios de los estudios importantes para cada una de estas técnicas aprobadas por la FDA.

Uno de los primeros ensayos de campo de la prueba Gen-Probe AMTD (GenProbe, Inc., San Diego, CA) fue publicado por Jonas y cols. en 1993.¹⁶¹ En un estudio de 758 sedimentos de esputo procesados, 119 (16%) de los cuales fueron positivos para *M. tuberculosis*, el ensayo Gen-Probe tuvo una sensibilidad, una especificidad y un valor predictivo positivo y negativo del 82%, 99%, 97% y 96%, respectivamente, que fueron comparables con los resultados derivados del cultivo y mejores que los del análisis de los frotis.

Miller y cols. realizaron una evaluación retrospectiva de tres muestras respiratorias separadas de cada uno de 250 pacientes utilizando el AMTD, que comparó los resultados con los de la microscopia, el cultivo y la revisión de las historias clínicas de los pacientes.²²⁹ De estos pacientes, 198 (de los cuales se recogieron 594 muestras) fueron negativos para *M. tuberculosis* por criterios de cultivo y clínicos y 52 fueron positivos (156 muestras). La especificidad global del AMTD fue del 98,5%. De las 156 muestras obtenidas de los pacientes con tuberculosis, se aislaron microorganismos en 142 (91%), la microscopia para ácido-alcohol resistentes fue positiva para 105 (67,3%) y la AMTD fue positiva para 142 (91%). Cuando se evaluaron las tres muestras de cada uno de los pacientes, la AMTD indicó que los 52 pacientes era positivos para tuberculosis.

En un estudio de 938 muestras respiratorias, Pfyffer y cols. observaron que la prueba AMTD tenía sensibilidad del 93,9%, especificidad del 97,6%, valor predictivo positivo del 80,7% y valor predictivo negativo del 99,3% después de la resolución de los resultados discrepantes por revisión de la historia clínica.²⁶³ Estos autores llegaron a la conclusión de que es una prueba altamente sensible y específica para detectar microorganismos del complejo *M. tuberculosis* en algunas horas. Sin embargo, los resultados de otro estudio fueron menos alentadores.²⁷ De 617 muestras de las vías respiratorias, 590 tuvieron un cultivo y una prueba AMTD negativos. Veintiún cultivos (3,4%) arrojaron *M. tuberculosis*; de éstos, 15 (71,4%) fueron detectados por la prueba AMTD y 6 fueron omitidos. *M. tuberculosis* no creció en cultivo de seis muestras con prueba AMTD positiva (28,6%) obtenidas de tres pacientes en tratamiento para tuberculosis. Por lo tanto, la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos negativo y positivo para la prueba AMTD fueron del 71,4%, 99%, 99% y 71,4%, respectivamente. Estos autores juzgaron que la prueba era fácil de realizar y altamente específica, pero que carecía de sensibilidad y sugirieron que puede ser útil la inclusión de un control de amplificación interna.

Vuorinen y cols. llevaron a cabo estudios que compararon el rendimiento del producto Gen-Probe con la prueba para *M. tuberculosis* Amplicor de Roche (Roche Molecular Diagnostics, Indianápolis, IN), antes de la aprobación por la FDA del último ensayo en los Estados Unidos.³⁶⁵ Evaluaron 256 muestras respiratorias obtenidas de 243 pacientes para detectar la presencia del complejo *M. tuberculosis*, tanto con la prueba AMTD como con la prueba para *M. tuberculosis* Amplicor de Roche PCR (Amplicor PCR). Cuando se comparó con los resultados del cultivo realizado en paralelo, la sensibilidad de la tinción, la prueba AMTD y la prueba Amplicor PCR fueron del 80,8%, 84,6% y 84,6%. La especificidad para las tres pruebas fue del 99,1%, 98,7% y 99,1%, respectivamente. Las conclusiones de estos autores fueron que ambos métodos de amplificación de ácidos nucleicos eran rápidos, sensibles y específicos para la detección de *M. tuberculosis* en las secreciones respiratorias.

Los siguientes son resúmenes de algunos otros estudios de la prueba para *Mycobacterium tuberculosis* PCR Amplicor Roche. Ichiyama y cols., en un estudio paralelo de 422 muestras de esputo obtenidas de 170 pacientes con infecciones por micobacterias, también observaron que el sistema AMTD y el sistema para *Mycobacterium* Amplicor tenían un rendimiento igualmente bueno, con una concordancia del 98,7%.¹⁴⁵ D'Amato y cols. evaluaron la prueba Roche Amplicor en 985 muestras de 372 pacientes.⁶⁸ La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos comparados con el cultivo y el diagnóstico clínico fueron del 66,7%, 99,6%, 91,7% y 97,7%, respectivamente, comparables con los resultados del cultivo. Los autores citan la gran ventaja de que se dispone de los resultados de las pruebas a las 6,5 horas después de que la muestra llega al laboratorio. En un estudio de 1 480 muestras clínicas obtenidas en 1155 pacientes, Wobester y cols. hallaron que la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo del ensayo Amplicor PCR fueron del 79%, 99%, 93% y 98%, respectivamente.³⁹¹ En muestras con frotis positivos, la sensibilidad fue del 98%, frente al 59% para las muestras con frotis negativos. La sensibilidad y la especificidad de las muestras que demostraron un índice de proliferación positivo en el sistema BACTEC 460 fueron del 98% y del 100%, respectivamente. Delacourt y cols., en un estudio de 68 niños con distintos estadios de tuberculosis, observaron que la

PCR era positiva en el 83,3% de 199 muestras obtenidas de niños con enfermedad activa, pero también en el 38,9% de los niños sin síntomas.⁷¹ El último grupo puede requerir una renovación o una continuación del tratamiento.

Existen otros dos ensayos de amplificación para *M. tuberculosis* para uso fuera de los Estados Unidos que no han sido aprobados por la FDA: el ensayo *M. tuberculosis* BD ProbeTec (BD Diagnostic), que utiliza amplificación por desplazamiento de hebras, y el ensayo Abbott LCx *M. tuberculosis* (LCR; Abbott Laboratories, Chicago, IL), que utiliza la reacción en cadena de la ligasa. El ensayo BD ProbeTec *M. tuberculosis*, que no se comercializa en los Estados Unidos, ha sido utilizado para estudiar muestras respiratorias directas y cultivos positivos.^{16,370} Barrett y cols. estudiaron las muestras respiratorias directas de 205 pacientes que tenían alta probabilidad de presentar tuberculosis. De los 109 pacientes con tuberculosis probada por cultivo, 101 fueron positivos por el ensayo BD ProbeTec, lo que dio una sensibilidad del 92,7%.¹⁶ Hubo tres reacciones falsas positivas comunicadas en este estudio de pacientes con micobacterias no tuberculosas, lo que dio una especificidad del 96%. Los estudios que utilizaron el ensayo Abbott LCx *M. tuberculosis* también mostraron resultados excelentes de sensibilidad y especificidad.^{89,200,205,235} Lindbra then y cols.,²⁰⁵ en un estudio grande en Noruega, examinaron 482 muestras de 457 pacientes con el ensayo para *M. tuberculosis* Abbott LCx y hallaron una sensibilidad del 90,2% y una especificidad del 99,2%.

El uso de productos comerciales no impide que los usuarios encuentren problemas en la aplicación y la prueba. Los directores y supervisores que deciden poner en práctica una de estas pruebas para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas deben verificar que se siguen con cuidado las recomendaciones del fabricante y se aplican con rigidez los estándares de control de calidad. Estas pruebas todavía no son un reemplazo del cultivo. Aún existen casos en los cuales se aísla *M. tuberculosis* del cultivo pero que no se detecta mediante métodos moleculares. Además, no contamos todavía con un perfil molecular completo de todos los determinantes de la resistencia, de modo que se deben realizar las pruebas habituales de sensibilidad. Se deben utilizar en forma simultánea los métodos de aislamiento de rutina para cada muestra recibida, controlar con cuidado los aspectos clínicos de cada caso y mantener una comunicación constante entre los profesionales del laboratorio y los médicos de atención primaria. Si se aplican estas provisiones, la capacidad de un diagnóstico temprano de los nuevos casos de tuberculosis tendrá un efecto importante sobre el tratamiento y el control de la infección, con prevención del contagio interhumano de la enfermedad.

ENSAYOS DOMÉSTICOS DE PCR, INCLUIDA LA PCR EN TIEMPO REAL

Además de los ensayos aprobados por la FDA, se han creado y evaluado muchos ensayos de PCR "domésticos" y, más recientemente, la PCR en tiempo real.²⁴⁷ Si bien estas aplicaciones no han sido aprobadas por la FDA, pueden ser herramientas diagnósticas importantes en las manos de operadores entrenados. La posibilidad de un acortamiento hasta horas, en lugar de días y semanas, y la detección e identificación directas de especies de *Mycobacterium* en distintas muestras clínicas hace atractivos estos ensayos. El costo de la PCR doméstica suele ser muy inferior al de los productos comerciales comparables, pero la validación apropiada del ensayo reside en el usuario de la prueba. Quienes trabajan en diagnóstico molecular tienen un futuro interesante y brillante, y llegará el día en

que los tediosos y a menudo poco precisos métodos de identificación de especies que se detallaron en este capítulo serán recordados como procedimientos históricos.

Nolte y cols. idearon uno de los primeros ensayos de PCR para el diagnóstico rápido de la tuberculosis pulmonar; en este artículo describieron información de fondo importante que será de interés para quienes desean aprender más acerca del desarrollo y el establecimiento de un ensayo de PCR.²⁴⁷ Algunos de los posibles problemas que se deben encarar con los ensayos de amplificación basados en ácidos nucleicos son la inhibición de la amplificación y la reproducibilidad del ensayo, los cuales fueron tratados en un estudio de multilaboratorios realizado por Noordhoek y cols.²⁴⁸ Estos autores hicieron circular 200 muestras de esputo, saliva y agua que contenían cantidades conocidas de células de BCG de *M. bovis* junto con controles negativos para análisis de PCR, entre siete laboratorios que utilizaron la secuencia de inserción IS6110 como punto diana para la amplificación del DNA. Cada laboratorio utilizó su propio protocolo para pretratamiento, extracción de DNA y detección del producto de amplificación. Se observaron altos niveles de resultados falsos positivos de la PCR entre los laboratorios participantes, que variaron entre el 3% y el 20% (con un extremo del 77% en un laboratorio). Este rendimiento relativamente bajo fue el resultado de la falta de monitorización de cada paso del procedimiento y destaca la necesidad de un control cuidadoso de la calidad durante todos los estadios del ensayo. Además, la inhibición de la amplificación y la comunicación errónea de resultados falsos negativos pueden ser un problema con la PCR. Por esta razón, el uso de un control de amplificación interna, o la documentación y la monitorización de la tasa de falsos negativos de un ensayo, son necesarios para la acreditación del laboratorio por el College of American Pathologists para los laboratorios que utilizan estas pruebas.

La amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real es un método más rápido para realizar la PCR u otros métodos de amplificación, donde amplificación y detección ocurren en el mismo recipiente de reacción. Éste está cerrado, lo que disminuye en forma significativa la posibilidad de contaminación por amplicones del laboratorio. Se han diseñado varios ensayos para la detección rápida de *M. tuberculosis*, disponibles en una gran variedad de formatos.

Se describieron varios ensayos que utilizan el sistema LightCycler (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Algunos son específicos de *M. tuberculosis* que usa un conjunto único de sondas para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).^{185,228} Miller y cols. examinaron 135 muestras con tinción ácido-alcohol resistente positiva, de las cuales 105 dieron *M. tuberculosis*. Tanto el ensayo LightCycler como la prueba de PCR para *M. tuberculosis* Amplicor con la cual se comparó detectaron 103 de 105, lo que dio una sensibilidad del 98,1% para cada uno de ellos. Estos autores también estudiaron 232 frascos de cultivo BacT/Alert MP de muestras respiratorias, 114 de los cuales fueron positivos para *M. tuberculosis*. Todos los cultivos positivos fueron detectados mediante el ensayo LightCycler.²²⁸

Shrestha y cols. abordaron otro enfoque e idearon una PCR de amplio espectro para detectar todas las micobacterias, pero que no diferenciaba *M. tuberculosis* de las micobacterias no tuberculosas sobre la base de un análisis de la curva de fusión posamplificación.³¹⁵ Una vez completada la amplificación, se pueden generar curvas de fusión con algunos tipos de ensayos de amplificación en tiempo real. Los ensayos que utilizan sonda FRET producen curvas de fusión muy distintas que distinguen incluso la diferencia en un solo nucleótido en los sitios

de hibridación de la sonda. Shrestha y cols. utilizaron esta característica para diferenciar *M. tuberculosis* de no tuberculosis utilizando tanto 186 aislamientos cultivados como 50 muestras clínicas que fueron positivas para *M. tuberculosis*. Tanto el ensayo LightCycler como la prueba de PCR para *M. tuberculosis* Amplicor con la cual se comparó detectaron 48 de 50 muestras.

Los resultados de los ensayos de PCR en tiempo real son innatamente cuantitativos, y cuando se los utiliza con estándares se puede determinar la cantidad definitiva de un microorganismo presente. Kramme y cols. describen un ensayo de PCR en tiempo real, donde no sólo se detecta la presencia del microorganismo, sino que se puede determinar su cantidad.¹⁸³ Asimismo, Rondini y cols. crearon un ensayo basado en la prueba Taqman para la detección de otro patógeno micobacteriano cutáneo importante: *M. ulcerans*.²⁹³

Análisis posamplificación HIBRIDACIÓN INVERSA

La hibridación inversa es similar en muchas formas al Southern blot tradicional, en que la reacción de hibridación por sondas de amplicones ocurre sobre un sustrato de nitrocelulosa o similar. En esta técnica, las múltiples sondas se inmovilizan en una tira de nitrocelulosa y se aplica el amplicón a la tira, que es la inversa de un Southern blot. Se forman líneas o puntos en el sitio de hibridación de la sonda de amplicones. Cuando se compara este patrón con una clave, es posible interpretar los resultados de la reacción (fig. 19-3). La ventaja sobre el Southern blot tradicional es que se prueban simultáneamente muchas sondas y no se utilizan radioisótopos.

La hibridación inversa se comercializa como ensayos de sondas en línea (LiPA) (Innogenetics, Gent, Bélgica y Bayer Diagnostics, Tarrytown) o tiras de transferencia inversa de puntos (*reverse dot blot strips*) (Roche). Además de los ensayos para genotipificación de HCV, genotipificación de HIV para mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales, subtipificación de papilomavirus humano (HPV) y detección de hongos patógenos, existe un ensayo para la identificación rápida de micobacterias. La primera versión examinada del ensayo de hibridación inversa fue el LiPA Mycobacteria (Innogenetics). Este ensayo utilizaba una PCR de amplio espectro dirigida contra la región espaciadora de 16S a 23S y sondas para el complejo *M. tuberculosis*, el complejo MAI y las siguientes especies de micobacterias: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, grupo de *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. xenopi* y *M. scrofulaceum*.²³⁰ Miller y cols. estudiaron 60 cepas clínicas de micobacterias aisladas en 59 pacientes utilizando este producto y no observaron ninguna discrepancia con la identificación de laboratorio de rutina con la mayoría de las cepas, aunque algunas especies no fueron identificadas.²³⁰ De los aislamientos evaluados, 26 fueron del complejo *M. tuberculosis*, 9 de *M. avium*, 3 del complejo MAI, 3 de *M. kansasii*, 4 de *M. gordonae* y 5 del grupo *M. chelonae*. Las muestras de tres pacientes tuvieron reacciones positivas para el complejo MAI y luego se determinó que tenían *M. intracellulare* mediante análisis de PCR-RFLP. Otras siete especies de micobacterias fueron identificadas sólo en su categoría de género (especies de *Mycobacterium*); seis de éstas fueron *M. fortuitum* y una fue *M. szulgai*. Otros distintos grupos han examinado este producto con resultados similares y durante estos estudios detectaron problemas menores que condujeron al desarrollo de una versión nueva y mejorada.^{304,339,351} También se ha utilizado la PCR seguida de hibridación inversa en muestras clínicas directas, con resultados excelentes de las muestras con frotis positivos.¹⁶⁰ La versión más nueva, la INNO-LiPA

Línea marcadora	
Control conjugado – 1	Control conjugado
Género MYC – 2	Género de <i>Mycobacterium</i>
Complejo <i>M. tuberculosis</i> – 3	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
MKA-1 – 4	<i>M. kansasii</i> I
MKA-2 – 5	<i>M. kansasii</i> II
MKA-3 – 6	<i>M. kansasii</i> III, IV, V
MXE – 7	<i>M. xenopi</i>
MGO – 8	<i>M. goodii</i>
MGV – 9	<i>M. goodii</i>
MSI – 10	<i>M. simiae</i>
MMU – 11	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
MCE – 12	<i>M. celatum</i>
MAIS – 13	Complejo MAIS
MAV – 14	<i>M. avium</i>
MIN-1 – 15	<i>M. intracellulare</i> 1
MIN-2 – 16	<i>M. intracellulare</i> 2
MCS – 17	<i>M. scrofulaceum</i>
MML – 18	<i>M. malmoense</i>
MHP – 19	<i>M. haemophilum</i>
MCH-1 – 20	<i>M. chelonae</i> I, II, III, IV
MCH-2 – 21	<i>M. chelonae</i> III
MCH-3 – 22	<i>M. chelonae</i> I
MFO – 23	Complejo <i>M. fortuitum</i>
MSM – 24	<i>M. smegmatis</i>

Figura 19-3 Se muestra el ensayo de hibridación inversa INNO-LiPA MYCOBACTERIA V2 (Innogenetics, Gent, Bélgica). Esta tira contiene una línea de control conjugada y sondas de hibridación para detectar el género *Mycobacterium* y la información de la identificación de 16 especies diferentes. (La fotografía proviene del prospecto del envase de la compañía).

Mycobacteria v2, ha ampliado la cantidad de especies de micobacterias hasta 16. Tortoli y cols. evaluaron 197 micobacterias pertenecientes a 81 taxones con este producto y observaron una especificidad y una sensibilidad del 100% para 20 de 23 sondas. Las sondas específicas para el complejo *M. fortuitum*, para el grupo MAI-escofuláceo y para *M. intracellulare* tipo 2 mostraron reactividad cruzada con varias micobacterias que pocas veces se aíslan en las muestras clínicas. La sensibilidad global fue del 100% y la especificidad global fue del 94,4%.³⁵⁰

También se ha mostrado que los ensayos de hibridación inversa son útiles para la detección de los determinantes genéticos de resistencia a la rifampicina.^{4,40,70,159,314,325} Como sucede con la identificación de especie, se ha logrado la detección de los determinantes genéticos de resistencia directamente de la muestra clínica.¹⁵⁹ A diferencia de la secuenciación de DNA descrita más adelante, la LiPA es técnicamente mucho más fácil de realizar que la secuenciación de DNA, con un análisis posanalítico más simple.

SECUENCIACIÓN DEL DNA

La secuenciación del DNA para el análisis de un producto amplificado es ahora un método frecuente de análisis

posamplificación. Si bien es útil, es una técnica más complicada que la hibridación simple con sonda y a menudo requiere que el usuario tenga experiencia con la alineación de secuencias y el software de edición, y las bases de datos genéticos. El análisis de estas regiones variables interpuestas entre regiones conservadas que sirven como sitios de hibridación de cebadores de amplio rango se convierte en una herramienta poderosa para la identificación de los microorganismos.^{30,101,108,114,194,208,275,309,363,382,400}

La secuenciación tradicional del DNA, también conocida como secuenciación de Sanger, se utilizaba en otra época sólo en laboratorios de investigación, pero también se ha vuelto frecuente en muchos laboratorios de patología y microbiología molecular (véase la sección "Secuenciación del DNA" en el cap. 4). Estos métodos se han empleado con éxito para la identificación de bacterias, micobacterias, nocardias y hongos. Los genes que codifican las subunidades ribosómicas de estos microorganismos son los puntos diana genéticos más utilizados de identificación basada sobre secuencias.

Esta técnica está revolucionando la identificación de laboratorio de los microorganismos de crecimiento lento, como micobacterias y nocardias.^{50,122,167,223,254,260} Una de las regiones más útiles del complejo genético 16S para la identificación de micobacterias involucra la región A hipervariable. Esto se ha usado para lograr una identificación rápida y precisa basada sobre secuencias de las micobacterias de mayor importancia clínica.^{76,123} También se utilizó para ayudar a identificar y diferenciar los aislamientos más difíciles de caracterizar.³²⁸ Esta región ha sido utilizada con éxito para la identificación de las micobacterias de mayor relevancia clínica mediante una técnica más nueva; la pirosecuenciación o la secuenciación por síntesis (véase cap. 4).³⁵⁶

MicroSeq (Applied Biosystems, Inc. [ABI], Foster City, CA) es un sistema comercial para la identificación de microorganismos por secuenciación de DNA. Después del cultivo, se realiza una PCR utilizando los cebadores provistos. Se determina la secuencia a través del sistema de secuenciación capilar ABI y se remite el producto como interrogante a una base de datos genéticos que es mantenida y actualizada por el fabricante. Hall y cols.¹²² examinaron esta base de datos utilizando 59 cepas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y 328 aislamientos clínicos. La identificación basada en las secuencias permitió que con < 1% de la denominada puntuación de distancia se reconociera el 98,3% (58 de 59) de las cepas ATCC, el grupo o complejo correcto y el 90,1% (219 de 243) de las cepas clínicas. De las cepas restantes que tuvieron puntuaciones de distancia > 1%, el 41,1% (35 de 85) se identificaron correctamente en el nivel de especie, el complejo o el grupo, mientras que el 15,3% (13 de 85) se identificaron en la categoría de especie. Lo más importante es señalar que el tiempo de respuesta informado para la identificación de micobacterias es de menos de 24 horas, lo que implica una diferencia enorme con respecto al tiempo de identificación requerido por los métodos fenotípicos tradicionales.

Los genes *rpoB*, *hsp* y *tuf* también fueron utilizados con éxito como puntos diana genéticos para la identificación sobre la base de secuencias de distintas bacterias.^{81,82,95,167,192,251,252,286} El gen *rpoB*, que codifica una RNA polimerasa DNA-dependiente, ha sido utilizado por varios grupos para la identificación de micobacterias.^{173,174,201,355} La secuenciación de este punto diana génico tiene aceptación porque no sólo proporciona información para la identificación, sino que también brinda información relativa a la sensibilidad de la cepa aislada a la rifampicina.^{325,362}

ANÁLISIS DE MICROMATRICES

Las micromatrices, dispositivos llamados comúnmente chips genéticos, han sido utilizadas extensamente para la investigación. También se las utilizó para la identificación de micobacterias y la detección de los determinantes genéticos de resistencia. Troesch y cols. describen el uso de un microensayo que examinó dos regiones genéticas: la 16S rDNA y el gen *rpoB*.³⁵⁵ Estos autores examinaron 70 micobacterias que representaban 27 especies diferentes y 15 aislamientos resistentes a la rifampicina de *M. tuberculosis* con este microensayo y pudieron identificar 26 de 27 especies y todas los mutantes resistentes. Las micromatrices se muestran muy promisorias, pero son costosas, y actualmente siguen siendo una herramienta de investigación. No se ha determinado aún el papel preciso que desempeñarán en el laboratorio común de micobacteriología.

Tipificación de cepas y huellas moleculares de DNA

El advenimiento de las técnicas moleculares permite el análisis específico de cepa de los aislamientos de *M. tuberculosis* a los fines de los estudios epidemiológicos. Se identificó específicamente la secuencia de inserción, IS6110, como el punto diana de una sonda de DNA que se iba a utilizar en el análisis de huellas moleculares (*fingerprinting*).^{38,39} Todas las cepas de *M. tuberculosis* conservan un gran número de copias de IS6110. La técnica específica de huellas moleculares descrita requiere la digestión del DNA genómico con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, seguida de la separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa, que transfiere los fragmentos de DNA a una membrana de nailon y la hibridación de la membrana con segmentos de DNA clonados que representan dos porciones diferentes de IS6110.

Varios investigadores han utilizado la secuencia de inserción IS6110 como punto diana para llevar a cabo estudios epidemiológicos. Yang y cols. compararon los patrones de huellas moleculares de 68 aislamientos de micobacterias obtenidos de pacientes HIV seropositivos con tuberculosis en la región de Dar es Salaam de Tanzania, con 66 cepas aisladas en pacientes HIV negativos que vivían en la misma región.⁴⁰⁵ Observaron 101 patrones de huellas moleculares entre este grupo de pacientes, con un nivel de diversidad igual entre los dos. De estos aislamientos, el 8,8% mostró resistencia al menos a un fármaco, nuevamente, sin ninguna tendencia a incluirse dentro de ninguno de los grupos. En un estudio de los patrones de huellas moleculares IS6110 de *M. tuberculosis* aislado en 64 pacientes que vivían en la Polinesia Francesa, se identificaron 11 grupos separados.³⁴⁸ Se identificó un grupo de cepas con patrones idénticos entre grupos familiares, lo que indicó que la transmisión activa desempeña un papel tan importante como la enfermedad por reactivación en esa región geográfica. Asimismo, en un estudio ulterior, se observó un alto grado de probabilidad en los patrones de huellas moleculares IS6110 entre individuos con parentesco cercano.⁴⁰⁶ Uno de los grupos prevalentes definidos por IS6110 en Groenlandia representó el 91% de 245 casos de tuberculosis detectados en Dinamarca durante el mismo período. La pesquisa epidemiológica de estos casos condujo a un grupo de inmigrantes de Groenlandia que vivían en una región pequeña y definida de Dinamarca.

Van Soolingen y cols. detectaron 43 patrones diferentes de huellas moleculares IS6110 de 153 cepas de *M. bovis* originadas en ganado vacuno y seres humanos en Holanda y la Argentina, en varios animales de los zoológicos holandeses y en un parque de vida salvaje en Arabia Saudita, y de focas y gatos enfermos en la Argentina.³⁶⁰ Las cepas que presentaban una

banda única fueron características de las cepas aisladas en el ganado vacuno. De los 20 aislamientos en seres humanos en la Argentina, 18 mostraron una banda única, similar a la observada en las cepas de ganado vacuno, lo que sugiere con firmeza una transmisión bovina-humana. Los patrones de huellas moleculares de los aislamientos de *M. bovis* humanos en Holanda fueron difusos, salvo por patrones similares en cinco pacientes, todos vivían en Amsterdam y tres de ellos provenían de la misma familia. Cave y cols. observaron que los patrones de polimorfismo de longitud de los fragmentos IS6110 entre seis aislamientos de *M. bovis* de 1 paciente y 42 aislamientos repetidos de *M. tuberculosis* de 18 pacientes se mantuvieron estables por un período de 8 meses a 4,5 años y no fueron alterados por los cambios en los perfiles de resistencia a los fármacos.³⁸ Estos estudios muestran la utilidad de los análisis de endonucleasas de restricción en los estudios epidemiológicos de la tuberculosis humana y animal.

Gran cantidad de investigadores han utilizado otros distintos elementos repetitivos de DNA como marcadores para la tipificación de cepas de *M. tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*. El espacio permite cubrir sólo algunas de estas aplicaciones de la pléthora de manuscritos publicados en los últimos diez años. Hermans y cols. descubrieron una inserción de DNA micobacteriano específico del complejo que hibridaba específicamente con DNA de cepas del complejo *M. tuberculosis*.¹³⁵ Se amplificó un fragmento de 158 pares de bases no repetitivo de esta secuencia con PCR y se utilizó para la detección selectiva de micobacterias del complejo de *M. tuberculosis* directamente en líquido pleural, lavados bronquiales y biopsias, hasta un límite inferior de sensibilidad de 20 células bacterianas (aproximadamente 10³ células en una muestra de esputo). Wiid y cols. utilizaron el oligonucleótido GTG5 como marcador para la identificación de cepas de *M. tuberculosis*, que hallaron útil en casos en los cuales ciertas cepas tienen poco o ningún elemento de inserción como IS6110.³⁸⁵ Friedman y cols. utilizaron amplificación con PCR de segmentos de DNA localizados entre dos copias de elementos repetitivos IS6110 y la secuencia repetitiva rica en GC polimorfo (PGRS).⁹⁹ Se utilizó un segmento de 439 pares de bases amplificado por PCR del gen de la proteína del choque térmico (HSP) de 65 kDa para desarrollar patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de varias especies de *Mycobacterium* de crecimiento rápido, que incluyeron *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* y *M. mucogenicum*.³³³ El elemento de secuencia de inserción repetitiva IS1245 fue utilizado en un estudio de aislamientos humanos y animales de *M. avium*.¹¹⁹ En otro estudio, se utilizaron las secuencias de inserción repetitivas IS1311 y ID900 como sondas de DNA en la evaluación del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de 75 cepas clínicas de *M. avium*.²⁹² Se han utilizado dos marcadores, uno de los cuales codifica una proteína de 40 kDa (p40) y la secuencia de inserción IS901-IS902 como marcadores moleculares en la tipificación de 184 cepas de campo del complejo *M. avium*.⁵

Para tipificar 16 cepas de *M. haemophilum* se utilizó electroforesis de campo pulsado de los fragmentos de restricción generados por la digestión del DNA cromosómico y 12 de esas cepas mostraron patrones similares, incluidas 6 del mismo hospital.⁴⁰³ Esta técnica también se utilizó para identificar a varios pacientes que estaban infectados por más de una cepa del complejo MAI.³²⁰ En el estudio de varios cebadores se utilizó DNA polimorfo amplificado aleatorio (*random amplified polymorphic* DNA, RAPD; también denominado PCR de cebador arbitrario) para determinar cuáles logran una mayor discriminación en la obtención de huellas moleculares reproducibles para la

tipificación de las cepas de *M. tuberculosis*.²⁰⁶ Esta técnica también ha sido utilizada para tipificar 15 cepas de *M. tuberculosis*, con una región amplificada por PCR que separa los genes que codifican rRNA 16S y 23S que sirven como marcador.¹ Según estos autores, la tipificación molecular por RAPD es más rápida y menos exigente desde el punto de vista técnico que la mayoría de los otros métodos de tipificación molecular. Además, se necesitan cantidades menores de DNA purificado que para otros métodos, lo que permite un análisis más temprano de los aislamientos primarios jóvenes de *M. tuberculosis*.

Kirschner y cols. han creado colecciones de perfiles de fragmentos de restricción de subunidades de rRNA 16S extraídas de varias especies de *Mycobacterium* caracterizadas antes mediante pruebas bioquímicas o sondas de ácidos nucleicos.¹⁷⁸ Se puede comparar fácilmente el perfil específico de endonucleasas de restricción de una especie desconocida de *Mycobacterium* con el perfil de la colección, lo que proporciona un medio rápido de identificación precisa sin cultivo. Asimismo, Avaniss-Aghajani y cols. desarrollaron un método para identificar aislamientos de micobacterias directamente en agua y muestras clínicas.¹³ La PCR fue utilizada primero para amplificar una porción del rRNA de subunidad pequeña (SSU) de 13 especies diferentes de micobacterias, utilizando un cebador 5' PCR que llevaba una marca fluorescente para permitir la detección del producto amplificado. El producto de la PCR fue digerido con endonucleasas de restricción y se determinaron los tamaños de los fragmentos de restricción marcados mediante un secuenciador de DNA automático. Se ha desarrollado una colección de longitudes de los fragmentos de restricción 5' producida mediante cinco endonucleasas de restricción que puede categorizar 20 especies de *Mycobacterium*. Cada especie de *Mycobacterium* tiene una longitud singular del fragmento de restricción 5' para cada endonucleasa específica, cuyas selecciones se pueden utilizar para hacer identificaciones de especies desconocidas. Las ventajas de estas técnicas sobre los métodos de PCR rápidos son el menor costo y la capacidad para caracterizar varias especies de *Mycobacterium* y detectar más de una especie en la misma muestra.

También se han empleado métodos de tipificación en la detección de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos. En estudios separados, Whelen y cols.³⁸³ y Felmlee y cols.⁹¹ utilizaron métodos específicos para detectar las mutaciones de la subunidad beta de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* (*rpoB*) que se asocian con mayor frecuencia con la resistencia a la rifampicina. Plikaytis y cols., en el estudio de un brote de tuberculosis resistente a múltiples fármacos en la ciudad de Nueva York, utilizaron un ensayo de PCR múltiple dirigida a una repetición directa de IS6110 con una secuencia interpuesta de 556 pares de bases (NTF-1), para identificar a los pacientes que estaban infectados con lo que ellos designaron como cepas "W" de *M. tuberculosis* multirresistentes.²⁶⁶ Su ensayo identificó en forma correcta la totalidad de los 48 aislamientos de la cepa W de *M. tuberculosis*, entre un total de 193 cepas estudiadas. Estos estudios son indicativos del grado de sofisticación alcanzado por las técnicas moleculares y de las aplicaciones prácticas para las cuales se han utilizado.

Pruebas de sensibilidad

Desde el surgimiento de cepas multirresistentes, la necesidad de pruebas de sensibilidad a los antibióticos rápidas y precisas para *M. tuberculosis* se ha convertido en un requisito. Un

estudio nacional realizado por los CDC a comienzos de la década de 1990 mostró que el 14,9% de los aislamientos en pacientes con tuberculosis eran resistentes al menos a uno de los agentes antituberculosos y el 3,3% eran resistentes tanto a INH como a rifampicina.^{56,83} En un punto en la ciudad de Nueva York, se aislaron cepas resistentes al menos a un fármaco, incluida la resistencia emergente a las fluoroquinolonas en el 33% de los casos, y la incidencia de resistencia a INH y rifampicina en el 19%.³⁴⁰ Además de la resistencia asociada con el mal uso de tratamientos antibióticos, la resistencia de las micobacterias a los fármacos puede ocurrir como un proceso de evolución aleatoria, independiente de la exposición a los agentes.

En un cultivo de bacilos tuberculosos, la frecuencia de los mutantes resistentes a los fármacos se ha calculado en alrededor de $1:10^5$ bacterias para INH y en $1:10^6$ para estreptomycin. Si se administran juntos dos fármacos (INH y estreptomycin), la incidencia de resistencia es de $1:10^{11}$, la cual es la suma ($1:10^5 + 1:10^6$) de las dos tomadas por separado. El conocimiento de la incidencia de mutantes se torna importante porque se ha determinado que los pacientes que tienen una cavidad pulmonar abierta pueden tener una población total de bacilos de 10^7 a 10^9 bacterias. Por lo tanto, si estos pacientes son tratados con un único antituberculoso, sus cultivos pueden mostrar pronto la aparición del fenotipo resistente a ese agente, y el tratamiento fracasa. En consecuencia, los pacientes con tuberculosis siempre deben ser tratados con dos o, de preferencia, tres fármacos. Por consiguiente, si los pacientes no reciben más de un fármaco, esto puede conducir al rápido surgimiento de un bacilo tuberculoso resistente a agentes específicos (fig. 19-4). Después de seguir a un grupo de pacientes infectados simultáneamente por *M. tuberculosis* y el virus del SIDA, Nolan observó que el incumplimiento del tratamiento antituberculoso era la razón primaria para el fracaso terapéutico.²⁴⁵ La falta de cumplimiento del tratamiento instituido también puede contribuir a la aparición de resistencia a los fármacos.

Un segundo principio de las pruebas de sensibilidad a los agentes contra las micobacterias, que es muy relevante para las de *M. tuberculosis*, se basa sobre la correlación in vitro entre la respuesta clínica a un antimicobacteriano y el resultado de las pruebas de sensibilidad in vitro. Si más del 1% de los bacilos tuberculosos presentes son resistentes a un fármaco in vitro, el tratamiento con ese fármaco no es clínicamente útil. Por lo tanto, la mayoría de los métodos para las pruebas de sensibilidad a los fármacos de las micobacterias deben ser capaces de determinar la proporción de bacilos sensibles y resistentes a un agente dado. Cuando se utilizan los métodos de dilución en agar, el inóculo debe ser adaptado de modo que la cantidad de mutantes espontáneamente resistentes no conduzca al error de interpretar el cultivo como resistente. Del mismo modo, debe existir una cantidad suficiente de colonias en la placa para poder determinar la incidencia de resistencia a los fármacos en el intervalo del 1%. Esto se logra mejor cuando se presentan 100 a 300 UFC en cada cuadrante de una placa de Petri de cuatro cuadrantes. Para determinar la incidencia de resistencia, suele ser necesario inocular dos conjuntos de placas de pruebas de sensibilidad, el segundo conjunto con una dilución de 100 veces del inóculo utilizado para el primer conjunto. Este procedimiento se conoce como método de prueba de sensibilidad proporcional.

La prueba se realiza en placas de Petri de plástico divididas en cuatro cuadrantes. Se colocan cinco mililitros de medio de agar en cada cuadrante: el primero, sin ningún antimicobacteriano, se utiliza como control del crecimiento; los otros tres,

contienen concentraciones variadas del fármaco por evaluar. Aunque en el pasado los fármacos se incorporaban en medios espesados con base de huevo, el uso de agar 7H10 como base es el medio actual y recomendado, si se va a realizar este tipo de prueba.³⁹⁶ Los fármacos se agregan después de enfriar el agar a 45 °C, lo que disminuye cualquier pérdida de actividad que pueda ocurrir durante el espesamiento. Puede haber una pérdida adicional de actividad del fármaco en los medios con base de huevo como resultado de algunos agentes que se unen a la albúmina y a otras proteínas.

Debido a la necesidad de un tiempo de producción más rápido de los resultados y a superar ciertos problemas inherentes a las pruebas de sensibilidad a los antituberculosos por dilución en agar *in vitro*, en la actualidad se recomienda una prueba basada sobre un cultivo en caldo porque los resultados son más exactos y precisos y se obtienen antes que con las pruebas realizadas en medios sólidos.¹⁴⁹ Heifets cita tres desventajas del uso de los medios de agar:¹³³

1. La actividad de algunos antituberculosos está comprometida por la unión al agar o a los componentes proteicos en el medio.
2. Los resultados finales cuando se utiliza agar requieren tiempos de incubación prolongados, lo que puede reducir la potencia de ciertos antibióticos.
3. Por razones desconocidas, algunas especies de *Mycobacterium* pierden su potencia cuando se evalúan en agar, al contrario de lo que sucede cuando crecen en caldo. Para establecer en caldo que *M. tuberculosis* era "sensible", el parámetro de inhibición del 99% debía ser equivalente a la falta de aumento del índice de crecimiento en el caldo de prueba durante al menos 4 a 5 días luego de la inoculación de una dilución 1:100 del inóculo en comparación con un control en caldo no inoculado.

En el pasado, la mayoría de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en caldo para micobacterias utilizaban el sistema radiométrico BACTEC, que incluye el instrumento BACTEC 460 ajustado a una "capucha" para TB (TB hood) y frascos BACTEC 12B. La base de esta prueba en caldo es la detección radiométrica del ¹⁴C liberado del medio líquido 7H12 que contiene ácido 1-[¹⁴C] palmítico por las bacterias metabolizadas.²²⁶ El instrumento BACTEC 460 ha sido adaptado en muchos laboratorios para realizar pruebas de sensibilidad. El principio de operación del instrumento implica la aspiración del gas del espacio del cabezal por encima del medio de un frasco ampolla inoculado y la detección cuantitativa de la cantidad de radiactividad del aspirado que, a su vez, refleja el grado de crecimiento en el frasco ampolla. Se comparan los recuentos de radiactividad del gas del cabezal con un nivel basal predeterminado y se puede establecer un crecimiento inicial. (Véase protocolo 19-18 para los detalles en la ejecución de esta prueba).

Varios estudios publicados confirman que el nivel de concordancia entre los métodos estándar y radiométrico de las pruebas de sensibilidad excede el 90%, al menos para los microorganismos sensibles.^{196,287} Los primeros problemas en la exactitud de la detección radiométrica de cepas resistentes se resolvieron adaptando la concentración del antibiótico incluido en los frascos de cultivo.¹²⁶ Por ejemplo, al aumentar la concentración de estreptomina de 4 a 6 g/mL mejoró la correlación con 10 g/mL en el método 7H10; un ajuste del etambutol hasta 2,5 g/mL se correlaciona con 5 g/mL para las cepas resistentes evaluadas por el método convencional.^{126,395} En relación

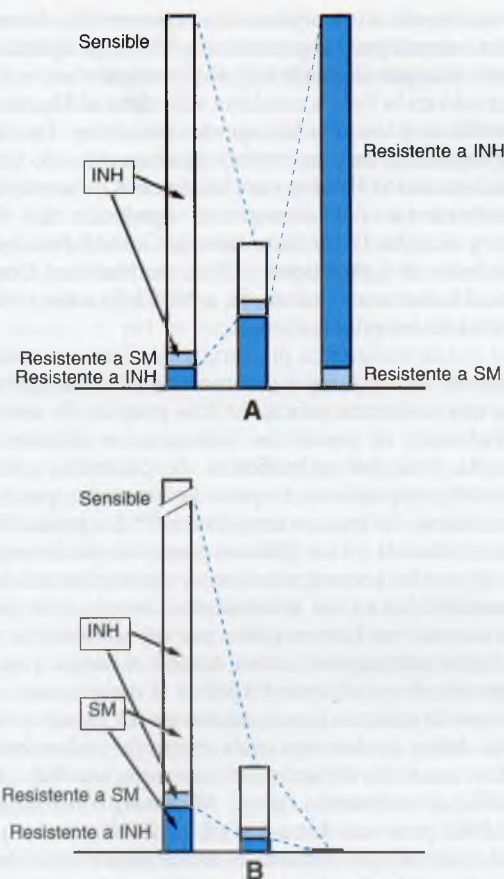


Figura 19-4 Surgimiento de resistencia a los antibióticos de las micobacterias con el tratamiento con uno o dos fármacos. (A) El paciente es tratado sólo con isoniazida (INH). Aunque la pequeña cantidad de mutantes resistentes a la estreptomina (SM) son inhibidos por la INH, los mutantes resistentes a la INH son refractarios y, con el tiempo, constituyen la mayoría de la población. Esto representa un fracaso del fármaco. (B) El paciente es tratado tanto con estreptomina como con INH. Los mutantes resistentes a la estreptomina son inhibidos por la INH y los mutantes resistentes a la INH son inhibidos por la estreptomina. Por lo tanto, ninguna de estas cepas mutantes puede crecer de forma exagerada y el tratamiento farmacológico es exitoso. (Extraído de Crofton J. Some principles in the chemotherapy of bacterial infections. BMJ 1969;2:209-212).

con INH en la detección de resistencia, Hawkins y cols. determinaron que la mayoría de las discrepancias eran causadas por cepas resistentes a INH a 0,2 g/mL pero no a 0,1 g/mL; por lo tanto, la reducción de la concentración del fármaco en el frasco ampolla con INH hasta 0,1 g/mL redujo el problema.¹³⁰

El BACTEC MGIT 960 (BD Diagnostic) y el ESP II System (Trek Diagnostics) son métodos no isotópicos en caldo para realizar pruebas de sensibilidad en micobacterias. Estos métodos, así como el BACTEC 460, son los únicos aprobados por la FDA para este propósito, pero se están desarrollando otros métodos.³⁹⁶

En la actualidad, los fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones por micobacterias son los utilizados primariamente para la tuberculosis clásica, aquellos para las micobacterias no tuberculosas y los utilizados para el tratamiento de la lepra.⁴⁰⁴ Los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis son isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida. Los agentes de segunda línea son

ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, etionamida, kanamicina, amikacina, viomicina y capreomicina.^{322,331} Los agentes de primera línea, excepto el etambutol, se consideran bactericidas; el resto incluido en la lista secundaria sólo debe utilizarse cuando se desarrolla resistencia a los agentes primarios. En el cuadro 19-10 se enumeran las concentraciones sugeridas de los fármacos seleccionados utilizados para las pruebas de sensibilidad de las micobacterias del documento aprobado del Clinical Laboratory Standards Institute (antes, Comité Nacional para los Estándares de Laboratorios Clínicos, National Committee for Clinical Laboratory Standards, o NCCLS) sobre pruebas de sensibilidad de las micobacterias.

Aun si existe resistencia primaria a un fármaco, como INH, el tratamiento con la terapia recomendada de tres agentes proporciona una cobertura suficiente. Las pruebas de sensibilidad deben realizarse en todos los aislamientos iniciales de *M. tuberculosis* y en los aislamientos de pacientes que siguen teniendo cultivos positivos después de 3 meses o que muestran pruebas clínicas de fracaso terapéutico.³⁹⁶ La probabilidad de resistencia inducida en los últimos grupos de pacientes es alta. Si no se siguen las recomendaciones y no se efectúan las pruebas de sensibilidad en los aislamientos obtenidos de pacientes que previamente no fueron vistos por un laboratorio, se debe guardar como mínimo un cultivo durante 6 meses a un año en el caso de que el paciente no responda al tratamiento.

Las cepas de control que se utilizan en los estudios de sensibilidad se deben probar con cada grupo de aislamientos evaluados. Los controles deben incluir una cepa sensible, una cepa de sensibilidad intermedia (p. ej., *M. kansasii* resistente a 0,2 g/mL de INH, pero sensible a 1 g/mL de INH) y una cepa resistente. No existe ningún método estándar para evaluar los agentes en combinación. Aunque no se establecen los criterios interpretativos de sensibilidad y resistencia para evaluar múltiples agentes en combinación, la velocidad de destrucción determinada por las curvas de tiempo/destrucción puede tener más relevancia clínica que el grado de destrucción.³³⁰

El único fármaco para el cual se recomiendan pruebas de sensibilidad *in vitro* cuando se evalúan miembros del MAI es la claritromicina. No se puede utilizar como guía el empleo de los criterios de interpretación aplicados a *M. tuberculosis* para el tratamiento de los pacientes con MAI.¹⁴⁹ Los miembros del

MAI son previsiblemente resistentes a la isoniazida y la pirazinamida y sensibles a la rifampicina y el etambutol sólo con algunas variaciones de grado. No existe ninguna correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y el resultado clínico de los pacientes con MAI para los fármacos distintos de claritromicina. Además, algunos autores creen que los perfiles de sensibilidad de los fármacos son más variables cuando se evalúa MAI en comparación con *M. tuberculosis*. Se estima que las variantes de colonias translúcidas son más resistentes a los antibióticos que las cepas rugosas, y que las cepas no pigmentadas son más resistentes que las que producen pigmento. Sin embargo, las variantes pigmentadas crecen más rápidamente y es posible que una cepa no pigmentada de crecimiento más lento, aunque esté presente, pueda ser enmascarada por una variante pigmentada de crecimiento más rápido; por lo tanto, el examen de las cepas pigmentadas más obvias puede conducir a resultados de falsa sensibilidad.³³⁶

Para las pruebas de sensibilidad de las especies de crecimiento rápido, se puede utilizar microdilución en caldo, pero también puede ser útil el Etest (AB Biodisk North America, Piscataway NJ). Biehle y cols. realizaron Etests para 100 cepas clínicas de micobacterias de crecimiento rápido contra seis fármacos: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina e imipenem.²² El Etest es una tira impregnada en antibiótico en la cual se absorbe el antibiótico de prueba para producir un gradiente de concentración de la parte superior de la tira a la parte inferior, por lo menos a través de 15 duplicaciones de diluciones. El antibiótico que se difunde proporciona un gradiente de concentración inhibitoria mínima (CIM) continuo en el agar, que puede interpretarse mediante la lectura del menisco de inhibición del crecimiento con una escala de calibración impresa en la tira. Estos autores encontraron una concordancia del 85% entre los resultados del Etest y las CIM por dilución en agar dentro de 1 log₂ y una concordancia del 97% en dos diluciones log₂. Las tasas de errores mayores y menores fueron del 2,2% y del 11,7% respectivamente; no hubo errores muy importantes (desacuerdo de tres o más diluciones log₂). La concordancia interlaboratorio entre las CIM del Etest determinadas en dos laboratorios separados fue del 81% dentro de una dilución log₂ y del 92% dentro de dos diluciones log₂. Estos autores llegaron a la conclusión de que Etest puede ser un

Cuadro 19-10 Concentración de fármacos para las pruebas de sensibilidad mediante el método de proporción con distintos medios de cultivo		
FÁRMACO	CONCENTRACIONES DEL FÁRMACO (µg/mL)	
	Middlebrook 7H10	Löwenstein-Jensen
Isoniazida	0,2, 1	0,2; 1
Estreptomina	2	4
Rifampicina	1	40
Etambutol	2	2
Etionamida	5	20
Kanamicina	5	20
Capreomicina	10	20
Cicloserina	20	30
Pirazinamida	50	—

Tomado de McClatchy JK. En: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980.

método exacto y reproducible para determinar la sensibilidad de las micobacterias de crecimiento rápido.

El Clinical Laboratory Standards Institute ha publicado un documento que proporciona una guía considerable para las pruebas de sensibilidad de las micobacterias, nocardias y otros actinomicetos aerobios.^{49a} Las recomendaciones de las pruebas de sensibilidad a los antimicobacterianos para micobacterias que no son cubiertas en esta sección se explican en este documento. Nosotros sugerimos que todos los laboratorios que realizan pruebas de sensibilidad estén familiarizados con él.

En conclusión, las pruebas de sensibilidad para *M. tuberculosis* basadas sobre caldo, cuando son realizadas según condiciones de prueba bien controladas con las concentraciones adecuadas de los fármacos, son confiables para los agentes de primera línea.¹³⁰ Varios sistemas comerciales hacen que esta prueba sea más fácil de realizar. Los resultados pueden ser determinados en 4 a 5 días, lo que es considerablemente menor que las 3 a 7 semanas necesarias con el uso de las técnicas estándares.

Tratamiento a corto plazo

Gosset ha proporcionado una ilustración gráfica de los tres tipos principales de lesiones tuberculosas que albergan micobacterias viables y la actividad de los agentes tuberculocidas más importantes en estas lesiones. Se propone que, en un paciente con tuberculosis pulmonar, se presentan tres poblaciones de micobacterias:¹¹¹

1. Las localizadas extracelularmente en cavidades abiertas.
2. Las localizadas intracelularmente en los macrófagos.
3. Las que se encuentran en lesiones caseosas cerradas.

Los microorganismos en cada sitio tienen actividades metabólicas y velocidades de replicación diferentes.

La tercera característica mencionada es de considerable importancia, porque la mayoría de las micobacterias son sensibles a los efectos bactericidas de los antibióticos sólo cuando se están preparando para dividir. Como *M. tuberculosis* es un aerobio estricto, la actividad metabólica y la velocidad de replicación varían con el aporte de oxígeno disponible. Esta velocidad puede ser alta, como en una cavidad en la cual los bacilos están sufriendo una división rápida o baja, sólo con una replicación infrecuente de bacilos, como en las lesiones caseosas cerradas. Una cavidad tuberculosa puede contener 10^7 a 10^9 microorganismos que se multiplican activamente en un medio ambiente neutro o ligeramente alcalino. En la medida en que uno de cada 10^5 a 10^6 micobacterias puede ser resistente a un único antimicobacteriano, la cavidad puede contener hasta 10^2 a 10^4 microorganismos resistentes a los fármacos. Esta población potencialmente grande de bacilos resistentes a los fármacos destaca la necesidad de utilizar al menos dos agentes bactericidas para el tratamiento eficaz de estas lesiones.

El segundo grupo de microorganismos hallado en un paciente con tuberculosis se localiza en los fagosomas de los macrófagos. El medioambiente intracelular en los macrófagos es ácido (pH 5.5), lo que conduce al crecimiento lento de las micobacterias. Se ha calculado que los fagosomas de los macrófagos no contienen más de 10^4 a 10^5 microorganismos y, por lo tanto, no es probable que contengan muchas cepas resistentes a los fármacos. La destrucción exitosa de las micobacterias en los macrófagos depende del uso de un antibiótico resistente al entorno ácido de los fagolisosomas de los macrófagos (p. ej.,

pirazinamida). Este requisito excluye a la estreptomina y a otros antibióticos aminoglucósidos que no penetran con facilidad en los macrófagos y pierden rápidamente actividad en un entorno de pH inferior.

La tercera población de micobacterias presentes en los pacientes con tuberculosis crónica se encuentra en la lesión caseosa cerrada. Estos microorganismos están presentes en zonas de necrosis, donde la irrigación está muy disminuida y la actividad metabólica de cualquier microorganismo superviviente presumiblemente es muy baja. Puede existir un total de 10^4 a 10^5 microorganismos en las lesiones caseosas cerradas donde, aunque el pH es neutro, la multiplicación es lenta o intermitente.

La estreptomina, el primero de los agentes micobactericidas, es más eficaz para destruir activamente los microorganismos extracelulares en multiplicación que se encuentran en las cavidades. A diferencia de la INH y la rifampicina, la estreptomina tiene poco efecto contra los microorganismos en las lesiones caseosas cerradas o aquellos que se encuentran en los fagosomas ácidos de los macrófagos. La isoniazida es activa contra todos los grupos de micobacterias en división rápida y contra las micobacterias de división lenta que se encuentran en el entorno ácido de los macrófagos. Aunque no es tan activa contra la rifampicina contra los microorganismos en las lesiones caseosas cerradas, la INH tiene cierto efecto bactericida sobre este grupo de micobacterias. La rifampicina es eficaz contra todos los grupos de microorganismos, sobre todo aquellos de las lesiones caseosas cerradas, donde la actividad de los microorganismos puede ser lenta y episódica. La rifampicina es el antimicobacteriano más universal. La pirazinamida es singular entre los bactericidas eficaces contra las micobacterias, ya que sólo es activa a pH ácido y, por ende, sólo es eficaz contra aquellos microorganismos que están en los fagosomas de los macrófagos.⁸⁵

Al contrario de los otros agentes que se acaba de mencionar, el etambutol no se considera un bactericida y no puede ser utilizado sólo con otro agente en un tratamiento breve. Sin embargo, puede penetrar tanto el medioambiente extracelular como el intracelular de las micobacterias e impedir la selección de mutantes resistentes. Algunos estudios recientes han sugerido que cuando se utiliza etambutol con tres o cuatro agentes bactericidas, puede desempeñar un papel en el acortamiento de la duración del tratamiento.

Además de los antituberculosos descritos, existen en los Estados Unidos capreomicina, kanamicina, etionamida y cicloserina. Los dos primeros son bactericidas para los microorganismos extracelulares de las cavidades grandes, mientras que los dos segundos son bacteriostáticos para los microorganismos intracelulares y extracelulares. Sin embargo, cuando es posible, se prefiere el tratamiento con estreptomina, isoniazida y rifampicina, pirazinamida o etambutol o una combinación de esos sobre los agentes menos utilizados.

El régimen más simple para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar no complicada es administrar INH y rifampicina durante un período de 9 meses. Se puede agregar estreptomina o etambutol durante las 2 a 8 primeras semanas. La duración del tratamiento de 9 meses contrasta notablemente con el período habitual previo de 18 a 24 meses, necesario cuando se utiliza INH y etambutol. La combinación de INH y rifampicina ha introducido el concepto de tratamiento de "curso breve" sobre la base de la capacidad de estos dos fármacos para esterilizar el tejido humano durante un período de 9 meses.⁹⁶ Otro aspecto importante adicional del tratamiento de curso breve es el hallazgo de que, luego de un mes inicial de tratamiento, se

puede administrar tanto INH como rifampicina dos veces por semana en lugar de diariamente. Este esquema permite tanto un ahorro de dos tercios en el uso del costoso fármaco rifampicina, como una mejor adherencia de los pacientes que reciben la medicación, sobre todo aquellos considerados poco confiables. Con este régimen, menos del 3% de los que completan la serie de tratamiento sufren una recaída. Un factor importante en el tratamiento de la tuberculosis cavitaria es la rápida eliminación de microorganismos por la acción bactericida de INH y rifampicina. Esto reduce en gran medida la aparición de microorga-

nismos resistentes a los fármacos, lo que ocurre muy a menudo cuando se utiliza un único antibiótico.

Recomendaciones de la American Thoracic Society

Un comité de la reunión científica de la American Thoracic Society (ATS) sobre microbiología, tuberculosis e infecciones pulmonares ha publicado recomendaciones para el tratamiento de la tuberculosis en adultos y niños; éstas pueden encontrarse en <http://www.thoracic.org/statements>. En el recuadro 19-5 se

Recuadro 19-5 Recomendaciones para la prevención y el tratamiento de la tuberculosis

I. Tratamiento preventivo de los individuos con una conversión reciente de la prueba cutánea.

A. Los criterios para la interpretación de una prueba cutánea positiva son:

1. Para los adultos y niños con infección por HIV, contactos íntimos de casos infecciosos y aquellos con lesiones fibróticas en las radiografías de tórax, se considera positiva una reacción de 5 mm o más grande.
2. Para otros adultos y niños en riesgo, se considera positiva una reacción de 10 mm o más grande.
3. Para los individuos con un factor de riesgo definido para la infección, se considera positiva una reacción de 15 mm o más grande. En general no se debe realizar una prueba cutánea en los individuos que no corren riesgo de infección.

B. En los individuos con una prueba cutánea positiva y cualquiera de los siguientes factores de riesgo, administrar isoniazida durante 6-12 meses para disminuir el riesgo de tuberculosis futura:

1. Aquellos con infección por HIV (se recomienda un régimen de 12 meses)
2. Aquellos que corren un riesgo de una infección por HIV con un estado HIV desconocido
3. Contactos íntimos de individuos con esputo positivo con tuberculosis infecciosa de diagnóstico reciente
4. Individuos que tienen cualquiera de los trastornos siguientes que se sabe que aumentan el riesgo de tuberculosis:
 - a. Diabetes mellitus
 - b. Tratamiento adrenocorticoesteroide e inmunosupresor
 - c. Adictos a drogas intravenosas
 - d. Neoplasias hematológicas y reticuloendoteliales
 - e. Enfermedad renal en estadio terminal
 - f. Pérdida rápida de peso o desnutrición
5. En ausencia de los factores de riesgo anteriores, los individuos menores de 35 años con una prueba cutánea positiva que pertenecen a uno o más de los siguientes grupos de alta incidencia deben recibir 6 meses de tratamiento profiláctico con isoniazida:
 - a. Nacidos en el extranjero en un país con alta prevalencia
 - b. Individuos de bajos ingresos y con escasos servicios médicos provenientes de poblaciones de alta prevalencia: individuos de descendencia africana, hispanos y americanos nativos.
 - c. Residentes en instituciones de cuidados prolongados
6. En los individuos mayores de 35 años se deben controlar las concentraciones de las enzimas hepáticas antes de comenzar el tratamiento y mensualmente en adelante durante el curso del tratamiento.
7. Los individuos de los cuales se presume que están infectados por microorganismos resistentes a la isoniazida deben ser tratados con rifampicina.

II. Tratamiento de los individuos con tuberculosis conocida por cepas sensibles a la isoniazida

- A. Un régimen de 6 meses, comenzando con isoniazida, rifampicina y pirazinamida durante los 2 primeros meses, seguidos de isoniazida y rifampicina durante los 4 meses siguientes.
- B. Se debe incluir etambutol en el régimen inicial hasta contar con los resultados de las pruebas de sensibilidad a los fármacos.
- C. El régimen recomendado se aplica tanto a los individuos infectados por HIV como a los no infectados. El tratamiento prolongado más allá del período recomendado puede ser necesario en los individuos infectados por HIV, según el estado clínico y bacteriológico.
- D. Como alternativa, es aceptable un régimen de 9 meses de isoniazida y rifampicina para los individuos que no pueden o no deben recibir pirazinamida.
- E. La tuberculosis multirresistente plantea problemas terapéuticos difíciles. El tratamiento debe ser individualizado sobre la base de los estudios de sensibilidad in vitro.
- F. La tuberculosis extrapulmonar debe ser manejada según los principios y con los regímenes farmacológicos señalados para la tuberculosis pulmonar.
- G. Un régimen de 4 meses de isoniazida y rifampicina es una terapia aceptable para los adultos que tienen una tuberculosis activa, pero que tienen frotis y cultivos negativos, si existen pocas posibilidades de resistencia a los fármacos.

III. El cumplimiento del tratamiento farmacológico es obligatorio: cualquier régimen es irrelevante si el paciente no recibe los fármacos. Deben considerarse las siguientes técnicas:

- A. Interrogar de rutina al paciente acerca del cumplimiento del tratamiento.
- B. Se pueden utilizar recuentos de píldoras y pruebas de orina periódicas para controlar la ingestión de fármacos.
- C. Rastrear con cuidado a los individuos que no retornan a las visitas de seguimiento.
- D. Establecer las horas de las visitas clínicas para cubrir las necesidades del paciente.
- E. Proporcionar un tratamiento observado en el centro clínico, hogar, lugar de trabajo u otra localización.
- F. Ofrecer incentivos como alimentos, viajes en automóvil, servicios de niñera o pequeños regalos.

resumen las recomendaciones para el tratamiento de la tuberculosis.

Resumen

“La erradicación de la tuberculosis requiere una red organizada y dinámica de servicios primarios y de derivación sustentada en la cooperación entre médicos y funcionarios de salud pública, entre las instituciones de asistencia sanitaria y los programas de alcance comunitario, y entre los sectores privado y público de atención médica”.⁷

REFERENCIAS

1. Abed Y, Davin-Regli A, Bollet C, De Micco P. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1418-1420.
2. Agins BD, Berman DS, Spichecker D, et al. Effect of combined therapy with ansamycin, clofazimine, ethambutol, and isoniazid for *Mycobacterium avium* infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1989;159:784-787.
3. Agy MB, Wallis CK, Plorde JJ, et al. Evaluation of four mycobacterial blood culture media: BACTEC 13A, Isolator/BACTEC 12B, Isolator/Middlebrook agar and biphasic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:303-308.
4. Ahmad S, Mokaddac E, et al. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:245-252.
5. Ahrens P, Giese SB, Kauasen J, Inglis NF. Two markers IS901-IS902 and p40, identified by PCR and by using monoclonal antibodies in *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1049-1053.
6. Albers WM, Chandler KW, Solomon DA, Goldman AL. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium malmoense*. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1375-1378.
7. Control of tuberculosis in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1623-1633.
8. Archibald LK, den Dulk MO, et al. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* blood-stream infection in febrile hospitalized adults in Dar es Salaam, Tanzania. *Clin Infect Dis* 1998;26:290-296.
9. Ardito F, Posteraro B, et al. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4440-4444.
10. Aronson JD. Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *J Infect Dis* 1926;39:315-320.
11. Aubrey M, Fam AG. A case of clinically unsuspected *Mycobacterium marinum* infection. *Arthritis Rheum* 1987;30:1317-1318.
12. Ausina V, Barrio J, Luyin M, et al. *Mycobacterium xenopi* infections in AIDS. *Ann Intern Med* 1988;109:927-928.
13. Avanis-Ayhanjani E, Jones K, Hollzman A, et al. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996;34:98-102.
14. Bamberg DM, Driks M, Gupta MR, et al. *Mycobacterium kansasii* among patients infected with human immunodeficiency virus in Kansas City. *Clin Infect Dis* 1994;18:395-400.
15. Banks J, Jenkins PA, Smith AP. Pulmonary infection with *Mycobacterium malmoense*—problems with treatment and diagnosis—a review of treatment and response. *Tubercle* 1985;66:197-203.
16. Barrell A, Mayee JG, et al. An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. *J Med Microbiol* 2002;51:895-898.
17. Beckman EN, Pankey GA, McFarland GB. The histopathology of *Mycobacterium marinum* synovitis. *Am J Clin Pathol* 1985;83:457-462.
18. Berner P, Bodmer T, et al. Multicenter evaluation of the MB/BACT system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004;42:1030-1034.
19. Berner P, Palicova F, et al. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:150-154.
20. Berlin GG, Zakowsky P, Bruckner DA, Johnson BL Jr. New biphasic culture system for isolation of mycobacteria from blood cultures of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1984;20:572-574.
21. Berman SM, Kim RC, Haghighat D, et al. *Mycobacterium genavense* infection presenting as a solitary brain mass in a patient with AIDS: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;19:1152-1154.
22. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:1760-1764.
23. Blacklock Z. *Mycobacterium asiaticum* a potential pulmonary pathogen for humans: a clinical and bacteriological review of 5 cases. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:241-244.
24. Bioch AB, Rieder HL, Kelly GD, Cauthen GM, Hayden CH, Snider DE Jr. The epidemiology of tuberculosis in the United States: implications for diagnosis and treatment. *Clinics Chest Med* 1989;10:297-313.
25. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science* 1992;257:1055-1064.
26. Ho, M-J. Sociocultural aspects of tuberculosis: a literature review and a case study of immigrant tuberculosis. *Soc Sci Med* 2004;59:753-762.
27. Bodmer T, Gunner A, Schopfer K, Matter L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the GenProbe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1994;32:1483-1487.
28. Boettger EC, Teske A, Kirschner P, et al. Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in patients with AIDS. *Lancet* 1992;340:76-80.
29. Bouza E, Diaz-Lopez M, Moreno S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1993;153:496-500.
30. Boye K, Hogdail E, et al. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers. *Microbiol Res* 1999;154:23-26.
31. Broadway DC, Kerr-Muir M, Eykyn SJ, Pambakian H. *Mycobacterium chelonae* keratitis: a case report and review of previously reported cases. *Eye* 1994;8:134-142.
32. Brooics RW, Parker BC, Gruff H, Falkingham JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers of eastern United States soils and correlation with soil characteristics. *Am Rev Respir Dis* 1983;130:630-633.
33. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Clarithromycin resistance to *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* 2001;39:2745-2746.
34. Burns DN, Wallace RJ, Schultz ME, et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1153-1159.
35. Butler WR, O'Conner SP, Yakus MA, Gross WM. Crossreactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. *J Clin Microbiol* 1994;32:536-538.
36. Cag G. Direct identification of *Mycobacterium* species in BACTEC 7H12B medium by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1994;32:521-524.
37. Cator B, Juhlin I, Henriques B. Septic cutaneous lesion caused by *Mycobacterium malmoense* in a patient with hairy cell leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:145-148.
38. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, et al. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 1991;5:73-80.
39. Cave MD, Eisenach KD, Templeton G. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:262-266.
40. Cavusoglu C, Hilmioglu S, et al. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4435-4438.
41. Centers for Disease Control and Prevention. A strategic plan for the elimination of tuberculosis in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989;38:1-25.
- 41a. Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 3 Ed. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service. CDC/NIH, 1993; DHHS pub no. (CDC) 93-8395.
42. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis among foreign-born persons who had recently arrived in the United States—Hawaii, 1992-1993, and Los Angeles County. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:703-707.
43. Chemaly RF, Tomford JW, et al. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using the AccuProbe on an excised valve. *J Clin Microbiol* 2001;39:2640-2641.
44. Chin DP, Hopewell PC, Yajko DM, et al. *Mycobacterium avium* complex in the respiratory or gastrointestinal tract and the risk of *M. avium* complex bacteremia in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1994;169:289-295.
45. Chiodini R. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:90-117.
46. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkai RS, et al. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 1984;30:966-971.
47. Choi CW, Cha DR, Kwon YJ, et al. *Mycobacterium fortuitum* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Korean J Intern Med* 1993;8:25-27.
48. Chow SP, Ip FK, Lau JHK, et al. *Mycobacterium marinum* infection of the hand and wrists. *J Bone Joint Surg Am* 1987;69:1161-1168.
49. Claydon EJ, Coker RJ, Harris JR. *Mycobacterium malmoense* infection in HIV positive patients. *J Infect Dis* 1991;23:191-194.
- 49a. Clinical Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardiae*, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard M24-A. Vol. 23. Wayne, PA: CLSI, 2003.
50. Cloud JL, Conville PS, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004;42:578-584.
51. Cocito C, Gilot P, Coene M, et al. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:328-345.
52. Cohn ML, et al. The 7H11 medium for the culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1976;98:295-296.
53. Collao J, Diaz F, Rodriguez J, Ayarza R. Persistent lung infection due to *Mycobacterium szulgai*. *Tubercle Lung Dis* 1993;74:412-413.
54. Conlon CP, Brandon HM, Luo NP, et al. Fecal mycobacteria and their relationship to HIV-related enteritis in Lusaka, Zambia. *AIDS* 1989;3:539-541.

55. Contreras MA, Cheung OT, Sanders DE, Goldstein RS. Pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:149-152.
56. Centers for Disease Control and Prevention Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. Screening for tuberculosis and tuberculosis infection in high-risk populations. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44(RR-11).
57. Conville PS, Keiser JF. Inter-bottle: transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;460:401-405.
58. Cooper JF, Lichtenstein MJ, Graham BS, Schaffner W. *Mycobacterium chelonae*: a cause of nodular skin lesions with a proclivity for renal transplant recipients. *Am J Med* 1989;86:173-177.
59. Corbett E, Watt C, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009-1021.
60. Cowling P, Glover S, Reeve DS. *Mycobacterium malmoense* type II bacteremia contributing to death in a patient with AIDS. *Int J STD AIDS* 1992;3:445-446.
61. Coyle MB, Carlson L, Wallis C, et al. Laboratory aspects of *Mycobacterium genavense*, a proposed species isolated from AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1992;30:3206-3212.
62. Crwford J. T. New technologies in the diagnosis of tuberculosis. *Semin Respir Infect* 1994;9:62-70.
63. Crowle AJ, Tsang AY, Vatter AE, May MH. Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J Clin Microbiol* 1986;24:812-821.
64. Crump JA, Tanner DC, et al. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/FLY-TIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41:1987-1990.
65. Daley CL, Griffith DE. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. *J Clin Chest Med* 2002;23:623-632, vii.
66. D'Amato JJ, Collins MT, Rothlauf MV, et al. Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. *J Clin Microbiol* 1983;17:1066-1073.
67. D'Amato RF, Isenberg HD, Hochstein L, et al. Evaluation of the Roche Septi-Check AFB system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29:2906-2908.
68. D'Amato RF, Wailman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995;33:1832-1834.
69. Dawson DJ, Blacklock ZM, Ashdown LR, Boettger EC. *Mycobacterium asiaticum* as the probable causative agent in a case of olecranon bursitis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1042-1043.
70. De Oliveira MM, Da Silva Rocha A, et al. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phatic hybridization assay. *J Microbiol Methods* 2003;53:335-342.
71. Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, et al. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1995;126(5 Part 1):703-709.
72. Delaporte E, Alfandari S, Pietle P. *Mycobacterium ulcerans* associated with infection due to the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1994;18:839.
73. Della-Latta P, Whittier S. Comprehensive evaluation of performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Am J Clin Pathol* 1998;110:301-310.
74. Dillon J, Misslon C, Morris I. *Mycobacterium kansasii* infection of the wrists and hand. *Br J Rheumatol* 1990;29:150-153.
75. Dion JMS, Cithbert, EH. Isolation of tubercle bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic acid medium. *Am Rev Respir Dis* 1967;96:119-122.
76. Dobner P, Feldmann K, et al. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J Clin Microbiol* 1996;34:866-869.
77. Doern GV, Westerling JA. Optimum recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens of human immunodeficiency virus-positive patients by using small volumes of isolator concentrate inoculated into BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 1994;32:2576-2577.
78. Doern GV, Westerling JA. Optimum recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens of human immunodeficiency virus-positive patients by using small volumes of isolator concentrate inoculated into BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 1995;33:784-785.
79. Drabick JJ, Duffy PE, Samlaska CP, Scherbenke JM. Disseminated *Mycobacterium chelonae* subspecies *chelonae* infection with cutaneous and osseous manifestations. *Arch Dermatol* 1990;126:1064-1067.
80. Draie TA, Hindler JA, Berlin OGW, Bruckner DA. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1987;25:1442-1445.
81. Drancourt M, Raoult D. rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 2002;40:1333-8.
82. Drancourt M, Roux V, et al. rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia* and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol* 2004;42:497-504.
83. Driver CR, Frieden TR, Bloch AB, et al. Drug resistance among tuberculosis patients, New York City, 1991 and 1992. *Public Health Rep* 1994;109:632-636.
84. Dunmire RB III, Breyer JA. Nontuberculous mycobacterial peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis: case report and review of diagnostic and therapeutic strategies. *Am J Kidney Dis* 1991;18:126-130.
85. Dun AK, Snead WW. Present chemotherapy for tuberculosis. *J Infect Dis* 1982;146:698-705.
86. Edzkorn ET, Sigfredo A, McAllister CK, et al. Medical therapy of *Mycobacterium avium*-intracellular pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:442-445.
87. Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 1988;26:1349-1352.
88. Enarson DA, Fanning EA, Allen EA. Case-finding in the elimination phase of tuberculosis: high-risk groups in epidemiology and in clinical practice. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1990;65:73-75.
89. Fadda G, F. Ardito, et al. Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay in comparison with culture methods in selected Italian patient. *New Microbiol* 1998;21:97-103.
90. Fanning A, Edwards S. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *Lancet* 1991;338:1253-1255.
91. Felmlee TA, Liu Q, Whelen AC, et al. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1995;33:1617-1623.
92. Fidler HM, Thutrell W, Johnson NM, et al. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:506-510.
93. Fisher A. Swimming pool granulomas due to *Mycobacterium marinum*: an occupational hazard of lifeguards. *Cutis* 1988;41:397-398.
94. Forbes BA, Hicks KE. Ability of PCR assay to identify *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B vials. *J Clin Microbiol* 1994;32:1725-1728.
95. Fouad AF, Barry J, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:3223-3231.
96. France AJ, McLeod DT, Calder MA, Seaton A. *Mycobacterium malmoense* infections in Scotland: an increasing problem. *Thorax* 1987;42:593-595.
97. Fraser VJ, Jones M, Murray PR, et al. Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:853-85.
98. Frieden TR, Sterline R, Pablos-Mendez A, et al. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993;328:521-526.
99. Friedman CR, S. M., Johnson WD Jr, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1383-1384.
100. Fuller DD, Davis TE Jr, et al. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi, and bacteria from blood. *J Clin Microbiol* 2001;39:2933-6.
101. Cauduchon V, Chalabreysse L, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003;41:763-766.
102. Giladi M, Lee BE, Berlin OG, Panosian CB. Peritonitis caused by *Mycobacterium kansasii* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1992;19:497-499.
103. Gill MJ, Fanning EA, Chomyc S. Childhood lymphadenitis in a harsh northern climate, due to atypical mycobacteria. *Scand J Infect Dis* 1987;19:77-83.
104. Gill VJ, Park CH, Stoeck F, et al. Use of lysis-centrifugation (Isolator) and radiometric BACTEC blood culture systems for the detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1985;22:543-546.
105. Gil-Seas A, Torroba L, et al. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H 11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:224-8.
106. Gitnick G, Collins J, Beaman B, et al. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1989;34:925-932.
107. Glickman SE, Kilburn JO, Butler VR, Ramos LS. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a mycobacterium library. *J Clin Microbiol* 1994;32:740-745.
108. Goldenberger D, Kunzli A, et al. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997;35:2733-2739.
109. Good R. Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Annu Rev Microbiol* 1985;39:347-369.
110. Good RC, Snider DE. Isolation of non-tuberculous mycobacteria in the United States. *J Infect Dis* 1980;146:829-833.
111. Gosset J. Bacteriologic basis of short course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980;1:231.
112. Gotto M, Oka S, Okuzumi K, et al. evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-intracellular complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991;29:2473-2476.
113. Goubay A, Branger B, Oules R, Ramuz M. Two cases of *Mycobacterium haemophilum* infections in a renal dialysis unit. *J Med Microbiol* 1988;25:299-300.
114. Greisen K, Loeffelholz M, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-51.
115. Gross W, Hawkins JE, Murphy B. *Mycobacterium xenopi* in clinical specimens. I. Water as a source of contamination. *Am Rev Respir Dis* 1976;113:78 [abstract].
116. Gross WM, Hawkins J. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1985;21:565-568.
117. Gruft H. Isolation of acid-fast bacilli from contaminated specimens. *Health Lab Sci* 1971;8:79-82.
118. Guerrant GO, Lambert MA, Moss CW 1981. Gas-chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1981;13:899-907.
119. Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol* 1995;133:304-307.

120. Gupta I, Kocher J, Miller AJ, et al. *Mycobacterium haemophilum* osteomyelitis in an AIDS patient. *NJ Med* 1992;89:201-202.
121. Haase G, Skopnik H, Batge S, Boettger EC. Cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium celatum*. *Lancet* 1994;344:1021.
122. Hall L, Doerr KA, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2003;41:1447-1453.
123. Han XY, Pham AS, et al. Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. *Am J Clin Pathol* 2002;118:796-801.
124. Hanna BA, Walters SB, Kodosi SE, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from patient specimens with the mycobacteria growth indicator tube: a new rapid method. Presented at the American Society for Microbiology Annual meeting, Las Vegas, 1994.
125. Hanson PIV, Thomas JM, Collins JV. *Mycobacterium chelonae* and abscess formation in soft tissue. *Tubercle* 1987;68:297-294.
126. Hawkins CC, Gold JWM, Whimby E, et al. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986;105:184-188.
127. Hawkins J. Scotochromogenic mycobacteria which appear intermediate between *Mycobacterium avium*-intracellulare and *M. scrofulaceum*. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:963-964.
128. Hawkins J. Rapid mycobacterial susceptibility tests. *Clin Microbiol Newlett* 1986; 8:101-104.
129. Hawkins JE, Gross JM. Program Abs 23rd Intersci Conf Microbial Newsletter. Chemother. 1983.
130. Hawkins JE, Wallace RJ Jr, Brown BA. Antibacterial susceptibility tests: mycobacteria. In: Balows A, ed. *Manual of Clinical Microbiology* 5th ed. Chap 108, Washington DC: American Society for Microbiology, 1991.
131. Hayman, J. Postulated epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. In *J Epidemiol* 1991;20:1093-1098.
132. Heap B. *Mycobacterium simiae* as a cause of intra-abdominal disease: a case report. *Tubercle* 1989;70:217-221.
133. Heifets L. Qualitative and quantitative drug susceptibility tests in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1217-1227.
134. Heifets L. Gen-Probe test should not be considered final in *Mycobacterium tuberculosis* identification. *J Clin Microbiol* 1989;37:229.
135. Hermans PWM, Schutema ARJ, Van Soolsingen D, et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:1204-1213.
136. Hermon-Taylor J, Moss M, Tizard E, et al. Molecular histology of Crohn's disease mycobacteria. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1990;4:23-42.
137. Hirasuna J. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 1987;107:784.
138. Hoffner SE, Henriques B, Petrini B, Kallenius G. *Mycobacterium mageritense*: an easily missed pathogen. *J Clin Microbiol* 1991;29:2673-2674.
139. Hoffner SE, Kratz M, Olsson-Liljequist B, et al. In-vitro synergistic activity between ethambutol and fluorinated quinolones against *Mycobacterium avium* complex. *J Antimicrob Chemother* 1989;24:317-324.
140. Horsburgh CR Jr, Chin DP, Yajko DM, et al. Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1994;170:362-367.
141. Hoyt RE, Bryant JE, Glessner SF, et al. *Mycobacterium marinum* infections in a Chesapeake Bay community. *VA Med* 1989;116:467-470.
142. Huang TS, Chen CS, et al. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for detection of mycobacteria in clinical specimens. *Ann Clin Lab Sci* 2001;31:279-83.
143. Hurst LC, Amadio PC, Badalamente MA, et al. *Mycobacterium marinum* infections of the hand. *J Hand Surg* 1987;12:428-435.
144. Iademarco MF, Castro KG. Epidemiology of tuberculosis. *Semin Resp Infect* 2003;18:225-240.
145. Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR-Microwell plate hybridization memod (Amplicor *Mycobacterium*) for direct detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996;34:130-133.
146. Idemov Y, Cherubin CD. Retroperitoneal abscess caused by *Mycobacterium chelonae* and treatment. *Ann Pharmacother* 1993;27:178-179.
147. Igo JD, Murphy DP. *Mycobacterium ulcerans* infection in Papua New Guinea: correlation of clinical, histological and microbiologic features. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38:391-392.
148. Imaeda T, Broslawski G, Imaeda S. Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:151-156.
149. Interlied CB, Klemper CA, Bermudez LEM. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:266-310.
150. Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, et al. Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Check AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991;129:1719-1722.
151. Jacob CN, Henein SS, Heurich AE, Kamholz S. Nontuberculous mycobacterial infection of the central nervous system in patients with AIDS. *South Med J* 1986; 638-640.
152. Jacobson MA, Hopewell PC, Yajko DM, et al. Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *J Infect Dis* 1991;164:994-998.
153. Jacobson MA, I. Isenberg, WM. *kansasii* diffuse pulmonary infection In a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* 1989;91:236-238.
154. Jacoby HM, Jivas TM, Kaminski DA, et al. *Mycobacterium xenopi* infection masquerading as pulmonary tuberculosis in two patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995;20:1299-1401.
155. Jarikre L. Case report: disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in an immunocompromised host. *Am J Med Sci* 1991;302:382-384.
156. Jarikre L. *Mycobacterium gordonae* genitourinary disease. *Genitourin Med* 1992;68: 445-446.
157. Jenkins PA, Tsukamura M. Infections with *Mycobacterium mageritense* in England and Wales. *Tubercle* 1979;60:71-76.
158. Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1993;168:1219-1224.
159. Johnsen IS, Lundgren B, et al. Direct detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:4454-4456.
160. Johansen IS, Lundgren BH, et al. Rapid differentiation between clinically relevant mycobacteria in microscopy positive clinical specimens and mycobacterial isolates by line probe assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:297-302.
161. Jonas V, Alden MJ, Curry JJ, et al. Deletion and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993;31:2410-2416.
162. Jones MW, Wahid IA. *Mycobacterium marinum* infections of the hand and wrist: results of conservative treatment in twenty-four cases. *J Bone Joint Surg* 1988; 70:631-632.
163. Joseph SW, Vaichulis EMK, Houk VN. Lack of auramine rhodamine fluorescence of Runyon group IV mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1967;95:114-115.
164. Joshi KC Jr, Dunbar DF, Barth SS, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear-positive sputum specimens on BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *J Clin Microbiol* 1995;33: 1270-1277.
165. Kaminski DA, Hardy DJ. Selective utilization of DNA probes for identification of *Mycobacterium* species on the basis of cord formation in primary BACTEC 12B cultures. *J Clin Microbiol* 1995;33:1548-1550.
166. Kestle DG, Kubica GP. Sputum collection for cultivation of mycobacteria: an early morning specimen or the 24 to 72 hour pool? *Am J Clin Pathol* 1967;48:347-351.
167. Khamis A, Colson P, et al. Usefulness of rpoB gene sequencing for identification of *Mycobacterium* and *Bacillus* species, including a strategy for choosing discriminative partial sequences. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6740-6749.
168. Khooshabeh R, Grange JM, Yates MD, et al. A case report of *Mycobacterium chelonae* keratitis and a review of mycobacterial infections of the eye and orbit. *Tubercle Lung Dis* 1994;75:377-382.
169. Kiehn TE, Edwards FF. Rapid identification using a specific DNA probe of *Mycobacterium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1987;25:1551-1552.
170. Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, et al. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests and morphological and seroagglutination characteristics. *J Clin Microbiol* 1985;21:168-173.
171. Kiehn TE, While M, Pursell KG, et al. A cluster of four cases of *Mycobacterium haemophilum* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:114-118.
172. Kirby JM, Gilligan PH, Yankaskas JR, et al. Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 1992;102:70-75.
173. Kim BJ, Lee KH, et al. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 2001;39:2102-2109.
174. Kim BJ, Lee SH, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 1999; 37:1714-1720.
175. Kim TC, Arora NS, Aldrich TK, Rochester DE. Atypical mycobacterial infections: a clinical study of 92 patients. *South Med J* 1981;74:1304-1308.
176. Kinsella JP, Culver K, Jeffery RB, et al. Otomastoiditis caused by *Mycobacterium avium*-intracellulare. *Pediatr Infect Dis J* 1986;6:289-291.
177. Kirihaara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985;22:841-845.
178. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993;31:1189-1222.
179. Kirschner RA Jr, Parker BC, Falkinham JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environment variables. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:271-275.
180. Kline SE, Hedemark LL, Davies SF. Outbreak of tuberculosis among regular patrons of a neighborhood bar. *N Engl J Med* 1995;333:222-227.
181. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control Strategy of the World Health Organisation. *Tubercle Lung Dis* 1991;72:1-6.
182. Kolmos HJ, Brahm M, Bruun B. Peritonitis with *Mycobacterium fortuitum* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis* 1992;24:801-803.
183. Kramme S, Breeel G, Panning M, et al. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004;193:189-193.

184. Krasnow I, Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis laboratory. *Appl Microbiol* 1969;28:915-917.
185. Kraus G, Cleary T, et al. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Probes* 2001;15:375-383.
186. Kremer LB, Rhaem FS, House JH. *Mycobacterium terrae* tenosynovitis. *Arthritis Rheum* 1988;32:132-134.
187. Krishner KK, Kallay MC, Nolte FS. Primary pulmonary infection caused by *Mycobacterium terrae* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;11:171-175.
188. Kristjansson M, Bielech VM, Byeff PD. *Mycobacterium haemophilum* infection in immunocompromised patients: case report and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1991;13:906-910.
189. Kubica G. Differential identification of mycobacteria. VII. Key features for identification of clinically significant mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1987;107:9-21.
190. Kubica GP, et al. Laboratory services for mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1975;112:783-787.
191. Kuze F, Mitsouka W, Chiba W, et al. Chronic pulmonary infection caused by *M. terrae* complex: a resected case. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:561-565.
192. Kwok AY, Su SC, et al. Species identification and phylogenetic relationships based on panial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49(Pan 3):1181-1192.
193. Lai KK, Stottmeier KD, Sherman JH, McCabe WR. Mycobacterial cervical lymphadenopathy: relation of etiologic agents to age. *JAMA* 1984;251:1286-1288.
194. Lang S, Wathn RW, et al. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect* 2004;48:269-275.
195. Larsson L, Odham G, Westerdaal G, Olsson B. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by selected ion monitoring: improved analysis of tuberculoesterase in sputum using negative-ion mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 1987;25:893-896.
196. Laszlo AP, Siddiqui SH. Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitroacetylaminohydroxy-propionophenone. *J Clin Microbiol* 1984;19:694-698.
197. Lausseau S, Baltch AL, Smith RW, et al. Nosocomial *Mycobacterium fortuitum* colonization from a contaminated ice machine. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:891-894.
198. Lavy A, Yoshpe-Purer Y. Isolation of *Mycobacterium simiae* from clinical specimens in Israel. *Tubercle* 1982;63:279-285.
199. Lebrun L, Espinasse F, Poveda ID, et al. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992;30:2476-2478.
200. Leckie GW, Erickson DD, He Q, Facey IE, Lin BC, Cao J, Halaka FG. Method for reduction of inhibition in a *Mycobacterium tuberculosis*-specific ligase chain reaction DNA amplification assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:764-767.
201. Lee H, Bang HE, et al. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2003;41:2213-2218.
202. Leitritz L, Schubert S, et al. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3764-3767.
203. Levine B, Chaisson RE. *Mycobacterium kansasii*: a cause of treatable pulmonary disease associated with advanced human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991;114:861-868.
204. Levy-Frbault V, Pignon B, Bure A, et al. *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium avium*-intracellular mixed infection in acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1987;25:154-157.
205. Lindbrathen A, Gaustad P, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1997;35:3248-3253.
206. Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, Miliar MR. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2169-2174.
207. Lipsly BA, Gates JA, Tenover FC, et al. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Rev Infect Dis* 1984;6:214-222.
208. Loemer J, Hebbat H, et al. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:207-212.
209. London RD, Damsker B, Neiben EP, et al. *Mycobacterium gordonae*: an unusual peritoneal pathogen in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med* 1988;85:703-704.
210. Lowry PW, Jarvis WR, Oberle AD, et al. *Mycobacterium chelonae* causing otitis media in an ear nose and throat practice. *N Engl J Med* 1988;31:978-982.
211. MacDonell KB, Classroth J. *Mycobacterium avium* complex and other nontuberculous mycobacteria in patients with HIV infection. *Semin Resp Infect* 1989;4:123-132.
212. Macher AM, Kovacs JA, Gill V, et al. Bacteremia due to *Mycobacterium intracellulare* in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1983;99:782-785.
213. Males BM, West TE, Bantholomew WR. *Mycobacterium haemophilum* infection in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1987;25:186-190.
214. Maloney JM, Clark RG, Stephens DS, et al. Infections caused by *Mycobacterium szulgai* in humans. *Rev Infect Dis* 1987;9:1120-1126.
215. Marks J, Jenkins PA, Tsukamura M. *Mycobacterium szulgai*-a new pathogen. *Tubercle* 1972;53:210-214.
216. Martinez-Sanchez L, Ruiz-Serrano J, et al. Utility of the BACTEC Myco/F lytic medium for the detection of mycobacteria in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:223-226.
217. Maschek H, Gerogii A, Schmidt RE, et al. *Mycobacterium genavense*. Autopsy findings in three patients. *Am J Clin Pathol* 1994;101:95-99.
218. McBride JA, McBride MM, Wolf JE Jr, et al. Evaluation of commercial blood-containing media for cultivation of *Mycobacterium haemophilum*. *Am J Clin Pathol* 1992;98:282-286.
219. McCarter YS, Robinson A. Detection of acid-fast bacilli in concentrated primary specimen smears stained with rhodamine-auramine at room temperature and at 37 degrees C. *J Clin Microbiol* 1994;32:2487-2489.
220. McClatchy JK, et al. Isolation of mycobacteria from clinical specimens by use of selective 7H11 medium. *Am J Clin Pathol* 1976;65:412-415.
221. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1987;25:796-801.
222. McWhinney PH, Yates M, Prenti HG, et al. Infection caused by *Mycobacterium chelonae*: a diagnostic and therapeutic problem in the neutropenic patient. *Clin Infect Dis* 1992;14:1208-1212.
223. Mellmann A, Cloud JL, et al. Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and Genbank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* 2003;293:359-370.
224. Merlin TL, Tzamaloukas AH. *Mycobacterium chelonae* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Clin Pathol* 1989;91:717-720.
225. Metchock B, Diem I. Algorithm for use of nucleic acid probes for identifying *Mycobacterium tuberculosis* from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 1995;33:1934-1937.
226. Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigert WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:1066-1069.
227. Middleton AM, Chadwick MV, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in mixed broth cultures using DNA probes. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:668-671.
228. Miller N, Cleary T, et al. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4143-4147.
229. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994;32:393-397.
230. Miller N, Infante S, et al. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 2000;38:1915-1919.
231. Millner R, Stottmeier KD, Kubica GP. Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in Middlebrook 7H10 medium. *Am Rev Respir Dis* 1969;99:603-607.
232. Mitchison DA, et al. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *J Med Microbiol* 1972;5:165-175.
233. Mizuguchi Y, Ogawa M, Odou T. Morphological changes induced by B-lactam antibiotics in *Mycobacterium avium*-intracellular complex. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:541-547.
234. Modilevsky T, Sattler FR, Barnes PF. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1989;149:2201-2205.
235. Moore DF, Curry JJ. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1998;36:1028-1031.
236. Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:384-388.
237. Moulds MT, Harper JM, Thatcher GN. Infection by *Mycobacterium haemophilum*, a metabolically fastidious acid-fast bacillus. *Tubercle* 1983;64:29-36.
238. Murdoch ME, Leigh IM. Sporotrichoid spread of cutaneous *M. chelonae* infection. *Clin Exp Dermatol* 1989;14:309-312.
239. Murray P. Mycobacterial cross-contamination with the modified BACTEC 460 TB system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991;14:33-35.
240. Musial CE, Tice LS, Stockman L, Robens GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1988;26:2120-2123.
241. Nardell EA, Keegan J, Cheney SA, Edind SC. Airborne infection: theoretical limits of protection achievable by building ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:302-306.
242. Newton JA, Weiss PH. Aspiration pneumonia caused by *Mycobacterium smegmatis*. *Mayo Clin-Proc* 1994;69:296.
243. Newton JA, Weiss PH, Bowler WA, Oldfield EC III. Soft-tissue infection due to *Mycobacterium smegmatis*: report of two cases. *Clin Infect Dis* 1993;16:531-533.
244. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al. Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellular complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* 1992;165:1082-1085.
245. Nolan C. Failure of therapy for tuberculosis in human immunodeficiency virus infection. *Am J Med Sci* 1992;304:168-173.
246. Nolte FS, Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 1995:Chapter 31.
247. Nolte FS, Metchock B, McGowan JE Jr, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1993;31:1777-1782.

248. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjuene G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994;32:277-284.
249. World Health Organization Global Tuberculosis Control. WHO report Geneva: WHO, 2003.
250. O'Sullivan CE, Miller DR, et al. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and nonrespiratory specimen in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* 2002;40:1723-1727.
251. Pai S, Esen N, et al. Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65). *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:859-864.
252. Patel JB, Leonard DG, et al. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 2000;38:246-251.
253. Panerson KV, McDonald CL, Miller BF, Chapin KC. Use of UV ParaLens adapter for detection of acid-fast organism. *J Clin Microbiol* 1995;33:239-241.
254. Pauls RJ, Turenne CY, et al. A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting. *Am J Clin Pathol* 2003;120:560-566.
255. Percheron M, Opravil M, Wald A, et al. Clinical and epidemiologic features of infection with *Mycobacterium* genavense. Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med* 1995;155:400-404.
256. Peters EJ, Monce R. Miliary pulmonary infection caused by *Mycobacterium terrae* in an autologous bone marrow transplant patient. *Chest* 1991;100:1449-1450.
257. Peters M, Schurmann D, Mayr AC, et al. Immunosuppression and mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: results from patients with and without HIV infection. *Epidemiol Infect* 1989;103:293-300.
258. Peterson EM, Lu R, Floyd C, et al. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1989;27:1543-1547.
259. Petran EL, Vera HD. Media for selective isolation of mycobacteria. *Health Lab Sci* 1971;8:2245.
260. Petrini, B. 16S rDNA sequencing in the species identification of non-tuberculous mycobacteria. *Scand J Infect Dis* 2003;35:519-520.
261. Petrini B, Svartengren G, Hoffner SE, et al. Tenosynovitis of the hand caused by *Mycobacterium terrae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:722-724.
262. Pfaller M. Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1994;101:329-337.
263. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 1994;32:918-923.
264. Piersimoni C, Felici L, Penati V, Lacchini C. *Mycobacterium malmoense* in Italy. *Tubercle Lung Dis* 1995;76:171-172.
265. Pinheiro MD, Ribeiro MM. Comparison of the Bactec 460TB system and the Bactec MGIT 960 system in recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:171-173.
266. Plakaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al. Multiple PCR assay specific for multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1542-1546.
267. Pollock HM, Wieman EJ. Smear results in the diagnosis of mycobacteriosis using blue light fluorescence microscopy. *J Clin Microbiol* 1977;5:329-331.
268. Prantera C, Bothamley G, Levenstein S, et al. Crohn's disease and mycobacteria: two cases of Crohn's disease with high anti-mycobacterial antibody levels cured by dapsone therapy. *Biomed Pharmacother* 1989;43:295-299.
269. Prissick FH, Mason AM. Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic mycobacteria. *Can Med Assoc J* 1956;75:798-803.
270. Prosser A. Spinal infection with *Mycobacterium xenopi*. *Tubercle* 1986;67:229-232.
271. Raad II, Vartivanan S, Khan A, Brdey GP. Catheter-related infections caused by the *Mycobacterium fortuitum* complex: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:1120-1125.
272. Radford A. *Mycobacterium ulceran* in Australia. *Aust NZ J Med* 1975;5:162-169.
273. Radhika S, Gupta SK, Chakraharti A, et al. Role of culture for mycobacteria in fine-needle aspiration diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Diagn Cytopathol* 1989;5:260-262.
274. Rahman MA, Phongsathorn V, Hughes T, Bielawska C. Spinal infection by *Mycobacterium xenopi* in a non-immunosuppressed patient. *Tubercle Lung Dis* 1992;73:392-395.
275. Rantakokko-Jalava K, Nikkan S, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32-39.
276. Rastogi N, Frehel C, Ryter A, et al. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agent? *Antimicrob Agents Chemother* 1980;20:666-677.
277. Rdnam SM, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1986;23:582-585.
278. Ratnam SM, Stead FA, Howes M. Simplified acetylcytosteine-alkali digestion-decontamination procedure for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1987;25:1428-1432.
279. Narain JP, Rivigione MC, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment. *Bull WHO* 1992;70:515-526.
280. Reiner E. Identification of bacterial strain by pyrolysis-gas-liquid chromatography. *Nature* 1965;206:1272-1274.
281. Reiser BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbe to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiol* 1994;32:2995-2998.
282. Reiser BS, Gatson AM, et al. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth culture. *J Clin Microbiol* 1994;32:2995-2998.
283. Richardson P, Crawford GJ, Smith DW, Xanthos CP. *Mycobacterium chelonae* keratitis. *Aust NZ J Ophthalmol* 1989;17:195-196.
284. Rickman TW, Moyer NP. Increased sensitivity of acid fast smears. *J Clin Microbiol* 1980;11:618-620.
285. Rieder H, Cauthen GM, Kelly GD, et al. Tuberculosis in the United States. *JAMA* 1989;262:385-389.
286. Ringue H, Akoua-Koffi C, et al. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999;37:852-857.
287. Roberts GD, Goodman NL, Heifetz L, et al. Evaluation of the radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:689-696.
288. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. In: Balows A, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991:Chapter 34.
289. Rodriguez-Barradas MC, Clarridge J, Darouiche R. Disseminated *Mycobacterium fortuitum* disease in an AIDS patient. *Am J Med* 1992;93:473-474.
290. Rogers PL, Walker RE, Lane HC, et al. Disseminated *Mycobacterium haemophilum* infection in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988;84:640-642.
291. Rohner P, Ninet B, et al. Evaluation of the Bactec 960 automated nonradiometric system for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:715-717.
292. Rois MP, Palenque E, Guerrero C, Garcia MJ. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1289-1291.
293. Rondini S, Mensah-Quainoo E, et al. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:4231-4237.
294. Rose HD, Dorff GJ, Lauwaser M, et al. Pulmonary and disseminated *Mycobacterium simiae* infection in humans. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:1110-1113.
295. Ruiz P, Zerolo FJ, et al. Comparison of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. *J Clin Microbiol* 2000;38:4663-4664.
296. Runyon E. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Pathol* 1970;54:578-586.
297. Saito H, T. H. Susceptibilities of transparent opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob Agent Chemother* 1988;32:400-402.
298. Sallinger M. Role of the laboratory in evaluating patients with mycobacterial disease. *Clin Microbiol Newslett* 1995;17:108-111.
299. Sallinger M, Hale YM, et al. Diagnostic tools in tuberculosis. Present and future. *Respiration* 1998;65:163-170.
300. Sallinger M, Morris AL. The role of the microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial disease. *Am J Clin Pathol* 1994;101(Suppl 1):S6-S13.
301. Sanders WE Jr, Horowitz EA. Other mycobacteria species. In: Mandell GL, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: Chapter 231.
302. Sanderson JD, Moss MT, Tiozard ML, Hermon-Taylor. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992;33:890-896.
303. Sanguinetti M, Ardito F, et al. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:816-819.
304. Scarparo C, Piccoli P, et al. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* 2001;39:3222-3227.
305. Schaefer WB, Davis CL, Cohn ML. Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am Rev Respir Dis* 1970;102:499-506.
306. Scherer R, Sable R, Sonnenberg M, et al. Disseminated infection with *Mycobacterium kansasii* in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986;105:710-712.
307. Schlossberg D, Aaron T. Aortitis caused by *Mycobacterium fortuitum*. *Arch Intern Med* 1991;151:1010-1011.
308. Schroder KH, Juhlén I. *Mycobacterium malmoense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1977;27:241-246.
309. Schuurman T, de Boer RF, et al. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004;42:734-740.
310. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989;320:545-550.
311. Sewell DL, Rashad AL, Rourke WJ, et al. Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1993;31:2689-2691.

312. Shafer RW, Sierra MF. *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, and other nontuberculous mycobacteria in an area of endemicity for AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:161-162.
313. Shah RR, Dye WE. The use of dithiothreitol to replace N-acetyl-L-cysteine for routine sputum digestion-decontamination for the culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1966;94:454.
314. Sharma M, Sethi S, et al. Rapid detection of mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by line probe assay. *Indian J Med Res* 2003;117:76-80.
315. Shrestha NK, Tuohy MJ, et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:5121-5126.
316. Silcox VA, Good RA, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J Clin Microbiol* 1981;14:686-691.
317. Simor WE, Salit IE, Vellend H. Role of *Mycobacterium xenopi* in human disease. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:435-438.
318. Singh M, B. A., Cave G, Boyle P. *Mycobacterium fortuitum* endocarditis in a patient with chronic renal failure on hemodialysis. *Pathology* 1992;24:197-200.
319. Slosarek M, Kubin M, Jaresova M. Water-borne household infections due to *Mycobacterium xenopi*. *Central Eur J Public Health* 1993;1:78-80.
320. Slutsky AM, Arbeit RD, Barber TW, et al. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:1773-1778.
321. Smithwick RW, et al. Use of cetylpyridium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1975;14:411-413.
322. Snider DE Jr, Cohn DL, Davidson PT, et al. Standard therapy for tuberculosis. *Chest* 1985;87(Suppl):S117-S124.
323. Sommers H. Special Mycobacterial Survey. Skokie, IL: College of American Pathologists, 1976.
324. Sommers HM, Good RC. *Mycobacterium*. In: Lennette EH, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985; Chapter 22.
325. Somoskovi A, Song Q, et al. Use of molecular methods to identify the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and other mycobacterial species and to detect rifampin resistance in MTBC isolates following growth detection with the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* 2003;41:2822-2826.
326. Sompolsky D, Lagziel A, Naveh D, Yankilevitz T. *Mycobacterium haemophilum* sp. nov., a new pathogen of humans. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:67-75.
327. Soriano F, Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Garcia JL, Vela M. Two possibly related cases of *Mycobacterium fortuitum* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:895-897.
328. Springer B, Stockman L, et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:296-303.
329. Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* 1990;172:116-124.
330. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents (M26P). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987.
331. Stead WW, Dutt D. Chemotherapy for tuberculosis today. *Am Rev Respir Dis* 1982;125(Suppl 3):94-101.
332. Steele LC, Wallace RJ. Ability of ciprofloxacin but not pefloxacin to differentiate all three biovariants of *Mycobacterium fortuitum* from *Mycobacterium chelonae*. *J Clin Microbiol* 1987;25:456-457.
333. Steingrube VA, Gibson IL, Brown BA, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33:149-153.
334. Stone BL, Cohn DL, Kane MS, et al. Utility of paired blood cultures and smears in diagnosis of disseminated *Mycobacterium avium* complex infections in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:842.
335. Stone R. Tuberculosis rebounds while funding lags. *Science* 1992;255:1064.
336. Stormer RS, Falkingham JO 3d. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented color: variants of *Mycobacterium avium*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2459-2465.
337. Strand CL, Epstein C, Verzosa S, et al. Evaluation of a new blood culture medium for mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1989;91:316-318.
338. Straus WL, Ostroff SM, Jemigan DB, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of *Mycobacterium haemophilum*, an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 1994;120:118-125.
339. Suffys PN, A. da Silva Rocha, et al. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4477-4482.
340. Sullivan EA, Kreiswirth BN, Palumbo L, Kapur V, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. *Lancet* 1995;345:1148-1150.
341. Talbot E, Moore M, et al. Tuberculosis among foreign-born persons in the United States, 1993-1998. *JAMA* 2000;284:2894-2900.
342. Taylor S. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium asiaticum*. *Tubercle* 1990;71:303-305.
343. Telak E. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *Med Clin North Am* 1997;81:345-360.
344. Tenholder MP, Moser RJ, Tellis CJ. Mycobacteria other than *M. tuberculosis*. Pulmonary involvement in patients with AIDS. *Arch Intern Med* 1988;148:953-955.
345. Thibien L, Lebel F, Martineau B. Two cases of *Mycobacterium haemophilum* infection in Canada. *J Clin Microbiol* 1990;28:621-623.
346. Tisdall PA, Roberts GE, Anhalt IP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. *J Clin Microbiol* 1979;10:506-514.
347. Tonner JA, Hammond MD. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium terrae* complex. *South Med J* 1989;82:1279-1282.
348. Torrea G, Levee G, Grimont P, et al. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol* 1995;33:1899-1904.
349. Tortoli E, Cichero P, et al. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999;37:3578-3582.
350. Tortoli E, Mariottini A, et al. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 2003;41:4418-4420.
351. Tortoli E, Nanetti A, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2001;39:1079-1084.
352. Tortoli E, Simonetti MT, et al. Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of *Mycobacterium kansasii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:264-267.
353. Tortoli E, Simonetti MT, Labardi C, et al. *Mycobacterium xenopi* isolation from clinical specimens in the Florence area: review of 46 cases. *Eur Epidemiol* 1991;7:677-678.
354. Tortoli E, Simonetti MT, Lacchini C, et al. Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1779-1782.
355. Troesch A, Nguyen H, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
356. Tuohy MJ, Hall G, Procop GW. The Rapid Identification of Routine Clinical Mycobacteria by Pyrosequencing™. 42nd ICAAC Meeting, San Diego, CA, 2002.
357. Uribe-Botero G, Prichard IG, Kaplowitz HI. Bone marrow in HIV infections: a comparison of fluorescent staining and cultures in the detection of mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1989;91:313-315.
358. Vadney FS, Hawkins JE. Evaluation of a simple method for growing *Mycobacterium haemophilum*. *J Clin Microbiol* 1985;22:884-885.
359. Valainis GT, Cardona LM, Greer DL. The spectrum of *Mycobacterium kansasii* disease associated with HIV-1 infected patient. *J AIDS* 1991;4:516-520.
360. Van Soelingen D, de Haas PE, Haagsma J, et al. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2425-2433.
361. Velter E, Torgerson C, et al. Comparison of the BACTEC MYCO/F Lytic bottle to the isolator tube, BACTEC Plus Aerobic F/bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/bottle to the Isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria, and fungi from blood. *J Clin Microbiol* 2001;39:4380-4386.
362. Viader-Salvado JM, Luna-Aguirre CM, et al. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb Drug Resist* 2003;9:33-38.
363. Voldstedlund M, Pedersen LN, et al. Different polymerase chain reaction-based analyses for culture-negative endocarditis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2003;35:757-9.
364. Von Rey CF, Maslow JN, Barber TW, et al. Persistent colonization of potable water a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 1994;43:1137-1141.
365. Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, Hallstrom O. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test. *J Clin Microbiol* 1995;33:1856-1859.
366. Wallace RJ, Brown B, et al. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J Infect Dis* 1992;166:405-412.
367. Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al. Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis* 1994;18:736-743.
368. Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, et al. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983;5:657-679.
369. Wallace PJ Jr, Swenson JM, et al. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983;5:657-679.
370. Wang SX, Ling LH, et al. Preliminary study on rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by the BD ProbeTec ET system. *J Med Microbiol* 2004;53(Part 1):57-59.
371. Warren NG, Body BA, Silcox VA, Matthews JH. Pulmonary disease due to *Mycobacterium malmoense*. *J Clin Microbiol* 1984;20:245-247.
372. Wasilayskas B, Morrell R Jr. Optimum recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens of human immunodeficiency virus-positive patients by using small volumes of isolator concentrate inoculated into BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 1995;33:784-785.
373. Wayne L. Simple pyrazinamide and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:147-151.
374. Wayne L. Microbiology of tubercle bacilli. *Am J Respir Dis Suppl* 1982;125:31-41.
375. Wayne LG, Kubica GP. Genus *Mycobacterium*. In: Sneath PHA, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986:1436-1457.
376. Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:1-25.

377. Weber J, Mettang T, Staetz E, et al. Pulmonary disease due to *Mycobacterium xenopi* in a renal allograft patient. *Rev Infect Dis* 1989;11:964-969.
378. Weinberger M, Berg SL, Feuerstein IM, et al. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clin Infect Dis* 1992;14:1229-1239.
- 378a. Weissfeiler J, Karassova V, Holland J. Atypical mycobacteria in monkeys. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 1964-65;11:403-407.
379. Wiszfeiler JG, Karczag E. Synonymy of *Mycobacterium simiae* Karasseva et al, 1965 and *Mycobacterium habana* Valdiva et al. *Int J Syst Bacteriol* 1971;26:474-477.
380. Weitzman I, Osadczyi K, Corrado ML, Karp D. *Mycobacterium thermoresistibile*: a new pathogen for humans. *J Clin Microbiol* 1981;14:593-595.
381. Wendt SL, George KL, Parker BC, et al. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:259-263.
382. Westergren V, Bassiri M, et al. Bacteria detected by culture and 16S rRNA sequencing in maxillary sinus samples from intensive care unit patients. *Laryngoscope* 2003;113:270-275.
383. Whelen AC, Fekken TA, Hunt JM, et al. Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:556-561.
- 383a. Whittier PS, Westfall K, Setterquist S, Hopfer RL. Evaluation of the Septi-Chek AFB system in the recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol* 1992;11:915-918.
384. Whyte T, Cormican M, et al. Comparison of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 for culture of Mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:123-126.
385. Wiid IJ, Werely C, Beyers N, et al. Oligonucleotide (GTS)5 as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* 1994;32:1318-1321.
386. Wilkins EGI, Gruffutgs RH, Roberts C. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Thorax* 1986;41:685-687.
387. Williams DL, Gillis TP, Dupree WG. Ethanol fixation of sputum sediments for DNA-mediated detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1558-1561.
388. Williams-Bouyer N, Yorke R, et al. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000;38:4167-4170.
389. Willocks L, Leen C, Brettell RP, et al. Isolation of *Mycobacterium malmoense* from HIV-positive patients. *J Infect Dis* 1993;26:345-346.
390. Witehky FG, Keiser J, Conville P, et al. Comparison of BACTEC 13A medium and Du Pont Isolator for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* 1988;26:1501-1505.
391. Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al. Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:134-139.
392. Wolfe JM, Moore DF. Isolation of *Mycobacterium thermoresistibile* following augmentation of mammoplasty. *J Clin Microbiol* 1992;30:1036-1038.
393. Wolinski E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:107-159.
394. Wong B, Edwards FF, Kiehn TE, et al. Continuous high-grade *Mycobacterium avium*-intracellular bacteremia in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 1985;78:35-40.
395. Woodley C. Evaluation of streptomycin and ethambutol concentrations for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and conventional procedures. *J Clin Microbiol* 1986;23:385-386.
396. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, et al. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard. NCCLS 2003;23(18):1-68.
397. Woods GL, Pentony E, Bodey MJ, Gatson AM. Concentration of sputum by cyto-centrifugation for preparation of smears for detection of acid-fast bacilli does not increase sensitivity of the fluorochrome stain. *J Clin Microbiol* 1995;33:1915-1916.
398. Woods GL, Witebsky FG. College of American Pathologists Mycobacteriology E Proficiency Testing Survey: summary of participant performance, 1979-1992. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:17-22.
399. Woos GL, Washington JA II. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis* 1987;9:275-294.
400. Xu J, Millar BC, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis—rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 2003;94:197-206.
401. Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:1944-1947.
402. Yakus MA, Hernandez SM, et al. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:4103-4110.
403. Yakus MA, Straus WL. DNA polymorphisms detected in *Mycobacterium haemophilum* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1083-1084.
404. Yamori S, Tsukamura M. Comparison of prognosis of pulmonary diseases caused by *Mycobacterium avium* and by *Mycobacterium intracellulare*. *Chest* 1992;102:89-90.
405. Yang ZH, De Haas PE, Van Soolingen D, et al. Restriction fragment length polymorphism *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. *J Clin Microbiol* 1994;32:3018-3025.
406. Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, et al. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol* 1995;33:1064-1069.
407. Yoganathan K, Elliot MW, Moxham J, et al. Pseudotumor of the lung caused by *Mycobacterium malmoense* infection in an HIV positive patient. *Thorax* 1994;49:179-180.
408. Young LS, Interlied CB, Berlin OG, Gottlieb MS. Mycobacterial infections in AIDS patients with emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev Infect Dis* 1986;8:1024-1033.
409. Zala L, Nunzikere T, Braathen L. Chronic cutaneous infection caused by *Mycobacterium gordonae*. *Dermatology* 1993;187:301-302.
410. Zaugg M, Salfinger M, Opravil M, Luthy R. Extrapulmonary and disseminated infections due to *Mycobacterium malmoense*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:540-549.
411. Zwadyk P Jr, Down JA, Myers N, Dey MS. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification, and PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2140-2146.

Infecciones producidas por espiroquetas

<http://booksmedicos.org>

Taxonomía

Innovaciones: pruebas provisionales y en fase de investigación

Treponema

Treponema pallidum subespecie *pallidum*

Período de incubación

Sífilis primaria

Sífilis secundaria

Sífilis latente

Sífilis tardía

Epidemiología

Inmunidad

Treponema pallidum subespecie *pertenue*

Treponema pallidum subespecie *endemicum*

Treponema carateum

Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades treponémicas

Pruebas serológicas

Borrelia

Fiebre recurrente

Epidemiología

Enfermedad clínica

Diagnóstico de laboratorio

Enfermedad de Lyme

Epidemiología

Enfermedad clínica

Diagnóstico de laboratorio

Leptospira

Leptospirosis

Epidemiología

Enfermedad clínica

Diagnóstico de laboratorio

***Spirillum minor* (fiebre por mordedura de rata)**

Las últimas décadas han sido una época de fluctuaciones en el papel de las espiroquetas. Por un lado, *Treponema pallidum*, un azote para la humanidad durante siglos, casi fue eliminado por la penicilina, pero tuvo un retorno inesperado que continúa en este nuevo siglo. En el otro extremo del espectro, *Borrelia burgdorferi*, descubierta hace sólo veinte años, se ha transformado en la infección por espiroquetas más frecuente de los Estados Unidos.^{45,47}

Este grupo grande y diverso de bacterias incluye patógenos y saprófitos. Hay microaerófilos, anaerobios estrictos, especies que sólo han sido cultivadas in vivo y otras que nunca lo han sido en ninguna condición. Algunos microorganismos tienen relaciones ecológicas complejas y los seres humanos sólo son víctimas accidentales. Otras espiroquetas infectan sólo a los seres humanos y deben ser transmitidas directamente de una persona a otra.

Taxonomía

El orden Spirochaetales contiene los principales patógenos para los seres humanos. Todos ellos son bacterias de forma helicoidal, móviles, que miden 0,1 a 3 µm

de diámetro por 5 a 120 μm de longitud.⁴² Los flagelos de la mayoría de las espiroquetas están incluidos dentro de la membrana externa multicapa, llamada vaina externa. Sin embargo, el género *Spirillum* tiene flagelos externos. A diferencia de otras bacterias, las espiroquetas se autopropulsan por rotación a través de un medio líquido y pueden mantener su motilidad incluso en líquidos de alta viscosidad.

La clasificación de las espiroquetas patógenas se detalla en el cuadro 20-1. Los patógenos se agrupan en tres géneros: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*.

Treponema

Los cuatro patógenos principales del género *Treponema* están genéticamente relacionados, infectan sólo a los seres humanos y no han sido cultivados en forma indefinida in vitro. A pesar de estas similitudes, causan enfermedades muy diferentes.

Treponema pallidum subespecie *pallidum*

T. pallidum subespecie *pallidum* (en adelante, *T. pallidum*) es el patógeno dominante entre las espiroquetas. *T. pallidum*, la causa de la sífilis venérea, ha gozado de muy mala fama durante 500 años. Tiene un "100%" de homología genética con *T. pallidum* subespecie *pertenue*, que causa una enfermedad cutánea no venérea que difiere en la mayoría de sus aspectos de la sífilis.¹⁷⁷ Un grupo de investigadores que probaron una cepa de referencia de cada microorganismo informaron una diferencia de sólo un nucleótido en el gen que codifica una proteína de 19 kDa,¹⁹² pero la inmunoreactividad de esta proteína era idéntica en las dos subespecies.¹⁹¹ En 1998 se secuenció todo el genoma de *T. pallidum*.⁸⁸

El origen de *T. pallidum* es incierto. La enfermedad no era relevante en Europa hasta el siglo XVI. Fornaciari y cols. estudiaron una momia del Renacimiento que contenía estructuras identificadas por inmunofluorescencia y microscopía electróni-

ca como *T. pallidum*.⁸⁶ Los partidarios de una escuela de pensamiento creen que Colón y sus marineros llevaron la enfermedad a su regreso del Nuevo Mundo.²² Estos historiadores identifican a *T. pallidum* como la causa del *great pox* ("mal francés", antiguo nombre de la sífilis) en tanto que el virus de variola producía *small pox* (viruela, en inglés). Se supone que la sífilis evolucionó a partir de una enfermedad clínica más leve de los aborígenes americanos. Hay abundantes datos de cambios óseos similares a los de la sífilis en esqueletos del Nuevo Mundo.²²⁹ También se han encontrado lesiones similares en esqueletos precolombinos del Viejo Mundo; la cuestión no se ha aclarado definitivamente, porque las lesiones óseas de la sífilis venérea y no venérea son difíciles de diferenciar. Rothschild y Rothschild han sugerido elementos discriminadores entre las especies de treponemas si se dispone del material adecuado.²³⁰ Sea cual sea la fuente original, cada país europeo decidió asociar la enfermedad con su vecino. Para los ingleses, la sífilis era la "enfermedad francesa." Los franceses la consideraban la "varicela italiana". Parece que ningún país o cultura deseaba hacerse cargo de este azote particular.

La presentación clínica de la sífilis venérea es variada y compleja. Sir William Osler, uno de los fundadores de la medicina moderna, se refirió a la enfermedad como "el gran imitador" y decía a los estudiantes que, si conocían la sífilis, sabían medicina. La enfermedad clínica se ha dividido, en forma un poco arbitraria, en una serie de estadios que se describen a continuación.^{115,259,291}

PERÍODO DE INCUBACIÓN

Los treponemas se introducen en el cuerpo a través de una mucosa o un corte o abrasión de la piel. Se ha estimado epidemiológicamente que hasta el 50% de los contactos sexuales de personas que pueden infectar a otros no sufren la infección. Sin embargo, estudios experimentales en voluntarios humanos han documentado que la DI₅₀ (dosis infecciosa 50, el número de microorganismos necesarios para infectar al 50% de las perso-

Cuadro 20-1 Clasificación de las espiroquetas

MICROORGANISMO	LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	ENFERMEDAD
Orden Spirochaetales		
Familia Spirochaetaceae		
Género III. <i>Treponema</i>		
<i>T. pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i>	Mundial	Sífilis venérea
<i>T. pallidum</i> subespecie <i>pertenue</i>	Asia tropical, África, América del Sur y Centroamérica	Frambesia
<i>T. pallidum</i> subespecie <i>endemicum</i>	África. SE Asia. Medio Oriente, Yugoslavia	Sífilis no venérea endémica
<i>T. carateum</i>	América Central y del Sur	Pinta
"Espiroquetas bucales similares a <i>T. pallidum</i> "	Mundial	Gingivitis necrosante
Género IV. <i>Borrelia</i>		
Especies de <i>Borrelia</i>	Mundial	Fiebre recurrente transmitida por garrapatas
<i>Borrelia recurrentis</i>	América del Sur, Europa, África, Asia	Fiebre recurrente transmitida por piojos
<i>Borrelia burgdorferi</i>	América del Norte, Europa	Enfermedad de Lyme
Familia Leptospiraceae		
Género I. <i>Leptospira</i>		
<i>Leptospira interrogans</i>	Mundial	Leptospirosis

Adaptado de Krieg NR, Holt JR, eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984:38-64.

nas expuestas) para *T. pallidum* son sólo 57 microorganismos.¹⁶⁶ Poco después de la inoculación las espiroquetas se diseminan por todo el cuerpo, donde por último pueden causar enfermedad. El período de incubación varía de 3 a 90 días, con una media de 3 semanas.

SÍFILIS PRIMARIA

Esta fase comprende el desarrollo de la lesión primaria en el sitio de inoculación. La reacción inflamatoria crea una lesión ulcerada denominada chancro. Éste tiene una base limpia, lisa y bordes elevados y duros. La úlcera es casi siempre indolora, aunque ligeramente sensible a la palpación. Hay poco exudado, a menos que el chancro luego se infecte. Es habitual un solo chancro primario, pero en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) pueden verse úlceras primarias múltiples. La base contiene espiroquetas, que pueden visualizarse por microscopia de campo oscuro o inmunofluorescencia después de raspar de la lesión.

El chancro aparece en el sitio de la inoculación, la mayor parte de las veces en los genitales. En ocasiones, la sífilis se produce sin una úlcera visible.²⁶⁸ Los ganglios linfáticos regionales están agrandados, pero son indoloros y duros. El chancro se cura en 3 a 6 semanas (intervalo, 1 a 12).

El diagnóstico de laboratorio de la sífilis primaria depende de la demostración de espiroquetas en las lesiones por microscopia de campo oscuro o inmunofluorescencia directa, además de la serología.¹¹⁶ Las pruebas no treponémicas para la sífilis son negativas en el 10% a 30% de los pacientes con sífilis primaria.¹⁴⁶

SÍFILIS SECUNDARIA

La fase secundaria de diseminación es la etapa más manifiesta de la enfermedad y es el período en el cual los microorganismos son más numerosos. Esta fase empieza 2 a 8 semanas después de la aparición del chancro y dura de algunos días a meses. La presentación más alarmante es una erupción cutánea diseminada, que puede ser macular, maculopapular o pustular, pero no vesicular, y que compromete en forma característica las palmas de las manos y las plantas de los pies. En las áreas de intertrigos, las placas anchas, húmedas, de color blanco grisáceo, llamadas condiloma lata, están repletas de espiroquetas vivas que pueden visualizarse por microscopia de campo oscuro o inmunofluorescencia de los raspados de las lesiones. Asimismo, pueden hallarse lesiones tegumentarias infectadas llamadas parches mucosos. Puede haber pérdida de pelo o adelgazamiento de las cejas.

Los síntomas sistémicos son linfadenopatías generalizadas, fiebre y malestar general. Cualquier órgano puede estar comprometido en la sífilis secundaria. Es posible que se desarrolle queratitis, hepatitis y osteítis. La infección del sistema nervioso central ocurre en cualquier estadio de la sífilis, pero es más frecuente en la fase secundaria.²³⁹ El meningismo y la cefalea son frecuentes. Puede presentarse una meningitis aséptica. Las espiroquetas también pueden cultivarse del líquido cefalorraquídeo (LCR) aun en ausencia de inflamación y de enfermedad clínica.¹⁶⁰

La demarcación entre las fases primaria y secundaria no está bien definida. En ocasiones, el chancro primario todavía está presente cuando aparece la erupción cutánea secundaria.

El diagnóstico de laboratorio de sífilis secundaria puede hacerse por lo general fácilmente mediante técnicas serológicas. El diagnóstico de neurosífilis es más difícil, como se exa-

mina más adelante. Las anomalías del LCR en un paciente con diagnóstico serológico de sífilis proporcionan evidencia presuntiva de que se ha comprometido el sistema nervioso.

SÍFILIS LATENTE

Después de la fase secundaria, la enfermedad se hace subclínica, aunque no necesariamente inactiva. La fase latente se ha dividido en forma arbitraria en un período inicial de 4 años, llamado fase latente temprana, y un período latente tardío posterior.⁴⁴ Durante la latencia temprana puede haber recidivas y el paciente puede transmitir la infección. El 90% de las recidivas ocurren dentro del primer año. El período latente tardío es de duración indefinida y las complicaciones pueden no aparecer nunca. Durante el estadio latente de la sífilis la presencia de la enfermedad puede detectarse sólo serológicamente.

SÍFILIS TARDÍA

Las complicaciones tardías de la sífilis son la enfermedad del sistema nervioso central, las anomalías cardiovasculares y los tumores, llamados gomas, en cualquier órgano. La sífilis neurovascular tardía puede ser sintomática o asintomática.¹¹⁷ La enfermedad asintomática se caracteriza por las anomalías del LCR en ausencia de síntomas. Suelen encontrarse en el LCR pleocitosis, concentraciones elevadas de proteína o concentraciones de glucosa reducidas. Una prueba serológica positiva en el LCR, clásicamente la prueba VDRL, define la enfermedad, aunque las espiroquetas rara vez pueden demostrarse por cultivo o, en los últimos años, por métodos moleculares. La infección sintomática es meningovascular o parenquimatosa, pero hay una superposición considerable en las categorías. La sífilis meningovascular se parece a la meningitis aséptica del estadio secundario. Cualquier nervio craneal puede verse afectado por la inflamación, y la sordera o las alteraciones visuales pueden ser el resultado. La enfermedad parenquimatosa puede comprometer las neuronas del cerebro o de la médula espinal. El compromiso cerebral se manifiesta como una amplia variedad de trastornos neuropsiquiátricos, que incluyen cambios físicos, como parálisis, y problemas psiquiátricos, entre ellos la megalomanía ("demencia paralítica"). Las columnas posteriores (los haces sensitivos) de la médula espinal son los más afectados, lo que causa dolores intensos e incapacidad para percibir los impulsos sensitivos de las extremidades. La enfermedad, llamada tabes dorsal, tiene como características una peculiar marcha "taconeante" y la deformación de las rodillas (articulaciones de Charcot), que son causadas por la falla del circuito de retroalimentación que, en condiciones normales, indica al cuerpo el modo cuidadoso de desplazar las articulaciones.

El intervalo entre la enfermedad primaria y la complicación neurológica es de 5 a 10 años para la sífilis meningovascular, de 15 a 20 años para la parálisis general y de 25 a 30 años para la tabes dorsal.

Sífilis cardiovascular. La lesión cardiovascular de la sífilis, la aortitis sífilítica, ocurre en alrededor del 10% de los casos no tratados. Es causada por la inflamación de los vasos pequeños que irrigan la aorta (endarteritis sífilítica) y afecta sobre todo la aorta ascendente. Puede causar dos complicaciones: un aneurisma aórtico y la dilatación del anillo aórtico, que causa insuficiencia y regurgitación de la sangre a través de la válvula aórtica. Los aneurismas aórticos pueden crecer hasta alcanzar un tamaño tal que erosionan el esternón y se visualizan bajo la piel del tórax.

Sífilis tardía "benigna". Esta fase se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas inespecíficas llamadas gomas. Esta lesión es la complicación más frecuente de la sífilis tardía y ocurre en un 15% de los pacientes no tratados. La formación del granuloma indica que existe una respuesta inmunitaria celular totalmente activa. Sin embargo los gomas pueden destruir el tejido circundante a medida que aumentan de tamaño.²²² Clínicamente, los gomas son lesiones ocupantes, destructivas, que se encuentran casi en cualquier órgano y pueden confundirse al principio con carcinomas.

El diagnóstico de laboratorio de la sífilis tardía requiere la demostración de reactividad serológica con una prueba treponémica o no treponémica. La única prueba universalmente reconocida como demostración de la neurosífilis es la prueba no treponémica VDRL, adaptada para el líquido cefalorraquídeo. Lamentablemente, es muy poco sensible, pero otras pruebas serológicas son propensas a la inespecificidad. Se ha sugerido usar la prueba treponémica de inmunofluorescencia con absorción del suero (FTA-ABS) como prueba de cribado más sensible para descartar por completo sífilis en pacientes con líquido cefalorraquídeo no reactivo, pero no hay ninguna prueba aprobada en los Estados Unidos para este propósito.

Sífilis congénita. Una de las consecuencias más trágicas de la sífilis es la infección intrauterina del feto.³⁰² Como reflejo del aumento en la población general, la sífilis congénita ha aumentado en forma constante desde 1983.⁶³ La infección transplacentaria tiene más probabilidades de ocurrir durante el estadio primario o secundario de la sífilis (véase lámina en color 20-1A). Las espiroquetas pueden infectar al feto en cualquier momento durante el embarazo, pero la probabilidad de que se produzca enfermedad clínica aumenta a medida que éste progresa.

Muchos de los fetos infectados mueren. En algunas zonas de los Estados Unidos, la sífilis congénita es la causa más frecuente de hidropesía fetal no inmunitaria, una enfermedad de la placenta que causa muerte del feto.²¹ De los que sobreviven, la mitad son asintomáticos y el resto tiene las lesiones de la sífilis secundaria, sin lesiones primarias detectables, porque no tienen ninguna puerta primaria de entrada. La infección se caracteriza por hepatoesplenomegalia, meningitis, plaquetopenia, anemia y lesiones óseas.¹⁵⁴ La infección intrauterina del hueso puede causar anomalías visibles de huesos y dientes, como tibias deformadas (tibias en sable) o dientes anómalos (molares en forma de mora). Para evitar esta consecuencia trágica, se han recomendado las pruebas de cribado en las mujeres durante el embarazo. En las poblaciones de alto riesgo es necesario además hacer pruebas en suero materno y del recién nacido para buscar anticuerpos en el momento del parto. La sangre del cordón es menos adecuada que el suero del recién nacido.⁵⁰

La interpretación de las pruebas serológicas en la infección congénita es difícil. Los lactantes sintomáticos nacidos de madres seropositivas no tratadas requieren tratamiento antimicrobiano. Si la madre ha recibido un tratamiento adecuado con penicilina, la infección congénita es improbable y se ha recomendado el seguimiento estrecho del lactante.¹⁰⁸ La prueba VDRL suele retornar a la normalidad en el término de 6 meses y la prueba FTA-ABS se normaliza al año.⁴⁹ Las pruebas tradicionales para detectar anticuerpos IgM en el lactante no se utilizan por su falta de sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, las nuevas estrategias y las variaciones de los métodos tradicionales proporcionan medios adicionales para la evaluación de los lactantes nacidos de madres con serología positiva para sífilis. Se han empleado modificaciones de los métodos para la detección de IgM, pruebas de inmunotransfe-

rencia con antígenos definidos,³³ detección de espiroquetas por inmunofluorescencia directa y detección de ácidos nucleicos con técnicas de amplificación.²³⁷ Puede demostrarse funisitis (inflamación del cordón umbilical) con necrosis o sin ella en un poco menos de la mitad de las madres con evidencia serológica de sífilis.¹⁰¹ La etiología treponémica puede demostrarse por inmunohistoquímica, pero pocos laboratorios tienen la capacidad para hacer este diagnóstico.

Una combinación de serología y detección de antígeno o su genoma en el lactante de una madre infectada ofrece la mejor probabilidad de demostrar la sífilis congénita, incluso la neurosífilis.¹⁷⁸ Si no hay pruebas claras de que la madre ha sido tratada de manera adecuada, está indicado el tratamiento empírico del lactante hasta que se cuente con pruebas con la sensibilidad suficiente para eliminar la posibilidad de infección intrauterina.

EPIDEMIOLOGÍA

La sífilis puede transmitirse sólo a través de unas pocas vías: contacto sexual,²²³ introducción directa en el sistema vascular por utilización compartida de agujas compartidas o a través de transfusiones,⁴⁸ contacto cutáneo directo con las lesiones infecciosas o transferencia transplacentaria de espiroquetas (cuadro 20-2).

A pesar del tratamiento antitreponémico exitoso y del conocimiento de la epidemiología durante décadas, el problema de la sífilis persiste y la incidencia de la infección está en aumento. Entre 1981 y 1989 la incidencia de sífilis primaria y secundaria en los Estados Unidos creció de 13,7 a 18,4 casos por 100 000 personas, un aumento del 34%.²²⁴ En 1987 la incidencia de sífilis congénita aumentó el 21%.⁴³ Durante esta década, la prostitución y el abuso de la cocaína se reconocieron como factores de riesgo. Después de una reversión aparente de estas tendencias en la década de 1990, la tasa aumentó de nuevo en 2001, causada principalmente por la reaparición de prácticas sexuales no protegidas entre varones homosexuales/bisexua-

Cuadro 20-2 Transmisión de las espiroquetas

MICROORGANISMO	TRANSMISIÓN
<i>Treponema pallidum pallidum</i>	Venérea Transfusión sanguínea (sólo seres humanos)
<i>T. pallidum pertenue</i>	Contacto directo con la piel (sólo seres humanos)
<i>T. carateum</i>	Contacto directo con la piel (sólo seres humanos)
<i>T. pallidum endemicum</i>	Contacto directo con las mucosas (sólo seres humanos)
	Recipientes de comida o bebida contaminados
<i>Borrelia recurrentis</i>	Huésped humano, vector: el piojo humano (<i>Pediculus humanus humanus</i>)
Especies de <i>Borrelia</i>	Roedores, primates, huésped humano; vector: garrapatas (<i>Ornithodoros</i> , <i>Rhipicephalus</i>)
<i>B. burgdorferi</i>	Roedores, huésped: ciervo; vector: garrapata (<i>Ixodes</i>)
<i>Leptospira interrogans</i>	Huésped: rata; aguas contaminadas

les.⁶ Persisten otros bolsones recalcitrantes de enfermedad. En 1997, las mujeres que fueron encarceladas varias veces en la ciudad de Nueva York tuvieron una incidencia de sífilis más de 1 000 veces mayor que todas las demás mujeres de la ciudad.²⁸

Un estudio epidemiológico nacional de serorreactividad para la sífilis indicó que la raza, la edad, la educación, los ingresos y el lugar de residencia se correlacionaban con la positividad.¹⁰⁵ En los varones el diagnóstico suele realizarse durante el estadio primario, en tanto que la lesión primaria a menudo no se detecta en las mujeres, que son diagnosticadas durante la fase latente temprana.¹⁴⁸ Se ha calculado que, en un período de 6 años, se detectaron 1 200 casos de sífilis insospechada mediante las pruebas de cribado en sangre donada, casi el 60% de la cual provenía de voluntarios.⁹² Lo más alarmante es que el 81% de los dadores voluntarios y el 64% de los donantes pagados no informaron ningún factor de riesgo para la sífilis.

Como reflejo de los cambios importantes producidos en la sociedad norteamericana en los últimos cincuenta años, un estudio de sífilis prenatal realizado en el Boston City Hospital demostró un desplazamiento de las mujeres blancas casadas en 1951 a las mujeres de razas minoritarias solteras en 1991. Una prueba serológica positiva se asociaba con la drogadicción y la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual.¹³⁵ Una manifestación muy diferente de la influencia de la vida moderna sobre una enfermedad vieja fue la observación de que por lo menos en un grupo de casos de sífilis la pesquisa epidemiológica condujo hasta los contactos establecidos a través de un sitio de chat por Internet.¹³⁶

Las técnicas epidemiológicas tradicionales de notificación del compañero sexual han resultado inadecuadas para los cambios en las condiciones socioeconómicas de la América moderna.^{14,94} Entre 1983 y 1984 Alejandro-Rodríguez y cols. estudiaron a 285 niñas y 2 236 niños de 9 a 18 años que ingresaron en una institución de detención.¹¹ La tasa de prevalencia para la gonorrea fue del 3% en los niños y del 18,3% en las niñas. Para la sífilis la tasa fue del 0,63% en los varones y del 2,5% en las mujeres.

En teoría, las herramientas moleculares modernas deberían hacer que el rastreo de contactos y la identificación de focos locales fueran más sofisticados. Sin embargo, en algunos informes de aplicación de la epidemiología molecular se han identificado numerosos subtipos genéticos en una zona geográfica.^{208,287}

T. pallidum y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) interactúan de varias maneras. Se ha sugerido que las úlceras genitales producidas por diversas etiologías facilitan la adquisición del HIV.²⁷¹ La inmunosupresión que acompaña a la infección por HIV puede afectar la respuesta serológica a la sífilis. En los individuos inmunocompetentes, las pruebas serológicas son uniformemente positivas durante la fase secundaria de la sífilis. Sin embargo, Haas y cols. observaron 109 varones homosexuales que habían sido tratados para la sífilis.¹⁰³ Todos los que no habían sido infectados por el HIV mantuvieron su reactividad al antígeno treponémico. En cambio, el 7% de los que tenían una infección por HIV subclínica y el 38% de los que tenían enfermedad por el HIV habían perdido la reactividad a los antígenos treponémicos. Para empeorar las cosas, las reacciones biológicas falsas positivas en las pruebas no treponémicas parecen ser más frecuentes en los pacientes infectados por el HIV que en los que no tienen esa infección.^{16,227} El mecanismo de esta asociación es incierto y hay muchos posibles factores de confusión en estos pacientes complicados. Por ejemplo, también se describió una asociación de reacciones biológicas falsas positivas en pacientes infectados por el virus de la hepa-

titis C.²⁸⁹ No obstante, la mayoría de las pruebas no treponémicas positivas en los pacientes infectados por el HIV indican la presencia de sífilis y se ha sugerido que los resultados confirmatorios con FTA-ABS pueden ser falsos negativos.⁷³

Los pacientes infectados por el HIV tienen más probabilidades de presentar una sífilis secundaria y chancros persistentes que los pacientes no infectados.¹²⁰ Si bien algunos investigadores han sugerido que la epidemia de HIV se ha acompañado por un aumento de la neurosífilis,¹⁸⁷ otros no han identificado el virus como un factor de riesgo para la infección del sistema nervioso. En todo caso, los pacientes se detectan casi siempre en los estadios tempranos de la neurosífilis.⁸⁴ Varios investigadores informaron que el tratamiento de la sífilis es infructuoso en los pacientes infectados por el HIV.²⁷

La norma de tratamiento para la sífilis sigue siendo la penicilina. La demostración de fracasos del tratamiento, sobre todo en los pacientes infectados por el HIV, ha hecho surgir la preocupación de que el régimen conveniente con penicilina benzatínica de efecto prolongado puede ser inadecuado en algunos enfermos.^{114,308} En ciertas situaciones puede ser adecuado administrar antibióticos recientemente desarrollados.¹⁵ Una de las complicaciones raras del tratamiento es la reacción de Jarisch-Herxheimer, que es local y generalizada. Esta reacción, que se asocia con endotoxinas circulantes liberadas de los microorganismos,⁹³ se describió clásicamente en el tratamiento de la fiebre recurrente transmitida por piojos.

INMUNIDAD

Los estudios experimentales han demostrado la importancia del sistema inmunitario celular en la resistencia a *T. pallidum*.²³⁴ Hay pruebas firmes en los seres humanos de que la inmunidad contra *T. pallidum* es parcial o de aparición tardía. Algunos lactantes con infección congénita se han reinfectado al llegar a la adolescencia.⁸¹ Asimismo, se logró reinfectar con éxito a voluntarios humanos que antes habían padecido sífilis. La probabilidad de que ocurra una reinfección disminuye con el tiempo transcurrido después de la infección primaria.⁸² Existe un período de resistencia parcial, durante el cual puede ocurrir reinfección sin formación de un chancro. Al llegar al estadio tardío, el paciente es completamente inmune a la reinfección.

Treponema pallidum subespecie *pertenue*

T. pallidum subespecie *pertenue* (de ahora en adelante, *T. pertenue*) es la causa del pian o frambesia, una enfermedad treponémica crónica, no venérea (véase cuadro 20-1).¹³⁹ El pian es endémico en África central y partes del subcontinente de la India, América del Sur y el sudeste asiático. La enfermedad tiene estadios primario, secundario y terciario. La piel y los huesos son los principalmente afectados. La enfermedad empieza en la niñez y se transmite por contacto con lesiones cutáneas infecciosas (véase cuadro 20-2). En la fase terciaria las lesiones pueden ser similares a sifilíticas. La penicilina benzatínica es curativa, aunque las lesiones pueden tardar meses en desaparecer. Los anticuerpos contra *T. pertenue* son indistinguibles de los anticuerpos contra *T. pallidum*.

Treponema pallidum subespecie *endemicum*

T. pallidum subespecie *endemicum* (de ahora en adelante, *T. endemicum*) es la causa de la sífilis no venérea endémica o bejel (véase cuadro 20-1). Es endémico en partes de África,

Medio Oriente, India y Asia. La infección ocurre en la infancia, en zonas rurales con higiene deficiente. Se transmite por contacto con lesiones de las mucosas o a través de utensilios para beber y comer contaminados (véase cuadro 20-2). La lesión primaria de la sífilis endémica se ve rara vez, pero la enfermedad es por lo demás similar a la sífilis venérea. La penicilina benzatínica es el tratamiento de elección. La corrección de las condiciones sanitarias y de higiene puede ser preventiva. Los anticuerpos de los pacientes con sífilis endémica reaccionan en forma cruzada con *T. pallidum*.

Treponema carateum

T. carateum, agente etiológico de la pinta, es tal vez el más antiguo de los treponemas humanos. La enfermedad se caracteriza por lesiones cutáneas ulcerosas o papuloescamosas, que a menudo pierden su pigmentación. La pinta es endémica en partes de América del Sur y Central (véase cuadro 20-1) y se disemina por contacto con las lesiones cutáneas infectadas (véase cuadro 20-2). No hay ningún efecto a largo plazo sobre la salud general, pero el deterioro estético es considerable. Los antisueros de los pacientes con pinta reaccionan en forma cruzada con los antígenos específicos de *T. pallidum*.⁸⁵

Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades treponémicas

El diagnóstico de laboratorio de la sífilis ha sido ampliamente revisado por Larsen y cols.,¹⁴⁶ y Hart ha elaborado una estrategia de diagnóstico y tratamiento eficaz en relación con los costos.¹⁰⁸

El procedimiento de referencia para el diagnóstico de sífilis es el cultivo, que debe realizarse in vivo, casi siempre mediante inoculación intratesticular de conejos con el material clínico (cuadro 20-3). El procedimiento es caro y engorroso, y requiere varios meses para el subcultivo del material testicular si el animal original no presenta conversión serológica. Por razones obvias, el cultivo sigue siendo una herramienta de investigación.

En la sífilis primaria, antes de la aparición de los anticuerpos, la detección directa de espiroquetas en el chancro es el único medio de diagnóstico (protocolo 20-1). El método tradicional ha sido la microscopia de campo oscuro del material raspado de la superficie de una lesión (fig. 20-1). La observación de la motilidad de la espiroqueta es fundamental para diferenciar *T. pallidum* de las espiroquetas saprófitas, por lo que la observación microscópica debe llevarse a cabo inmediatamente



Figura 20-1 Examen en campo oscuro positivo para *Treponema pallidum*. La forma espiralada con espiras muy apretadas de los microorganismos es evidente. El fondo contiene detritos y algunos eritrocitos, lo que indica que la muestra es adecuada. 1000X. (Microfotografía cortesía de los CDC, Atlanta GA).

después de obtener la muestra, lo cual es muy difícil de lograr en la mayoría de los laboratorios clínicos. El examen de las lesiones bucales no se recomienda debido a la presencia frecuente de treponemas saprófitos en la boca. Las lesiones cutáneas y viscerales de la sífilis secundaria suelen contener grandes cantidades de espiroquetas que pueden demostrarse por microscopia de campo oscuro de raspados o improntas.

Un enfoque alternativo, más satisfactorio que la microscopia de campo oscuro, es demostrar la presencia de espiroquetas en las lesiones, por inmunofluorescencia (véase lámina en color 20-1B). Se han creado reactivos monoclonales con mayor especificidad.¹²² Hook y cols.¹¹⁶ demostraron la presencia de treponemas fluorescentes en 30 de 30 pacientes con sífilis primaria, 29 de los cuales también tenían exámenes de campo oscuro positivos. En algunos casos de gingivitis necrosante²²¹ se describió una espiroqueta bucal antigénicamente relacionada con *T. pallidum*, por lo que existe la posibilidad de encontrar resultados falsos positivos cuando se evalúan las lesiones bucales, incluso con un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclo-

Cuadro 20-3 Cultivo de espiroquetas

MICROORGANISMO	IN VIVO	IN VITRO
<i>Treponema pallidum pallidum</i>	Testículos de conejo; hámster; cobayo	Ninguno
<i>T. pallidum pertenue</i>	Testículos de conejo; hámster; cobayo	Ninguno
<i>T. pallidum endemicum</i>	Testículos de conejo; hámster; cobayo	Ninguno
<i>T. carateum</i>	Ninguno (chimpancé ±)	Ninguno
<i>Borrelia recurrentis</i>	Diversos	Medio de Kelly modificado
Especies de <i>Borrelia</i>	Diversos	Medio de Kelly modificado
<i>B. burgdorferi</i>	Diversos	Medio de Kelly modificado
<i>Leptospira interrogans</i>	Diversos	Medio de Fletcher; medio de Korthof; medio Tween 80-albúmina

nal conjugado con fluoresceína se puede obtener en los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (número de catálogo: BE3051).

Para realizar la prueba de fluorescencia directa para *T. pallidum* (DFA-TP), se obtiene material de una lesión o tejido como se describió para el examen de campo oscuro, sólo que el material se deja secar en el portaobjetos (protocolo 20-1). En forma alternativa, los frotis secos pueden enviarse a un laboratorio de referencia o pueden obtenerse secreciones en tubos capilares que se sellan y guardan a 4 °C para mandarlos por correo. El método de inmunofluorescencia directa ha sido eficaz para *T. pertenue*, así como para *T. pallidum*.²⁰⁵

Las espiroquetas presentes en tejidos fijados con formol pueden demostrarse con una de las muchas variaciones de una tinción por impregnación argéntica, como los procedimientos de Steiner, Warthin-Starry o Dieterle (véase lámina en color 20-1A).²⁹⁵ Aunque el hallazgo de espiroquetas en la situación clínica apropiada es evidencia presuntiva de sífilis, la tinción en sí misma es inespecífica. La aplicación de un anticuerpo fluoresceinado proporciona especificidad, además de sensibilidad. Ito y cols. han demostrado *T. pallidum* en tejidos fijados en formol mediante antisueros policlonales¹²³ o anticuerpos monoclonales después del tratamiento con NH₄OH o tripsina para exponer los sitios antigénicos.

PRUEBAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas para la sífilis pueden dividirse en dos grupos: pruebas no treponémicas y pruebas treponémicas. Ambos grupos tienen características distintivas que los hacen útiles para diferentes propósitos. Estos grupos son complementarios, no mutuamente excluyentes. Las pruebas no treponémicas son muy útiles como estudios de cribado. Las pruebas treponémicas deben reservarse como estudios confirmatorios cuando una prueba no treponémica es positiva o cuando la sospecha clínica de sífilis es alta, a pesar de que una prueba no treponémica sea no reactiva. Hart¹⁰⁸ señaló que la "mayor" especificidad de las pruebas treponémicas obedece a un artificio derivado de su uso actual como pruebas de confirmación después de efectuar una prueba no treponémica. Cuando las pruebas se comparan como procedimiento serológico inicial, la prueba no treponémica VDRL realmente es tan específica o más que la prueba treponémica FTA-ABS.¹⁴⁴ Las características generales de estas pruebas se resumen en el cuadro 20-4.

Los procedimientos para la realización de estas pruebas se han estandarizado y han sido publicados con gran detalle por el

U.S. Public Health Service.¹⁴⁵ Algunos de ellos se resumen en los cuadros con fines didácticos. Cuando estas pruebas se realizan en el laboratorio, es indispensable que se consulte y se siga exactamente el manual o las instrucciones del fabricante.

Pruebas no treponémicas. Las pruebas no treponémicas utilizan los anticuerpos contra un lípido tisular, llamado cardiolipina, que se produce como un subproducto de la infección treponémica. La asociación se reconoció a principios del siglo pasado cuando se crearon diversas pruebas de fijación del complemento. Los procedimientos actuales son predominantemente pruebas de floculación. Usan cardiolipina en forma de complejo con colesterol y lecitina. Los procedimientos habituales son las pruebas del Venereal Diseases Research Laboratory (VDRL) y la reagina plasmática rápida (RPR). Las pruebas RPR en tarjeta alcanzaron popularidad porque la prueba de VDRL es técnicamente muy engorrosa y difícil. Cuando se dejaron de fabricar los frascos requeridos para la preparación del antígeno VDRL se desató una lucha por una alternativa aceptable.²¹¹ Otras pruebas usadas son la prueba de detección de reaginas (*reagin screen test*, RST), la prueba de reaginas en suero no calentado (*unheated serum reagin*, USR) y la prueba de rojo de toluidina en suero no calentado (*toluidine red unheated serum test*, TRUST).

Las pruebas no treponémicas tienen una sensibilidad del 70-99%, según el estadio de la enfermedad. Las pruebas pueden no ser positivas en la sífilis primaria, por lo que deben repetirse después de 1 semana, 1 mes y 3 meses si se obtiene un resultado negativo en un paciente con presunta sífilis. La sensibilidad de estas pruebas es cercana al 100% durante la fase secundaria de la enfermedad. El plasma y la sangre del cordón no deben usarse, porque pueden obtenerse reacciones fronterizas.¹⁴³

Las pruebas no treponémicas son afectadas por el tratamiento antitreponémico. Como resultado, son útiles para seguir la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los resultados de cualquier prueba positiva deben ser titulados hasta una dilución de punto final. Además, el suero de los pacientes con grandes cantidades de anticuerpos puede producir un fenómeno de prozona. Cuando ocurre este fenómeno, las concentraciones relativas de anticuerpo y antígeno no están en equilibrio, y la precipitación o la floculación no tienen lugar. Los resultados falsos negativos causados por el fenómeno de prozona siguen siendo un problema clínico. La existencia de un fenómeno de prozona a menudo produce un aspecto "rugoso" del antígeno no floculado. Cualquier suero que produzca este aspecto rugoso debe ser titulado. Además, el suero debe ser

Cuadro 20-4 Características de las pruebas serológicas para la sífilis

PRUEBA	TIPO	% POSITIVIDAD EN EL ESTADIO INFECCIOSO		
		Primario	Secundario	Tardío
VDRL	No treponémica	70	99	1
RPR	No treponémica	80	99	0
FTA-ABS	Treponémica	85	100	98
TPHA	Treponémica	65	100	95
TPI	Treponémica	50	97	95

Adaptado de Tramont EC. Treponema pallidum (syphilis). En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 3 ed. Nueva York: Churchill Livingstone, 1990.

diluido y probado nuevamente si la sospecha clínica de que un paciente con resultados negativos de la prueba tiene sífilis es fuerte. En la población general la frecuencia de reacciones de prozona es tan baja que la dilución rutinaria del suero no es eficaz en relación con los costos.⁷⁰

Si el título de anticuerpos no disminuye en forma progresiva con el tratamiento, debe considerarse la posibilidad de un fracaso de éste. Debe haber una disminución de por lo menos cuatro veces en el título de anticuerpos después de 3 meses de tratamiento antitreponémico. En los pacientes que son tratados en los estadios tardíos de la sífilis o que se han reinfectado, los títulos disminuyen muy lentamente o permanecen estables. Algunos de estos "persistentes" crónicos pueden mantener las pruebas no treponémicas positivas toda la vida.

Las pruebas no treponémicas no pueden usarse para diagnosticar la sífilis tardía, sobre todo si está tratada, porque el título de anticuerpos disminuirá por último a niveles no detectables.

La prueba de VDRL se ha transformado en la prueba no treponémica estándar. La preparación del antígeno debe hacerse con gran precisión y prestando atención a los detalles. Es la única prueba serológica con aceptación universal para el diagnóstico de neurosífilis. En la figura 20-2 se muestran ejemplos de reacciones VDRL. El procedimiento se resume en el protocolo 20-2.

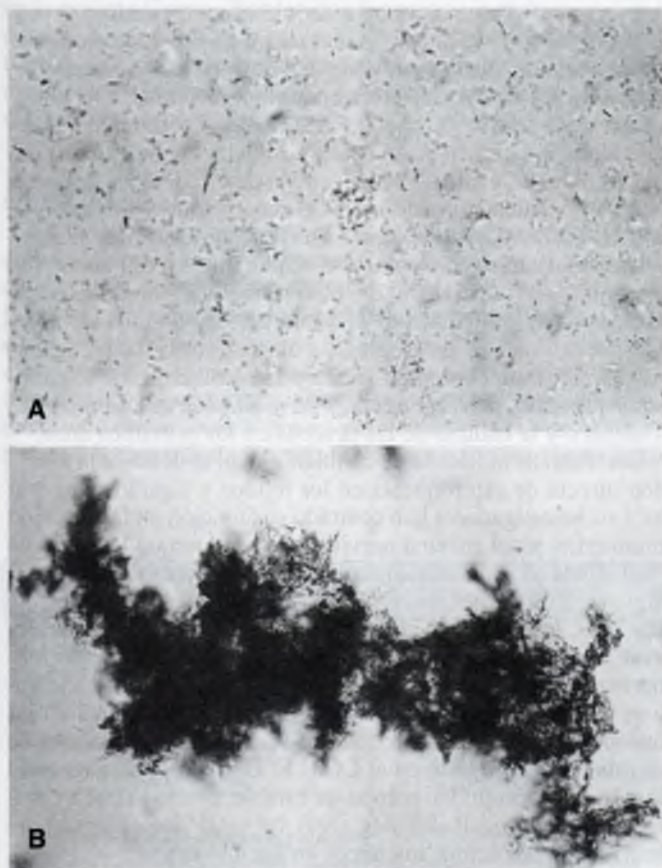


Figura 20-2 Prueba VDRL: las reacciones en esta prueba se evalúan microscópicamente. (A) Suero no reactivo. Las partículas de antígeno VDRL se encuentran dispersas de forma uniforme, sin agruparse. (B) Suero reactivo: las partículas de antígeno VDRL están fuertemente aglutinadas por este suero sifilítico. Las partículas aisladas se agrupan en cúmulos y grandes grumos. 100x. (Cortesía de Burton Wilcke, PhD y Mary Celotti.)

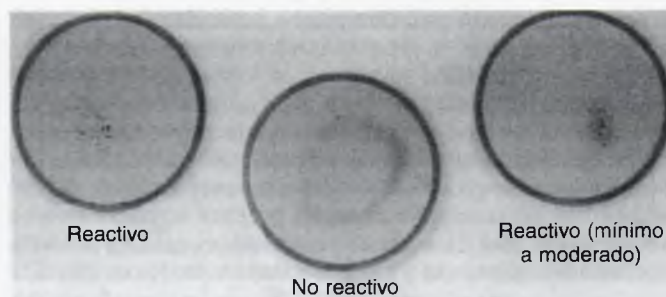


Figura 20-3 Prueba RPR en tarjeta: las reacciones en esta prueba se leen a simple vista, usando iluminación con luz incandescente. Esta tarjeta control contiene sueros *Reactivo* (R), *Débilmente reactivo* (D) y *No reactivo* (N). El antígeno VDRL modificado se hace visible al formar complejos con partículas de carbón. Las partículas de carbón-antígeno están dispersas en forma uniforme y finamente distribuidas en el suero no reactivo y forman grumos visibles en el suero reactivo. El suero con actividad mínima a moderada produce pequeños agregados y grumos de las partículas de carbón- antígeno VDRL.

La prueba RPR es una adaptación del principio de floculación a un formato en tarjeta. La visibilidad de la floculación aumenta por la incorporación de partículas de carbón. Los usos de la prueba RPR son similares a los de la prueba VDRL, sólo que la primera no puede utilizarse en LCR. La simplicidad de la prueba RPR ha llevado a que la mayoría de los laboratorios la adopte como prueba primaria de cribado (fig. 20-3). El procedimiento se describe en el protocolo 20-3.

La especificidad de las pruebas no treponémicas alcanza en promedio el 98%, con un rango de 93% a 99%. La falta de especificidad es un problema sobre todo cuando las pruebas se usan para el cribado en poblaciones con baja prevalencia de sífilis, en las que es probable que las reacciones positivas sean falsas. Las reacciones falsas positivas ocurren en los pacientes que tienen otras infecciones treponémicas, pero también en aquellos con enfermedades que producen anticuerpos anticardiolipina. Estos "falsos positivos" biológicos pueden ser transitorios, causados casi siempre por infecciones virales, o pueden ser persistentes, relacionados con enfermedades mediadas por mecanismos inmunitarios. Se han informado reacciones falsas positivas biológicas en drogadictos, una población con riesgo aumentado de contraer sífilis.¹³² Como ya se explicó, los pacientes con infección por HIV también tienen mayor frecuencia de resultados falsos positivos en las pruebas biológicas. En un estudio, estas reacciones positivas estaban asociadas con la infección por el virus de la hepatitis C. También se ha sugerido que un determinante importante de los resultados falsos positivos en las pruebas biológicas es el uso de drogas ilícitas por vía intravenosa.¹¹² Por consiguiente, una reacción positiva en una prueba no treponémica debe confirmarse con una prueba treponémica más específica. Sin embargo, cabe hacer notar que debe considerarse la posibilidad de obtener resultados falsos negativos con las pruebas treponémicas.

Se han introducido diversas variaciones en las pruebas no treponémicas, pero no han reemplazado a las pruebas tradicionales.

Pruebas treponémicas. Las pruebas treponémicas incorporan antígenos treponémicos específicos en el sistema. La prueba de referencia tradicional era la prueba de inmovilización de *T. pallidum* (TPI), en la que se inhibe la motilidad de treponemas vivos, virulentos, por la presencia de anticuerpos específicos. Esta prueba cara y engorrosa se ha reemplazado por la prueba

FTA-ABS. Luego se creó otra prueba específica para los antígenos treponémicos: la prueba de microhemaglutinación para *T. pallidum* (MHA-TP).

La prueba FTA-ABS se resume en el protocolo 20-4. La especificidad del ensayo se aumenta por la absorción del suero por probar con una espiroqueta no patógena: la cepa Reiter de *T. phagedenis*. La prueba FTA-ABS tiene mayor tasa de positividad en la sífilis temprana que las pruebas no treponémicas (véase cuadro 20-4). La tasa de positividad es cercana al 100% en el estadio secundario y persiste toda la vida. No es afectada por el tratamiento antitreponémico. Por consiguiente, la prueba FTA-ABS es buena para la detección sistemática de la sífilis tardía, pero no puede usarse para seguir el tratamiento. El grado de positividad de la prueba FTA-ABS no tiene ningún significado biológico, por lo que no se informa la intensidad de la fluorescencia y los sueros positivos no se titulan. La especificidad de la prueba FTA-ABS es alta. Con pocas excepciones, no tiene los resultados falsos positivos de las pruebas biológicas no treponémicas. El suero de algunos pacientes, sobre todo los que padecen lupus eritematoso sistémico u otras enfermedades del tejido conectivo, puede producir una reacción de tinción en cuentas de collar poco frecuente.¹⁴¹ Se ha calculado que el 1% de la población normal tiene una prueba FTA-ABS positiva. Existen reacciones cruzadas con otros treponemas patógenos. Si la prueba FTA-ABS se usa para el cribado en poblaciones con prevalencia muy baja de sífilis, las reacciones falsas positivas pueden ocurrir incluso con esta prueba tan específica.

Una variación de la prueba FTA-ABS es el procedimiento de doble tinción. Esta prueba es muy similar a la FTA-ABS, sólo que se usan anticuerpos IgG antitreponémicos conjugados con rodamina para localizar las espiroquetas. En la prueba FTA-ABS clásica, se usa la iluminación en campo oscuro para esta localización. Los resultados de los procedimientos tradicional y de doble tinción son comparables.²²⁰

La prueba FTA-ABS puede adaptarse para detectar anticuerpos IgG o IgM. Una ventaja de la detección de anticuerpos IgM es demostrar una infección in utero. Las inmunoglobulinas clase G atraviesan la placenta y entran en la circulación fetal, pero los anticuerpos IgM no atraviesan la placenta. Los anticuerpos IgM son producidos por el feto in utero; por consiguiente, la detección de anticuerpos IgM antitreponémicos específicos en un recién nacido indica la existencia de infección intrauterina.¹² Sin embargo, existen problemas potenciales con los análisis de IgM y debe tenerse mucho cuidado para validar una prueba determinada antes de usarla. Si en el suero fetal existen antiglobulinas, como el factor reumatoide o anticuerpos antiidiotipo, se obtendrán resultados falsos positivos. Si están presentes en cantidades excesivas, los anticuerpos IgG pueden bloquear los sitios antigénicos y dar resultados falsos positivos. Rosen y Richardson demostraron un buen rendimiento con un ensayo experimental, pero tuvieron dificultades cuando usaron reactivos comerciales.²²⁸

La prueba de microhemaglutinación, que usa antígenos específicos de *T. pallidum*, es mucho menos complicada y no requiere un microscopio de fluorescencia. El rendimiento es similar al del procedimiento de fluorescencia, pero es menos sensible en la sífilis temprana. La prueba FTA-ABS debe estar disponible para hacer pruebas en sueros que dan reacciones equívocas.²⁸⁵

INNOVACIONES: PRUEBAS PROVISIONALES Y EN FASE DE INVESTIGACIÓN

El desempeño insatisfactorio de la prueba FTA-ABS para IgM ha conducido a la investigación de otros métodos. La

prueba FTA-ABS para IgM 19S incluye el fraccionamiento del suero para obtener la especificidad de la IgM, en lugar de depender de los reactivos antiglobulina.²⁸³ Esta prueba parece evitar los problemas de inespecificidad, pero su falta de sensibilidad impide su uso como prueba de cribado. La evaluación secuencial con pruebas cuantitativas no treponémicas sigue siendo una parte importante de la evaluación de laboratorio de la sífilis congénita.

Se han ideado inmunoanálisis enzimáticos y de aglutinación de partículas para la detección de antígenos treponémicos específicos.^{67,75,104,212,235,245,306} Estas pruebas tienen sensibilidad y especificidad comparables con las de las pruebas de referencia, pero a menudo se presentan en formatos más fáciles de usar. A medida que aumente su uso, aumentará sin duda la facilidad para abandonar los métodos tradicionales.

Las técnicas moleculares modernas pueden ayudar en situaciones problemáticas. Sánchez y cols. usaron el Western blot (transferencia Western o inmunoelectrotransferencia; véase cap. 3) para identificar un antígeno de 47 kDa que no se encuentra en los pacientes control y se relaciona con la infección intrauterina.²³⁶ La sensibilidad de la inmunoelectrotransferencia para la detección de anticuerpos IgM en 14 recién nacidos sintomáticos fue del 92%, en tanto que el 83% de 12 recién nacidos asintomáticos que luego resultaron estar infectados fueron detectados por Western blot. Veintisiete de 30 (90%) niños no infectados fueron clasificados en forma correcta.¹⁷⁶ Dobson y cols.⁵⁹ demostraron reactividad contra antígenos proteicos de 47 y 37 kDa en el suero de niños con infección congénita. Aunque el factor reumatoide puede en teoría causar problemas en los ensayos de electroinmunotransferencia, su eliminación del suero no afecta los resultados. La inmunoelectrotransferencia también se ha usado con éxito como prueba confirmatoria para la sífilis.³⁹ Una ventaja de esta técnica es que el antígeno purificado puede usarse como sustrato y el patrón de reactividad de los sueros puede usarse para determinar la positividad. Sin embargo, si no se estandarizan los criterios para determinar la positividad de las pruebas de inmunoelectrotransferencia, las variaciones de interpretación entre laboratorios pueden causar problemas de diagnóstico. A medida que avanzan los conocimientos acerca de la naturaleza de los antígenos proteicos de *T. pallidum*,²⁷⁰ es indudable que aumentarán el número y la calidad de las pruebas en los próximos años.

Las técnicas moleculares también se han aplicado a la detección directa de espiroquetas en los tejidos y líquidos corporales. Los investigadores han centrado su atención en la infección intrauterina y del sistema nervioso central, porque las técnicas serológicas no son adecuadas para estos importantes problemas clínicos.^{100,193} Las sondas de DNA no han sido suficientemente sensibles, por lo que los esfuerzos se han enfocado en las técnicas de amplificación, como la reacción en cadena de la polimerasa.^{155,168} Aunque las nuevas técnicas son un agregado valioso al arsenal diagnóstico, la presencia de inhibidores en las muestras clínicas puede producir resultados falsos negativos de las pruebas, sobre todo en el LCR. El DNA treponémico en el líquido cefalorraquídeo parece ser estable, de modo que es probable que los resultados negativos no sean consecuencia del deterioro de los ácidos nucleicos en las muestras.²⁹⁶

En los protocolos de investigación hubo muy pocos resultados falsos positivos producidos por contaminación, pero en un estudio fue necesario solucionar los problemas de inespecificidad. Sin embargo, la estrecha correlación entre la reacción en cadena de la polimerasa y las pruebas muy poco prácticas de infecciosidad utilizadas en otros estudios con conejos sugieren

que aquel método permitirá en el futuro la solución de los problemas de diagnóstico difícil.

Borrelia

Las especies de *Borrelia* son bacterias helicoidales que miden 0,2 a 0,5 μm de diámetro y 3 a 20 μm de largo, con 3 a 10 espiras flojas y 15 a 29 flagelos periplásmicos (véase lámina en color 20-1C, D y F). Las especies cultivadas in vitro son microaerófilas (véase cuadro 20-3). Las bacterias son gramnegativas y se tiñen bien con la coloración de Giemsa.¹³⁴ Los patógenos humanos se transmiten por insectos vectores (véase cuadro 20-2). La fiebre recurrente transmitida por piojos es causada por *B. recurrentis*, la fiebre recurrente transmitida por garrapatas es causada por una variedad de especies, y la enfermedad de Lyme es causada por *B. burgdorferi* y especies relacionadas. Las borrelias también causan infección en los animales y algunas especies todavía no se han relacionado con ningún proceso patológico. Las relaciones entre las diversas especies han sido evaluadas por la caracterización de sus genes de la flagelina.⁹⁰

Fiebre recurrente

La fiebre recurrente es una enfermedad clínica característica, que es muy probable que ya haya sido reconocida por Herodoto en la antigua Grecia. Existen dos formas: 1) la enfermedad epidémica transmitida por piojos y 2) la enfermedad endémica transmitida por garrapatas. Las características epidemiológicas, ecológicas y clínicas se comparan en el cuadro 20-5. Hay varias revisiones, antiguas, pero todavía válidas.^{36,79,266}

EPIDEMIOLOGÍA

La fiebre recurrente transmitida por piojos es una enfermedad relacionada con la pobreza, el hacinamiento y la carencia de servicios sanitarios, como lo es el tifus transmitido por piojos. Se ha observado en África, Medio Oriente y Asia, pero no en el Nuevo Mundo. El piojo del cuerpo humano sólo parasita a los seres humanos y *B. recurrentis* no se transmite verticalmente a las generaciones siguientes de piojos. El microorganismo debe mantenerse por el pasaje del piojo a un huésped humano y después de nuevo a otro piojo. El piojo permanece

infectado toda su vida. La enfermedad epidémica ocurre por lo tanto sólo en condiciones de extrema miseria. En la primera mitad del último siglo las epidemias ocurrieron alrededor de cada 20 años. En épocas más recientes, Etiopía ha sido el único sitio geográfico de infección importante.

La fiebre recurrente transmitida por garrapatas tiene distribución mundial. Muchas garrapatas de cuerpo blando del género *Ornithodoros* son portadoras de borrelias que las diferencian. En los Estados Unidos, los taxónomos han intentado usar el mismo nombre para una garrapata y su espiroqueta asociada. Así, *O. hermsii* es el vector de *B. hermsii*. Las características epidemiológicas de la fiebre recurrente transmitida por garrapatas dependen de los hábitos del vector local. *O. hermsii* es el vector más frecuente y *B. hermsii* la borrelia más frecuente en California, el noroeste del Pacífico y Canadá.⁶⁶ *O. hermsii* vive en los restos de árboles muertos y parasita roedores, que a menudo la transportan a las cabañas de cazadores. *O. parkeri* habita en cuevas y madrigueras de ardillas y perros de la pradera en el este de los Estados Unidos. Es un patógeno poco frecuente de los seres humanos debido a la inaccesibilidad de su vector. *O. turicata* habita cuevas y madrigueras de animales en el oeste de los Estados Unidos, México y América del Sur, pero también se ha encontrado en asociación más cercana con los seres humanos, bajo los cimientos de casas en Texas. Las borrelias transmitidas por garrapatas tienen un nicho ecológico estables, casi sin ninguna posibilidad de erradicación. Las espiroquetas pueden pasarse de una generación de garrapatas a otra sin la intervención de un huésped vertebrado. Se ha informado que *O. turicata* sobrevive sin comer durante 5 años, y también se sabe que la supervivencia de las borrelias en las garrapatas, sin pérdida de infecciosidad, alcanza hasta 12 años.

La fiebre recurrente transmitida por garrapatas es fundamentalmente endémica y afecta a las infortunadas personas que se transforman en un huésped accidental. Sin embargo, en condiciones adecuadas, la enfermedad puede hacerse epidémica. En 1968 hubo un brote de fiebre recurrente transmitida por garrapatas en 42 escultistas y sus líderes que estaban acampando cerca de Spokane, Washington.²⁹⁰ La enfermedad clínica se desarrolló en 1 de las 42 personas en riesgo. En 9 casos pudo calcularse el período de incubación exacto, porque sólo estuvieron en riesgo durante una noche (promedio, 6,9 días; rango, 3 a 9). La tasa de ataque fue más alta entre los que durmieron en las cabañas abandonadas que entre los que lo hicieron en carpas, hecho también notado por Horton y Blaser en Colo-

Cuadro 20-5 Características de la fiebre recurrente

CARACTERÍSTICA	TRANSMITIDA POR PIOJOS	TRANSMITIDA POR GARRAPATAS
Epidemiología	Epidémica	Habitualmente endémica
Agente etiológico	<i>B. recurrentis</i>	Diversos: <i>B. hermsii</i> , <i>B. turicatae</i> , <i>B. parkeri</i> en EE.UU.
Vector	<i>Pediculus humanus</i> spp. <i>humanus</i>	Diversos; <i>Ornithodoros hermsii</i> , <i>O. turicatae</i> , <i>O. parkeri</i> en EE.UU.
Duración promedio del ataque primario	5,5 días	3,1 días
Duración promedio (rango) del intervalo asintomático	9,25 días (3–27)	6,8 días (1–63)
Número promedio (rango) de recidivas	3 (0–13)	1 (0–3+)
Duración promedio de la recidiva	1,9 días	2,5 días

Adaptado de la referencia²⁶⁶.

rado.¹¹⁸ Los autores señalaron el “resarcimiento” en la distribución de casos de la enfermedad, con más afectados entre los líderes y los exploradores más antiguos, que se reservaron las cabañas para ellos y dejaron a los exploradores más jóvenes “al raso.”

En zonas en las que no existen espiroquetas de la fiebre recurrente autóctonas, la importación de la enfermedad desde las regiones endémicas representa un desafío diagnóstico.⁵¹ La infección transmitida por garrapatas es más probable que la transmitida por piojos para los turistas que visitan África. Los parasitólogos deben tener presente esta posibilidad de diagnóstico cuando examinan frotis obtenidos para la detección de parásitos del paludismo.

ENFERMEDAD CLÍNICA

La presentación clínica de los dos tipos de fiebre recurrente es similar. Las diferencias en la frecuencia y en el momento de las recaídas se presentan en el cuadro 20-5. Las garrapatas del género *Ornithodoros* se alimentan en forma muy poco evidente de los seres humanos y durante períodos cortos. Por consiguiente, la mayoría de los pacientes no recuerda haber sufrido una picadura de garrapata. El comienzo típico de la enfermedad es abrupto, con fiebre alta, de alrededor de 40 °C, escalofríos intensos, delirio, intenso dolor muscular y dolor en los huesos y articulaciones. Puede haber hepatoesplenomegalia y dolor a la palpación y el paciente puede estar icterico. Las complicaciones neurológicas, como meningitis linfocítica y parálisis facial, se parecen a las de la infección por *B. burgdorferi*.⁴¹ Es característico que haya una crisis después de la cual la fiebre desaparece y el paciente se siente bien. La muerte es muy rara. Cuando hay recidivas, cada ciclo tiende a ser menos grave que el precedente. Puede presentarse una erupción cutánea durante el ataque inicial, pero no suele aparecer en las recidivas. Un brote de fiebre recurrente transmitida por piojos en tropas etíopes que se registró después de terminada la guerra civil proporcionó hace poco la desafortunada oportunidad de revisar las características clínicas.²⁹ La mortalidad fue del 3,6%, y el 1,8% de los pacientes tuvieron recrudescencia de la enfermedad.

Aunque la penicilina es eficaz contra las borrelias, las tetraciclinas o la eritromicina son más eficaces para eliminar las espiroquetas. Durante el tratamiento pueden ocurrir reacciones de Jarisch-Herxheimer (JH). En la reciente epidemia etíope de enfermedad transmitida por piojos, el 43% de los pacientes experimentaron esta complicación. El uso de penicilina en dosis bajas conduce a recidivas más frecuentes, pero con menos reacciones de JH que con tetraciclina o dosis más altas de penicilina.²⁵⁰ La administración de paracetamol e hidrocortisona modifica los cambios de los signos vitales observados durante la reacción de JH, pero no previenen el intenso escalofrío.³⁸ Existen aumentos transitorios del factor de necrosis tumoral y de las interleucinas 6 y 8 que se relacionan temporalmente con la reacción,¹⁹⁰ aunque no todos los investigadores han podido detectar las elevaciones de estas citocinas. El control del vector es también esencial para el control de la infección epidémica transmitida por piojos.²⁸⁶

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las borrelias de la fiebre recurrente pueden cultivarse en una modificación²⁰ del medio de Kelly para borrelias,¹³³ pero el aislamiento no es un medio práctico de diagnóstico en la mayoría de las situaciones. En forma similar, aunque se han creado

varias pruebas serológicas, no son útiles desde el punto de vista del diagnóstico. Alrededor del 5% de los pacientes tienen una prueba VDRL positiva.

El principal apoyo del diagnóstico es la demostración de las espiroquetas en los líquidos corporales, casi siempre en los frotis de sangre periférica (véase lámina en color 20-1C). El diagnóstico a menudo se hace en el laboratorio de hematología, porque la presentación clínica puede ser enigmática para los médicos no familiarizados con la enfermedad. Horton y Blaser¹¹⁸ informaron un caso en el que las espiroquetas fueron pasadas por alto por un escáner diferencial automatizado, pero fueron vistas por un técnico atento que revisó el frotis. A diferencia de otras espiroquetas, las borrelias de la fiebre recurrente se tiñen bien con los colorantes de anilina ácidos, como las tinciones de Wright o de Giemsa. Las borrelias son microorganismos delgados, ondulados o francamente espiralados, muy visibles cuando se encuentran entre los eritrocitos (véase lámina en color 20-1C). Felsenfeld⁷⁹ propone la tinción de Wright seguida de la aplicación de una solución de violeta de genciana al 1% durante 10 a 30 segundos.

Es probable encontrar borrelias en la sangre durante los episodios febriles. Se calcula que la sensibilidad de los frotis de sangre periférica teñidos es del 70%. Es improbable detectar las espiroquetas durante los intervalos afebriles entre los ataques, aunque todavía están presentes en el cuerpo. Deben hacerse extensiones “de gota gruesa” y frotis de gota fina como para el paludismo, porque en algunos casos las espiroquetas sólo se detectarán por el examen de los preparados de gota gruesa.

Goldschmid y Mahomed usaron una técnica de centrifugación de microhematocrito para concentrar las borrelias en la capa rica en leucocitos y sobre ella.⁹⁸ Este procedimiento no se ha usado ampliamente, pero ha sido comprobado en un estudio realizado en África Occidental, que incluyó el aislamiento de *B. crocidurae*.²⁹⁴ Sciutto y cols. usaron la técnica de fluorescencia con naranja de acridina para demostrar la presencia de borrelias en los frotis de sangre periférica (véase lámina en color 20-1D).²⁴⁹ El procedimiento de fluorescencia aumenta en gran medida la visibilidad de las espiroquetas.

Se describió un anticuerpo monoclonal para la identificación de *B. hensii* en los frotis de sangre periférica y técnicas de amplificación para la identificación del ácido nucleico de las borrelias, pero estos procedimientos no están al alcance de todos los laboratorios.²⁴⁸

Enfermedad de Lyme

En 1977, Steere y cols., de la Universidad de Yale, informaron que había ocurrido una epidemia de artritis en los residentes de varias comunidades de Connecticut circundantes, desde por lo menos 1972.²⁷⁸ La alarma fue dada por dos madres atentas. En 1975 una madre de Old Lyme, Connecticut, informó al Departamento de Salud Estatal sobre 12 casos de artritis en niños ocurridos en su pequeña comunidad de 5 000 personas. Una segunda mujer concurrió a la División de Reumatología de la Universidad de Yale con una historia de artritis aguda en ella, su marido, dos hijos y varios vecinos. La enfermedad se había diagnosticado en todos los niños como artritis reumatoide juvenil, diagnóstico clínico que depende de la exclusión de causas conocidas de artritis. Los investigadores de Yale creyeron que estaban tratando con una nueva enfermedad que denominaron artritis de Lyme.

Steere y cols. encontraron que la artritis casi siempre era precedida por una erupción cutánea muy característica, una pápu-

la eritematosa que evolucionaba a una lesión anular de extensión rápida. Muchos de los médicos que examinaron las lesiones cutáneas creyeron que una picadura de insecto había empujado el proceso, pero se reconoció un artrópodo (en ese caso una garrapata) en sólo un paciente. La naturaleza de la lesión primaria y la ocurrencia de casos en el verano y principios del otoño hicieron pensar en un artrópodo vector. En el trabajo publicado inicial los autores hacen notar el parecido de la erupción cutánea con una lesión llamada eritema crónico migratorio que se había descrito en Europa, sobre todo en los países escandinavos.

Las dos madres no imaginaron las grandes olas que produciría la piedra que arrojaron en su pequeña piscina de Connecticut. En lugar de descubrir una nueva enfermedad, habían hecho iniciar una investigación que descubriría la causa de una enfermedad de siglos de antigüedad de alcance mundial. La larga historia de las investigaciones europeas se resume en el recuadro 20-1.²⁷³ La enfermedad de Lyme se ha revisado por completo en los últimos años.^{256,274} Los sitios web pertinentes han sido resumidos por Sood.²⁶⁴

En 1982, sólo 5 años después de la descripción original de la artritis de Lyme, Burgdorfer y cols. determinaron su etiología al aislar una espiroqueta en la garrapata vector implicada, con lo que demostraron que las espiroquetas causaban las lesiones cutáneas en los conejos y que el suero de los pacientes con artritis de Lyme contenía anticuerpos contra la espiroqueta.³⁷ El año siguiente, Steere y cols. concluyeron el problema al aislar una espiroqueta en sangre, lesiones cutáneas o LCR de pacientes infectados, así como en garrapatas.²⁷⁶ Poco después se aislaron espiroquetas en las lesiones del eritema crónico migratorio y el síndrome de Bannwarth en Europa.^{7,214}

La espiroqueta recientemente aislada está relacionada con otras especies de *Borrelia*,²⁴³ pero no presenta casi ninguna homología con las especies de *Treponema* y *Leptospira*.¹²¹ Se ha denominado *Borrelia burgdorferi* en honor de Willy Burgdorfer que aisló el microorganismo por primera vez.¹²⁷ *B. burgdorferi* es la más larga y delgada de las borrelias. Actualmente se reconocen tres genopecies como patógenos humanos definidos dentro del complejo de *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi* sensu lato): *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelii*. Se ha demostrado la existencia de un número creciente de otras especies, algunas aún sin denominación, dentro del complejo de *B. burgdorferi* sensu lato;^{213,298} la magnitud de su asociación con la enfermedad humana no está todavía aclarada. La evidencia de

relación con la enfermedad humana es más fuerte para *B. bisettii* sp. nov. y para *B. valaisiana*. Además, una enfermedad humana parecida a la enfermedad de Lyme se ha asociado con una espiroqueta no cultivable, denominada *B. lonestari*, que se encuentra en la garrapata "estrella solitaria" (*lone star* en inglés, *Amblyomma americanum*).^{125,184} Esta especie puede ser responsable de muchos de los casos de enfermedad de Lyme encontrados en el sudeste de los Estados Unidos.

Se ha determinado la secuencia genética completa de *B. burgdorferi*.⁸⁷ Contiene numerosos antígenos que pueden ser importantes para la patogenicidad y el diagnóstico, incluso numerosas proteínas de superficie externa, las más importantes de las cuales son OspA y OspF, que se localizan sobre plásmidos, y una proteína flagelar de 41 kDa. *B. burgdorferi* sensu stricto tiene distribución mundial. Las otras dos especies patógenas se encuentran en Europa⁵⁷ y Asia.¹⁸⁹ *B. garinii* parece estar particularmente asociada con la neuroborreliosis, en tanto que *B. afzelii* se asocia con la artritis y las lesiones cutáneas crónicas.⁶⁰ Una significativa minoría de las garrapatas *I. ricinus* en Europa están infectadas con más de un miembro del complejo *B. burgdorferi*.²¹⁸ Las cepas encontradas en los Estados Unidos son relativamente homogéneas y cumplen la definición de *B. burgdorferi* sensu stricto. La homogeneidad inmunitaria de la mayoría de las cepas norteamericanas fue demostrada por el análisis de anticuerpos borrelícos in vitro.¹⁵⁸ Sin embargo, dentro de las cepas de *B. burgdorferi* sensu stricto, algunos investigadores han notado una variación mayor en las cepas de los Estados Unidos que en las de Europa.¹⁵³ Un hallazgo potencialmente importante para los estudios de homogeneidad genética es la demostración de una mayor variación de *B. burgdorferi* cuando se comparan productos de amplificación de las lesiones cutáneas con las espiroquetas aisladas en las mismas lesiones, lo que sugiere que las técnicas de cultivo actuales pueden seleccionar ciertos tipos genéticos.¹⁵⁶

Las proteínas A y C de la superficie externa son muy importantes en la biología de la enfermedad de Lyme. OspA se expresa sobre todo en el intestino medio de las garrapatas, donde es responsable de la adherencia al epitelio.²⁰² Después de que la garrapata ingiere la sangre, las espiroquetas migran a través del hemocele hasta las glándulas salivales. En el proceso, la expresión de OspA se regula negativamente y la cantidad de OspC producida aumenta en forma notable.²¹⁷ Aunque se produce una respuesta inmunitaria mediada por células y humoral contra múltiples antígenos, la respuesta de anticuerpos temprana predominante está dirigida contra OspC. También parece que OspC es un determinante importante de la enfermedad clínica; ciertas variantes se asocian con la infección diseminada, otras con la enfermedad limitada o localizada y otras más sólo se encuentran en las garrapatas.²⁵² Lin y cols.¹⁵³ han sugerido que los aislamientos predominantes de *B. burgdorferi* sensu stricto encontrados en el sudeste de los Estados Unidos contienen variantes de OspC que no están asociadas con la enfermedad invasora, lo que tal vez explica, por lo menos en parte, la escasez relativa de casos bien documentados de enfermedad de Lyme clásica en esta región.

El estudio retrospectivo de garrapatas *Ixodes ricinus* conservadas en museos húngaros y austríacos desde 1884 y 1888, respectivamente, demostró la presencia de DNA de un miembro del complejo *B. burgdorferi*.¹⁷² Asimismo, las secuencias de OspA de *B. burgdorferi* fueron demostradas por técnicas moleculares en ratones de patas blancas capturados en Massachusetts en 1894.¹⁷⁰ Por consiguiente, parece que los focos americano y europeo estuvieron presentes en forma independiente durante por lo menos cien años.

Recuadro 20-1 Investigaciones europeas sobre la enfermedad de Lyme

1921-1923	Afzelius en Suecia y Lipschitz en Austria describen el eritema crónico migratorio. Más tarde, la lesión cutánea atrófica crónica descrita por Herxheimer en 1902 se reconoció como parte del mismo proceso.
1944	Bannwarth describió una radiculitis crónica, a veces precedida por eritema, acompañada por meningitis linfocitaria crónica y neuritis craneana o periférica. Luego la enfermedad se asoció con las garrapatas.
1948	Lennhoff describió la presencia de espiroquetas en la lesión del eritema crónico migratorio.
1951	Hollstrom describió el tratamiento exitoso del eritema crónico migratorio con penicilina.

EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Lyme es la infección actual transmitida por artrópodos más frecuente en los Estados Unidos (fig. 20-4). De 1982 a 1989 hubo un aumento de 18 veces en los casos informados a los CDC. De 1986 a 1989 el número de casos se duplicó por año después de que la incidencia parecía haber alcanzado una meseta. Sin embargo, en 1994 se informaron 13 083 casos provenientes de 44 estados, un aumento del 58% con respecto a 1993 (fig. 20-4). Se han informado casos en casi todos los estados, pero se concentran en el noreste, la región central norte y, en menor grado, en la Costa oeste (fig. 20-5). La infección se encuentra en todo el hemisferio norte, incluso en las repúblicas soviéticas.⁵⁶

En los Estados Unidos, la distribución de la enfermedad de Lyme coincide con la de las garrapatas del género *Ixodes*. En las regiones del noreste²⁷⁷ y central del norte⁹⁷ el vector suele ser *I. scapularis* (véase lámina en color 20-1E), en tanto que *I. pacificus* es la portadora de las espiroquetas en el noroeste.²⁴¹ En Europa, *I. ricinus* es el vector más frecuente, en tanto que *I. persulcatus* es el huésped artrópodo principal en Asia. Estas especies comparten muchas características y también se conocen como garrapatas de patas negras o del ciervo. Ha habido controversias acerca de la nomenclatura de las garrapatas de patas negras encontradas en el este de los Estados Unidos. La mayoría de los investigadores consideran en este momento que *I. dammini* es sinónimo de *I. scapularis*.^{200,267}

Se ha informado una enfermedad clínica parecida a la artritis de Lyme en Australia.⁸⁹ Ni el vector ni el agente infeccioso responsable se han identificado todavía, a pesar de las numerosas pruebas realizadas en garrapatas por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa.²³²

La frecuencia de infección de las garrapatas en algunas zonas alcanza el 75%,¹³ y el rango de carga de espiroquetas en garrapatas adultas capturadas en varias zonas endémicas varía de 950 a 4 350 espiroquetas por garrapata en un estudio.³⁵

Babesia microti y *Ehrlichia* de granulocitos humanos recientemente reconocida, *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*, también son transmitidas por la garrapata del ciervo del este y tienen una distribución geográfica que coincide con la de *I.*

scapularis. El ciclo de *B. burgdorferi*¹⁵¹ y de *Babesia microti*²⁶⁹ en la naturaleza se mantiene por varios roedores pequeños, notablemente el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) que mantiene una parasitemia o espiroquetemia asintomática. Otros mamíferos pequeños, como la rata de Noruega de la Isla de Monhegan en Maine, también pueden servir como reservorios.²⁶⁰ Los ciervos de cola blanca son importantes para la supervivencia de la garrapata. Aunque no intervienen de modo directo en la transmisión de la infección, la reducción de las poblaciones de ciervos disminuye el número de garrapatas vectoras, después de lo cual la incidencia de la infección disminuye.⁵⁵ No es sorprendente que se haya demostrado la infección con diversas combinaciones de *Babesia microti*, *A. phagocytophila* y *B. burgdorferi* en un mismo paciente.¹⁸⁰ Aunque al hablar de garrapatas, ratones y ciervos se evocan imágenes campestres, o por lo menos de los suburbios, se han encontrado todos los componentes necesarios, incluso los agentes infecciosos, en el Van Cortlandt Park de la ciudad de Nueva York.⁵⁴

La importancia de los factores medioambientales para el desarrollo de la enfermedad humana es ilustrada por la variación geográfica en la frecuencia de la enfermedad de Lyme clínica. Lo más notable es que existe un ciclo enzoótico de infección por *B. burgdorferi* entre la garrapata *I. spinipalpus* y la rata arborícola del norte de Colorado, una zona en la que no se ha registrado la enfermedad de Lyme.¹⁷⁴ La falta de contacto entre los seres humanos y esta especie de garrapatas parece la explicación más probable de la ausencia de infección humana. Aunque la enfermedad clínica se encuentra en el noroeste del Pacífico, donde el vector es *I. pacificus*, es mucho menos frecuente que en los estados centrales del norte y el noreste. Una posible explicación es cuál es el huésped animal pertinente. En los estados del centro y del este, el ratón de patas blancas permite una gran proliferación de espiroquetas y proporciona abundante material para un nuevo estadio de garrapatas hambrientas. En los estados del Pacífico, en cambio, las garrapatas se alimentan con sangre de lagartos, en los que las borrelias se multiplican poco, lo que limita la intensidad de la infección en las poblaciones de garrapatas.^{34,171} Un producto químico borrelícidico no identificado que producen los lagartos puede ser la

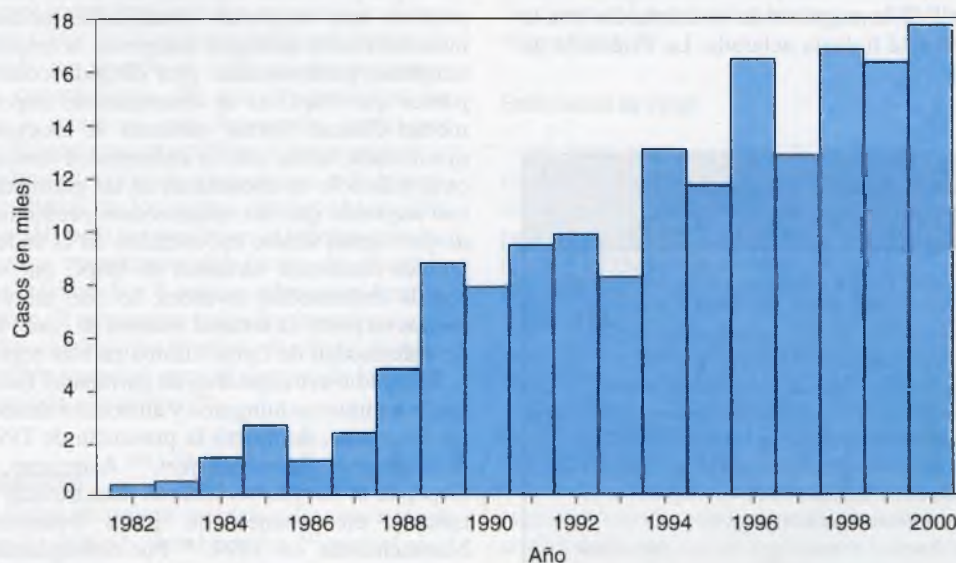


Figura 20-4 Número casos de enfermedad de Lyme informados por año en los Estados Unidos, 1982–2000. (Adaptado de la referencia⁵).

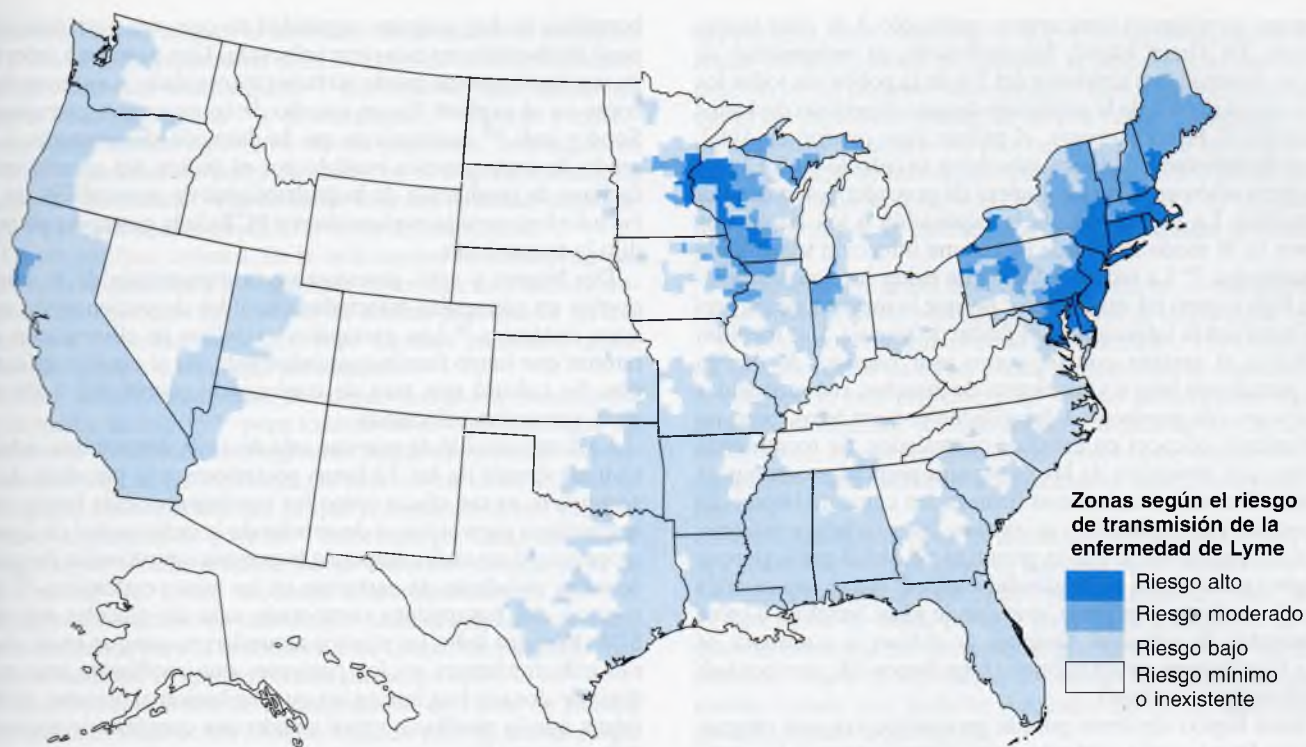


Figura 20-5 Representación geográfica del riesgo de contraer enfermedad de Lyme en los Estados Unidos, compilado por los CDC. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/riskmap.htm>

explicación biológica de este fenómeno. Se ha visto que *I. scapularis* en los estados del sudeste también se alimentan preferentemente con sangre de lagartos, en lugar de ratones, lo que quizá contribuye a la poca frecuencia de enfermedad de Lyme clásica en esta región.

El ciclo vital de las garrapatas ixodídeas comprende tres estadios bien definidos, con una vida de 2 años de duración. Las garrapatas se alimentan a fines del verano como larvas y el año siguiente como ninfas (principio de la primavera) y adultos (fin del verano). Es necesario que ingieran sangre para la muda de larva a ninfa y de ninfa a adulto, así como para la postura de huevos en la hembra adulta. Los estadios de larva y ninfa son tan pequeños que muchos pacientes no recuerdan haber sido picados. Sin embargo, para poder transmitir la infección, una garrapata tiene que haberse alimentado con la sangre de un roedor infectado. *B. burgdorferi* no se transmite verticalmente de los padres a la descendencia, por lo que los estadios larvales de las garrapatas nunca están infectados y no pueden transmitir la infección. El estadio de la garrapata más eficaz para la transmisión es la ninfa, que es prevalente durante el fin de la primavera y principios del verano, cuando se registra la mayoría de los casos de enfermedad humana. Una de las razones que explica la eficacia de la transmisión de las ninfas es sin duda su tamaño pequeño, que les permite pasar inadvertidas durante más tiempo que las garrapatas adultas. El macho adulto tiene el potencial para transmitir la infección, pero rara vez se alimenta con sangre humana, porque no necesita ingerir sangre como la hembra adulta antes de poner sus huevos.

Según datos experimentales, las garrapatas deben permanecer prendidas durante por lo menos 24 horas para transmitir las espiroquetas con eficacia.²⁰⁷ Durante las primeras 12 horas después de la picadura, el cuerpo de la garrapata permanece plano.

Tras alimentarse durante 24 horas, cuando alrededor del 5% de las garrapatas infectadas transmiten espiroquetas, el cuerpo posterior de la ninfa empieza a expandirse. Después de 48 horas de alimentarse, la parte posterior del cuerpo se dilata por completo y parece opalescente; en este momento, cerca del 50% de las garrapatas infectadas transmiten *Borrelia*. Después de 4 días de alimentarse, casi todas las garrapatas infectadas transmitirán espiroquetas, momento en el que las garrapatas están opacas y tan hinchadas que el cuerpo es tan grueso como ancho.¹⁷³ Los intentos para cultivar espiroquetas de la piel inmediatamente después de desprender una garrapata infectada, realizados en una zona hiperendémica, tuvo éxito en sólo 2 de 48 pacientes en los que la garrapata había estado prendida durante unas 24 horas.²⁵

La valoración del grado de ingurgitación de una garrapata es siempre subjetiva. Se ha propuesto un método para hacer más objetiva esta determinación, denominado “índice del escudo” (véase cap. 22).^{74,197,265} Este índice se basa en que el cuerpo de una ninfa o una hembra adulta se hinchará a medida que ingiere sangre, pero el escudo rígido no se modificará. Por consiguiente, la relación de tamaños entre el escudo y el cuerpo es una indicación aproximada del grado de ingurgitación. El requisito de que debe haber una alimentación prolongada para que ocurra la transmisión se debe a varios factores: las espiroquetas deben pasar del intestino medio al hemocele, de allí a las glándulas salivales y regular en forma negativa la producción de OspA y en forma positiva, la producción de OspC.

Estudios epidemiológicos cuidadosos realizados en varias zonas endémicas han demostrado la magnitud del problema. En Fire Island, Nueva York, el 0,7-1,2% de los residentes veraniegos sufrieron enfermedad sintomática.¹⁰⁷ Cuatro (3,1%) de 129 personas estudiadas serológicamente al principio y el fin

del verano produjeron anticuerpos, pero sólo 2 de ellas tenían síntomas. En Great Island, Massachusetts, la enfermedad de Lyme se desarrolló en alrededor del 3% de la población todos los años y afectó al 16% de la población durante el período de 4 años del estudio.²⁸² Históricamente, el primer caso ocurrió en 1962. La tasa de enfermedad clínica:subclínica se calculó en 1:1.

La prevención es la mejor manera de proceder con cualquier enfermedad. La prevención de la exposición a los artrópodos vectores es el modo lógico de evitar una infección transmitida por garrapatas.²⁰⁹ La recomendación de evitar las zonas arboladas es lógica, pero tal vez ineficaz, porque la mayoría de las personas contraen la infección en el jardín de su casa. Las medidas que indica el sentido común, como usar camisas de manga larga, pantalones largos y repelentes de insectos, son razonables (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/prevent.htm>), pero no han resultado eficaces en estudios controlados. Se recomienda la extracción inmediata de las garrapatas prendidas con pinzas de punta fina; deben asirse con firmeza tan cerca de la piel del huésped como sea posible y se extraen con cuidado e intactas, pero si el aparato bucal queda prendido no es tan grave porque las espiroquetas están en la glándula salival. No se recomienda el uso de un fósforo caliente, esmalte de uñas, vaselina u otros instrumentos de agresión. Después de extraer la garrapata, se limpia la zona con un antiséptico (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/prevent.htm>).

El paso lógico siguiente para la prevención era una vacuna. Se eligió OspA como antígeno inmunizante, porque los anticuerpos borrelícos que se producirían podrían matar las espiroquetas en la glándula salival de la garrapata o en el sitio de la picadura antes de que se diseminara la infección. Dos estudios controlados demostraron una eficacia del 49-68% en el primer año después de dos dosis de vacuna. Al segundo año, después de una tercera inyección, la eficacia fue del 76-92%.^{258,280} Lamentablemente, se hizo evidente que era necesaria una inyección de refuerzo a intervalos regulares para mantener la eficacia. Un panel de revisión nacional recomendó limitar el uso de la vacuna a los individuos de entre 15 y 70 años que estuvieran expuestos en zonas de riesgo alto o moderado durante períodos considerables.³ Aunque los efectos secundarios de la vacuna parecían mínimos en los informes originales, comenzaron a acumularse informes anecdóticos de varios problemas y la preocupación creció. El fabricante anunció en febrero de 2002 que suspendería la fabricación de la vacuna. Quizá sea un reflejo de nuestra sociedad el hecho de que una búsqueda en Internet de referencias sobre la vacuna para la enfermedad de Lyme conduzca predominantemente a sitios webs de abogados especializados en lesiones personales.

La profilaxis con antibióticos después de una picadura de garrapata sigue siendo motivo de controversias. Magid y cols., que intentaron cuantificar el análisis, recomendaron que los pacientes no se traten si el riesgo de desarrollar enfermedad de Lyme es de menos de 0,01.¹⁶² Los factores como el contacto prolongado con una garrapata en proceso de alimentación en una región endémica aumentarían la probabilidad de transmisión. Si se cuenta con la garrapata para el examen y no es una especie de *Ixodes*, o si la enfermedad de Lyme no es endémica en la zona, está claro que la profilaxis no está indicada. La detección de *B. burgdorferi* por cultivo o por métodos moleculares proporciona un posible método para tomar una decisión racional sobre la profilaxis. Sin embargo, pueden plantearse argumentos de peso contra este curso de acción. La evaluación de la garrapata en forma lo suficientemente rápida como para permitir tomar una decisión clínica sobre el tratamiento es difícil en la mayoría de las zonas. Si la garrapata no contiene

borrelias, no hay ninguna seguridad de que otra garrapata que pasó inadvertida no estuviera infectada. Una garrapata infectada con espiroquetas puede no haber transmitido la enfermedad, como ya se explicó. En un estudio de contacto con garrapatas, Sood y cols.²⁶⁵ encontraron que la duración del contacto y el grado de ingurgitación medido por el índice del escudo eran factores de predicción de la probabilidad de transmisión de *B. burgdorferi*, pero la evaluación por PCR de la garrapata no predijo la transmisión.

Des Vignes y cols. investigaron la transmisión de *B. burgdorferi* en garrapatas infectadas extraídas de pacientes en una zona endémica.⁵⁸ Las garrapatas extraídas se alimentaron en ratones que luego fueron evaluados para ver si estaban infectados. Se calculó una tasa de transmisión global del 4,6% de estas garrapatas infectadas.

La demostración de que una sola dosis de doxaciclina, administrada dentro de las 72 horas posteriores a la picadura de *I. scapularis*, es tan eficaz como los tratamientos más largos con antibióticos para evitar el desarrollo de la enfermedad de Lyme proporcionó un nuevo ímpetu a la prevención rutinaria después de sufrir picaduras de garrapata en las zonas endémicas.¹⁸⁸ La eficacia del tratamiento comparado con un placebo fue del 87%. Por otro lado, los efectos secundarios, aunque leves, fueron más frecuentes en los pacientes que recibieron una sola dosis de doxaciclina que en los que recibieron el placebo, de tal forma que la profilaxis sigue siendo una cuestión de apreciación personal.²⁵⁵

ENFERMEDAD CLÍNICA

Las manifestaciones clínicas de la infección con *B. burgdorferi* son proteiformes. Esta espiroqueta ha sido denominada el “último gran imitador”,²⁷² después de su pariente *T. pallidum*. Como sucede en el caso de la sífilis, las manifestaciones de la enfermedad de Lyme pueden catalogarse en tres estadios, que se describen a continuación.

El estadio uno es en el que la picadura de la garrapata produce la lesión clásica, el eritema (crónico) migratorio. La lesión cutánea eritematosa expansiva se presenta en localizaciones anatómicas múltiples y con extensión variable.²⁴ En Nueva Jersey, el eritema migratorio se observó en el 93% de los pacientes y alrededor de la mitad tenían síntomas sistémicos, incluso linfadenopatías.³¹ Asimismo, el 90% de los niños infectados en Connecticut tenían la erupción cutánea.⁹⁵ Se ha destacado la presencia de edema periférico con curación central de la lesión, pero el enrojecimiento homogéneo o central fue más característico en una serie grande de casos microbiológicamente confirmados.²⁶¹ La curación central fue más frecuente en pacientes eslovenos infectados por *B. afzelii* que en neoyorquinos infectados por *B. burgdorferi* sensu stricto.²⁸⁴ La espiroqueta se cultiva con mayor facilidad en este estadio de la infección y puede visualizarse en hasta el 40% de las muestras de biopsia por técnicas de impregnación argéntica.

El segundo estadio de la enfermedad de Lyme es el resultado de la diseminación de las espiroquetas por todo el organismo.²⁷⁵ La reacción en cadena de la polimerasa fue alrededor de tres veces más sensible para detectar espiroquetemia que el cultivo. Se demostró la presencia de DNA de *Borrelia* en el suero de 14 de 76 pacientes (18,4%) con eritema migratorio. La cantidad de síntomas clínicos fue el factor de predicción independiente más preciso de espiroquetemia.⁹⁹ Parece que la espiroquetemia es de bajo nivel e intermitente.²⁹⁷ El examen del LCR de pacientes con eritema migratorio crónico mostró DNA de *Borrelia* en 8 de 12 pacientes, 4 de los cuales no tenían ningun-

na anomalía neurológica ni síntomas. Se demostró la presencia de DNA de espiroquetas en el LCR extraído de 4 de 9 pacientes con síntomas neurológicos.¹⁵⁹ Las lesiones más frecuentes fueron la artritis aguda²⁷⁹ y la meningitis.²⁰¹ Bowen y cols.³¹ encontraron artritis en el 26% de sus pacientes, meningitis en el 10% y parálisis de pares craneales en el 8%. La meningitis puede ser purulenta.³⁰ Puede haber lesiones cutáneas secundarias, infección ocular, hepatitis y daño del miocardio.

La tercera fase, crónica, de la enfermedad se caracteriza por las lesiones cutáneas y los síntomas neurológicos y artritis crónicos. Los episodios recurrentes de artritis disminuyen en frecuencia y gravedad cada año, pero algunos pacientes tienen sinovitis crónica e invalidez permanente.

Como sucede en la sífilis, *B. burgdorferi* puede transmitirse de la madre al feto,^{240,301} pero todavía no se conocen todos los efectos de la infección congénita. Se ha demostrado experimentalmente que las espiroquetas sobreviven hasta 45 días en eritrocitos almacenados, por lo que la transmisión por transfusiones sanguíneas es posible.¹⁷ Sin embargo, hasta ahora ese riesgo sigue siendo teórico. No se encontró ningún caso de enfermedad de Lyme asociada con transfusiones en 149 pacientes que recibieron más de 600 unidades de sangre en una zona endémica para la enfermedad de Lyme. Un paciente contrajo babesiosis, lo que representa un riesgo del 0,17%.⁹⁶

Las manifestaciones de la enfermedad de Lyme en Europa son similares a las de los Estados Unidos, pero la artritis puede ser algo menos frecuente y la meningitis crónica algo más frecuente, debido quizás a la presencia de la especie neurotrópica, *B. garinii*, en Europa. A la inversa, la diseminación amplia de la infección parece ser más frecuente en los Estados Unidos que en Europa. Como ya se explicó, se han notado diferencias clínicas entre los pacientes infectados en Nueva York por *B. burgdorferi* sensu stricto y los pacientes eslovacos infectados por *B. afzelii*.

El tratamiento antimicrobiano inmediato en los estadios iniciales de la enfermedad de Lyme es casi siempre eficaz para controlar los síntomas y evitar la progresión de la enfermedad. La Infectious Diseases Society of America ha publicado pautas de práctica.³⁰⁴ No se sabe con tanta certeza si el tratamiento antimicrobiano es útil en los estadios más tardíos de la enfermedad.¹³⁷

Aunque en apariencia son raros, hay ejemplos bien comprobados de reinfección con una nueva cepa de *B. burgdorferi* (determinada por análisis molecular de aislamientos secuenciales) en pacientes que han sido tratados por un eritema migratorio.¹⁹⁵ No está aclarado si las reinfecciones ocurren después de una enfermedad natural no tratada.

Aparentemente, los animales silvestres no tienen infección sintomática, pero los animales domésticos pueden sufrir la enfermedad. Kornblatt y cols. describieron la artritis de Lyme en perros.¹⁴⁰ Duray detalló la anatomía patológica quirúrgica de la enfermedad de Lyme.⁶⁵

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La enfermedad de Lyme puede diagnosticarse por cultivo de las espiroquetas, por demostración de la presencia de espiroquetas en los tejidos mediante técnicas inmunológicas o moleculares, o por la detección de una respuesta serológica. Las recomendaciones sobre métodos de diagnóstico que proporcionó un grupo de consenso 1997^{1,292} no han cambiado de manera apreciable. Se recomienda efectuar las pruebas sólo cuando la probabilidad de enfermedad de Lyme antes de hacer las pruebas, de acuerdo con los síntomas clínicos y antecedentes de

exposición, varíe entre 0,2 y 0,8. Por supuesto, el problema reside en la dificultad de calcular la probabilidad previa a las pruebas en un paciente determinado. Los síntomas indefinidos, como la fatiga o las artralgias, no son razones suficientes en sí mismas para comenzar las pruebas. La eficacia comparativa de varias técnicas de laboratorio para el diagnóstico de 47 pacientes con eritema se resume en el recuadro 20-2. El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Lyme ha sido revisado por Reed.²¹⁹

Aunque la lesión del eritema migratorio no es patognomónica, se observa en un porcentaje muy alto de infecciones agudas y se encuentra en algunas otras enfermedades. Por consiguiente, la enfermedad de Lyme puede diagnosticarse con confianza si esta lesión está presente y tal vez no es necesario efectuar pruebas adicionales. Incluso después de más de dos décadas de experiencia, el uso inadecuado de pruebas de diagnóstico y el tratamiento antimicrobiano innecesario siguen causando problemas.^{83,186,215}

Cultivo. *B. burgdorferi* se ha aislado en medios acelulares (véase cuadro 20-3). El proceso es bastante fácil cuando se trituran y cultivan garrapatas infectadas (véase lámina en color 20-1E). El subcultivo de caldo en agar produce la formación de colonias de espiroquetas de morfología variable.¹⁴² El medio de elección es una modificación del medio de Kelly para espiroquetas, creado por Barbour (recuadro 20-3). Se han sugerido modificaciones a ese medio.²¹⁰

El cultivo es muy eficaz en la enfermedad de Lyme temprana y rara vez positivo en los estadios más tardíos. Sin embargo, incluso en el estadio primario sólo se aislaron espiroquetas en las lesiones cutáneas en el 51% y en sangre en el 45% de 47 pacientes adultos con diagnóstico clínico de enfermedad de Lyme.¹⁹⁴ El rendimiento del cultivo parece ser mayor cuando las lesiones son grandes y múltiples, como en la fase secundaria diseminada de la enfermedad.¹⁸¹ Debe cultivarse sangre citratada. Los tubos se incuban a una temperatura de entre 34 °C y 37 °C en la oscuridad. Se examinan en microscopio de campo oscuro después de una incubación de 2 a 3 semanas. La identidad de cualquier microorganismo espiralado detectado debe confirmarse por inmunofluorescencia con reactivos específicos.

Detección morfológica. La visualización de espiroquetas en los tejidos por métodos morfológicos también carece de sensibilidad en la mayoría de las muestras y estadios de la enfermedad. Puede usarse cualquiera de los métodos de impregnación

Recuadro 20-2 Investigación de laboratorio de 47 pacientes adultos con eritema migratorio

Procedimiento de laboratorio	Rendimiento diagnóstico (%)
PCR cuantitativa de biopsia cutánea	80,9
Pruebas serológicas en dos etapas de muestras de suero de convaleciente	66
PCR "anidada" (<i>nested</i>) convencional	63,8
Cultivo de piel	51,1
Hemocultivo	44,7
Pruebas serológicas en muestras agudas	40,4

Adaptado de la referencia¹⁹⁴.

Recuadro 20-3 Medio de Barbour-Stoenner-Kelly para el cultivo de *Borrelia burgdorferi* (medio BSK II)

1. Lavar todo el material de vidrio con detergente, enjuagar cuidadosamente con agua destilada en vidrio y esterilizar en autoclave.
2. A 900 mL de agua destilada en vidrio agregar 100 mL de concentrado 10× del medio CMRL 1066 sin glutamina.
3. Agregar al medio CMRL 1066 en el orden siguiente:
5 g de neopeptona (Difco Laboratories, Detroit MI)
60 g de albúmina sérica bovina, fracción V (Miles Laboratories, Elkhart IN N° 81-003)
2 g de Yeastolate (Difco)
6 g de ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazina-*N*-2-etanesulfónico (HEPES: Sigma Chemical Co., St. Louis MO)
5 g de glucosa
0.7 g de citrato de sodio
0.8 g de piruvato de sodio
0.4 g de *N*-acetilglucosamina (Sigma)
2.2 g de bicarbonato de sodio
4. Ajustar el pH del medio, a 20 a 25 °C, a 7.6 con NaOH 1 N.
5. Agregar 200 mL de gelatina al 7% (Difco) disuelta previamente en agua hirviendo.
6. Esterilizar por filtración con presión de aire (filtros de nitrocelulosa de 0.2 µm, Millipore Corp., Bedford MA). Almacenar el medio a 4 °C.
7. Antes de usar, agregar suero de conejo no calentado ("con trazas de hemólisis", Pel-Freez Biologicals, Inc., Rogers AR) hasta una concentración final del 6%.
8. Fraccionar en tubos o frascos de vidrio o poliestireno. Llenar los recipientes hasta el 50 a 90% de su capacidad y cerrarlos herméticamente.

De la referencia²⁰.

argéntica para la demostración de espiroquetas en los tejidos (Warthin-Starry, Steiner, Dieterle) para teñir los microorganismos, pero la identificación específica debe confirmarse con antiseros, porque las tinciones argénticas detectan cualquier tipo de bacteria.

Detección molecular. Las técnicas de amplificación han demostrado tener mayor sensibilidad que el cultivo o la detección morfológica en las lesiones cutáneas de eritema migratorio,¹⁵⁷ en sangre periférica y en líquido articular.²⁰⁶ Los resultados de la detección molecular en LCR y orina han sido desalentadores.⁶² La sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es menor en LCR que en orina de los pacientes con enfermedad neurológica sintomática.¹⁴⁷ Bergmann y cols. han formulado recomendaciones para aumentar el rendimiento de la PCR en orina.²⁶ Las pruebas de PCR en tiempo real han sido validadas en diversos materiales clínicos.^{106,247}

Schmidt efectuó una revisión extensa de los métodos de amplificación molecular para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.²⁴⁴ Las técnicas moleculares tienen cierta importancia para demostrar una infección aguda o para resolver casos difíciles, pero las pruebas de amplificación completamente validadas no están disponibles en la mayoría de los laboratorios. Las pruebas de amplificación tienden a tener resultados falsos positivos por la contaminación cruzada o por la presencia de secuencias de ácido nucleico compartidas con otros microorganismos. Se ha registrado una PCR positiva falsa para *B. burgdorferi* en un laboratorio privado.¹⁸³ Las pruebas de amplificación no tienen valor agregado significativo para el diagnóstico

de enfermedad de Lyme temprana, pero pueden ser de gran ayuda en los estadios más tardíos de la infección, sobre todo para el diagnóstico de neuroborreliosis. La detección de DNA de *Borrelia* en LCR puede ser muy útil, debido a la dificultad de interpretación de los anticuerpos presentes en el sistema nervioso central. Sin embargo, la especificidad de las pruebas moleculares puede aumentarse evaluando primero si el paciente posee anticuerpos IgG, que deben estar casi siempre presentes en el suero en ese estadio de la infección.

Se ha creado un equipo comercial para la detección de antígeno de la espiroqueta en la orina, pero ha recibido serias críticas.¹³⁸

Detección serológica. El método de elección de diagnóstico pre-determinado es el análisis serológico. Los CDC recomiendan un procedimiento de dos pasos para el diagnóstico. Debe usarse como prueba inicial un enzimoimmunoanálisis o una prueba de inmunofluorescencia con sensibilidad alta. Los sueros negativos no necesitan estudiarse más, pero debe obtenerse suero durante la convalecencia si está clínicamente indicado. Los resultados positivos deben confirmarse con electroinmuno-transferencia de IgM e IgG.⁴⁶

Las pruebas de inmunofluorescencia y los enzimoimmunoanálisis son los usados con mayor frecuencia. Se ha recomendado la inmunofluorescencia indirecta,¹⁶⁵ el immunoanálisis de fluorescencia cuantitativo²⁰⁴ y un fluoroinmunoanálisis,¹¹¹ pero muchos investigadores encontraron que el enzimoimmunoanálisis es más satisfactorio.^{52,231} Los anticuerpos pueden estar ausentes al principio de la infección, pero casi siempre se detectan después de varias semanas. La respuesta contra OspA tiende a ser tardía, pero puede detectarse en títulos bajos o complejoado a espiroquetas al comienzo de la infección si se usan técnicas especiales.²⁴⁶ La respuesta a la proteína OspC o al antígeno menos específico de la flagelina es más frecuente en sueros tempranos.¹⁶⁴ Para obtener la sensibilidad máxima en la enfermedad de Lyme temprana, se ha recomendado el uso de un ensayo de IgM, ya sea por inmunofluorescencia¹⁷⁹ o técnicas de inmunoelectrotransferencia.⁹ Los títulos de IgM específica pueden permanecer elevados durante toda la enfermedad e incluso años después del tratamiento, por lo que la presencia de IgM no puede usarse para establecer una infección aguda.¹³⁰ Se ha recomendado la obtención de una segunda muestra 8 a 14 días después de la primera, para demostrar la seroconversión en la enfermedad de Lyme temprana. Si sólo se detecta IgM un mes o más después de la infección, es probable que el resultado de la IgM sea falso positivo.

Para el diagnóstico de neuroborreliosis se ha usado el examen de líquido cefalorraquídeo en busca de anticuerpos producidos intratecalmente. La presencia de títulos más altos de anticuerpos en LCR que en sangre periférica demuestra en teoría la infección del sistema nervioso.³⁰⁷ En vista de las numerosas dificultades con el análisis serológico en sangre periférica, estos enfoques deben reservarse para laboratorios de referencia experimentados que hayan demostrado la eficacia de las pruebas que realizan.

La mayoría de los ensayos disponibles en este momento usan espiroquetas enteras sonicadas y los reactivos no están estandarizados. Como resultado, hubo problemas serios de reproducibilidad y exactitud, lo que aumenta las dificultades del diagnóstico clínico. En un programa de control de calidad, el 21% de los participantes pasaron por alto la presencia de anticuerpos en títulos de 512 o más.¹⁸ Con concentraciones más bajas de anticuerpos, el 55% de los participantes no pudieron reconocer el suero como positivo. A la inversa, la tasa de falsos positivos alcanzó el 7% con un conjugado polivalente y llegó al

27% con un conjugado de IgG. La reproducibilidad de los resultados cuando el mismo suero se envió como suero problema en diferentes momentos también fue deficiente. El hecho de que estos problemas de rendimiento de las pruebas existe en el mundo real fue puesto en evidencia por el informe de un centro de referencia para la enfermedad de Lyme: el 45% de los pacientes que habían sido enviados con un diagnóstico incorrecto de enfermedad de Lyme habían tenido pruebas serológicas positivas para *B. burgdorferi* que no pudieron confirmarse en el laboratorio de referencia.²⁸¹ Además, en cierto laboratorio pudo confirmarse por electroinmunotransferencia sólo el 16,3% de los resultados positivos obtenidos con un enzimoimmunoanálisis.⁵³ Los autores sostienen que la falta de sensibilidad de la electroinmunotransferencia no explica los resultados, porque se detectaron más casos de eritema migratorio con la electroinmunotransferencia que con el enzimoimmunoanálisis.

Nuestros colegas clínicos tampoco han tenido éxito en el manejo de esta enfermedad enigmática. En una clínica universitaria para enfermedad de Lyme, en el 38% de los niños se hizo un diagnóstico positivo equivocado y en el 8% se pasó por alto el diagnóstico.⁷⁶ La cuarta parte de los pacientes que habían sido diagnosticados correctamente fueron tratados después de manera incorrecta. En un estudio de pruebas de diagnóstico efectuado en un sistema prepago de atención sanitaria de California, sólo el 19% de las pruebas de laboratorio se pidieron porque el médico sospechaba enfermedad de Lyme.¹⁵² El 60% de estas pruebas se solicitaron como parte de un conjunto de pruebas para pacientes con síntomas poco precisos. En una zona en la que la enfermedad de Lyme es rara, esta forma indiscriminada de pedidos conspira aún más contra pruebas serológicas que ya tienen problemas más que suficientes por sí mismas.

Se han encontrado reacciones cruzadas con diversos agentes infecciosos en el suero de pacientes en los que se sospecha enfermedad de Lyme. El suero de pacientes con otras infecciones causadas por borrelias,¹⁶³ infecciones treponémicas,^{23,119,216} HIV, virus de Epstein-Barr e infecciones producidas por rickettsias puede reaccionar en las pruebas para *B. burgdorferi*. Los informes sobre reacciones cruzadas con sueros antileptospira son contradictorios. Aunque se desarrollan reacciones cruzadas con antígenos treponémicos específicos, la prueba de VDRL no es positiva en los pacientes con enfermedad de Lyme. Se ha informado en varias oportunidades que las reacciones inespecíficas se concentran en la clase IgG2 de anticuerpos.²⁵⁴

Como pasa a menudo, la interpretación de los resultados serológicos es más sencilla cuando menos se necesita, es decir, cuando se encuentra la erupción cutánea del eritema migratorio crónico clásica. Cuando la presentación es atípica, el diagnóstico suele ser serológico y la posibilidad de obtener resultados engañosos aumenta, con graves consecuencias. Steere²⁷³ señaló que la evidencia serológica de infección puede ser correcta, pero que la enfermedad de Lyme puede ser subclínica y los problemas del paciente pueden estar causados por otro agente.

Kaell y cols. describieron cuatro pacientes provenientes de una zona endémica para la enfermedad de Lyme, que tenían una enfermedad multisistémica confusa que se atribuyó al principio a *B. burgdorferi*.¹²⁹ Los cuatro pacientes tenían anticuerpos contra la espiroqueta y en tres de ellos los resultados eran positivos en las pruebas de Western blot; sin embargo, el estudio posterior reveló que la causa de la enfermedad en los cuatro casos era una endocarditis bacteriana subaguda. Más tarde, estos investigadores observaron un aumento de los anticuerpos

contra *B. burgdorferi* en 13 de 30 pacientes (43%) con endocarditis no causada por espiroquetas.¹²⁸ La especificidad de la serología para la enfermedad de Lyme en esta población fue sólo del 60%. Cuando se realizaron las pruebas de inmunoelectrotransferencia, sólo un paciente tenía un patrón de reactividad que sugería una exposición anterior a la espiroqueta. Los autores proponen la hipótesis de que las reacciones cruzadas con la bacteria infectante podrían ser responsables de la alta frecuencia de resultados inespecíficos.

Los problemas serológicos se han focalizado en dos formas principales: el desarrollo de inmunoelectrotransferencia (Western blot) y una búsqueda de antígenos definidos, y por consiguiente reproducibles, que reaccionen con el suero de la mayoría de los pacientes infectados.

El hallazgo de reacciones Western blot positivas en los pacientes con endocarditis bacteriana indica que la inmunoelectrotransferencia no es una garantía de especificidad per se. Como sucede en la infección por el HIV, la inmunoelectrotransferencia puede usarse para mejorar la especificidad de otras pruebas inmunológicas. Dressler y cols. propusieron criterios para definir las inmunoelectrotransferencias positivas en un estudio retrospectivo.⁶¹ La mejor discriminación se obtuvo si se exigía la detección de dos de las ocho bandas más frecuentes de IgM (18, 21, 28, 37, 41, 45, 58 y 93 kDa) para considerar el resultado positivo en la enfermedad temprana y la detección de por lo menos 5 de las 10 bandas más frecuentes de IgG (18, 21, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kDa) para el diagnóstico después de las primeras semanas de infección. La aplicación de estos criterios a más de 300 pacientes en un estudio prospectivo tuvo como resultado una sensibilidad del 32% y una especificidad de 100% para la prueba de IgM. La sensibilidad y la especificidad de la prueba de IgG fueron 83% y 95%. Engstrom y cols. han sugerido criterios algo diferentes.⁷² Sus criterios de positividad para las inmunoelectrotransferencias de IgM son el reconocimiento de por lo menos dos de las proteínas siguientes: 24 kDa (OspC), 39 kDa y 41 kDa (flagelina). La sensibilidad de las inmunoelectrotransferencias de IgG e IgM en 55 pacientes con eritema migratorio demostrado fue 58,5% y 54,6% respectivamente, en el momento del diagnóstico, y 100% después de 8 a 12 días más. Ma y cols. han subrayado la importancia de los anticuerpos contra el antígeno de 39 kDa para hacer un diagnóstico específico.¹⁶¹

Los CDC y la Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors recomiendan actualmente los criterios de IgM de Engstrom y los criterios de IgG de Dressler. Usando estos criterios, Agüero-Rosenfeld y cols.¹⁰ observaron inmunoelectrotransferencias de IgM positivas en el momento del estudio inicial en el 43% de un grupo de 46 pacientes con eritema migratorio positivo por cultivo y en el 84% de los pacientes de 8 a 14 días después. Aunque el 89% de los pacientes formaron anticuerpos contra *B. burgdorferi*, las inmunoelectrotransferencias de IgG fueron positivas, según los criterios recomendados, en sólo el 22% de los sueros tomados en la etapa de convalecencia. Después de un año, el 38% de las inmunoelectrotransferencias de IgM eran todavía positivas. Los anticuerpos IgM reactivos con los antígenos de 39, 58, 60, 66 y 93 kDa se vieron con mayor frecuencia durante el primer mes después del diagnóstico, y estos investigadores proponen que la presencia de estas bandas puede ser útil para sugerir una infección reciente en los pacientes de las zonas endémicas.

Hilton y cols. sugieren que se agreguen dos antígenos a los criterios para positividad de IgG: los antígenos de 31 kDa (OspA) y de 34 kDa (OspB).¹¹³ De 136 pacientes evaluados para determinar la presencia de enfermedad de Lyme, 4 (8%)

sólo habrían sido considerados positivos si se incluían estos dos antígenos entre los criterios. Estos 4 pacientes tenían eritema migratorio o artritis y vivían en zonas endémicas. Es obvio que los criterios para la interpretación de las inmunoelectrotransferencias todavía están en evolución.

Sin duda, los criterios para considerar positivas las pruebas serológicas continuará perfeccionándose, pero la confirmación de un resultado indeterminado o cuestionable obtenido con un enzimoimmunoanálisis debe intentarse mediante una prueba de inmunoelectrotransferencia realizada en un laboratorio experimentado. Sin embargo, Wormser y cols. han hecho notar que las propiedades confirmatorias de la inmunoelectrotransferencia se ven reducidas porque los dos ensayos no son completamente independientes.³⁰³

Los intentos para mejorar la especificidad del diagnóstico serológico también incluyen el desarrollo de antígenos recombinantes para los enzimoimmunoanálisis, sobre todo OspA,⁸⁰ OspB y OspC.⁹¹ El reconocimiento de la diversidad antigénica entre cepas puede ser importante para obtener mayor sensibilidad en ciertas regiones.²⁸⁸

La vacuna contra la enfermedad de Lyme, que contiene la proteína de superficie externa OspA, ha planteado un nuevo problema. Si una prueba serológica detecta OspA, será imposible decir si un individuo inmunizado también ha tenido una infección. El suero de personas vacunadas puede causar reacciones positivas en los enzimoimmunoanálisis, pero no produce un número suficiente de bandas en los Western blots como para dar resultados positivos.¹⁰ El desarrollo de enzimoimmunoanálisis que no contengan OspA también debería ayudar a resolver este dilema.¹⁸²

Leptospira

Los microorganismos del género *Leptospira* son bacilos móviles, helicoidales, aerobios estrictos, que miden 0,1 µm de



Figura 20-6 Examen en campo oscuro de un cultivo de *Leptospira interrogans*. La conformación en espiral, que no se ve con claridad, aparece como zonas brillantes y oscuras alternadas. El extremo superior muy brillante del microorganismo puede representar el extremo curvo que tienen muchas leptospiras. Es fácil, para los observadores inexpertos, confundir detritos celulares y artefactos con leptospiras en las muestras clínicas. 1000×. (Microfotografía cortesía de David Miller, DVM, MS).

diámetro y 6 a 12 µm de longitud. Son gramnegativos y sólo se tiñen débilmente con los colorantes de anilina. Para visualizar leptospiras sin tinción debe usarse microscopía de campo oscuro (fig. 20-6). Se reconocen dos especies tradicionales de *Leptospira*: *L. interrogans*, que contiene todos los patógenos humanos, y la especie saprófita, *L. biflexa*. *L. interrogans* contiene muchos serotipos diferentes que causan enfermedad en los seres humanos. Las serovariedades antigénicamente relacionadas se reúnen en serogrupos a los fines de la clasificación. La cepa prototipo es *L. interrogans* serovariedad icterohaemorrhagiae,¹²⁶ y la enfermedad clínica es la leptospirosis. Existen varias revisiones amplias, que aunque son antiguas, todavía reflejan el estado del conocimiento actual en muchos aspectos.^{68,77,109,110}

Yasuda y cols. estudiaron el parentesco del DNA entre serogrupos y serovariedades de *Leptospira*.³⁰⁵ Por razones genéticas, estos autores propusieron por lo menos cinco nuevas especies entre los patógenos humanos. El análisis de ácidos nucleicos no se correlaciona bien con la clasificación serológica. Una sola serovariedad puede encontrarse en varias especies. No es sorprendente que el número de genoespecies continúe ampliándose.¹⁴⁹ Las genoespecies y los serogrupos correspondientes reconocidos en la actualidad se presentan en detalle en el cuadro 20-6.

Leptospirosis

Levett¹⁴⁹ ha publicado una revisión excelente de todos los aspectos de la leptospirosis.

EPIDEMIOLOGÍA

Las leptospiras tienen distribución mundial e infectan muchos tipos de animales domésticos y salvajes. Los seres humanos son huéspedes accidentales, "callejones sin salida", porque no existe la transmisión del hombre a los animales o a otros seres humanos. Clásicamente las ratas se asocian con esta enfermedad, pero también pueden infectarse ovejas, vacas, perros y otros animales domésticos. En la naturaleza, los zorros, mapaches, mofetas, arpas y erizos son portadores de leptospiras. Existen asociaciones entre serovariedades (sv.) y las especies de animales, como *L. interrogans* sv. icterohaemorrhagiae y las ratas, o *L. interrogans* sv. canicola y los perros. Sin embargo, un determinado género de animales puede ser portador de varias serovariedades diferentes de *Leptospira*, y una determinada serovariedad puede asociarse con más de un huésped animal. En general, los huéspedes animales no son sintomáticos y no desarrollan anticuerpos, a pesar de la infección masiva.

La leptospirosis se ha considerado siempre una enfermedad ocupacional, concentrada en las personas que trabajan en las cloacas, los sembradíos de arroz o de caña de azúcar y los mataderos. Sin embargo, en la década de 1970 en los Estados Unidos, sólo el 30% de las personas con infección informada a los CDC tenían exposición laboral. Había niños, amas de casa y jubilados o desempleados entre las personas infectadas. Se ha sugerido que la mayor cantidad de tiempo libre y las excursiones más frecuentes al campo han aumentado la probabilidad de exposición casual. Se han informado casos de leptospirosis relacionados con la navegación en kayak.²⁵⁷ Las asociaciones con las actividades recreativas continúan en aumento. Se registró enfermedad epidémica durante un triatlón realizado en Illinois, donde se relacionó con una exposición brevísima al agua de un estanque,¹⁸⁵ y entre un grupo que practicaba rafting

Cuadro 20-6 Genoespecies y serogrupos de *Leptospira*

GENOESPECIES	SEROGRUPO
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. santarosai</i>	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i> *	Codice
<i>L. biflexa</i> *	Semaranga, Andamana
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inadia</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. parva</i> *	Turneria
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

* No hay ningún serogrupo patógeno asociado con esta especie hasta la fecha. Adaptado de la referencia¹⁴⁹.

en Costa Rica.² El episodio más célebre fue el registrado entre los participantes de una carrera Eco-Challenge realizada en Borneo, que experimentaron un "desafío ecológico" (*eco-challenge*, en inglés) mucho mayor del que suponían, ya que contrajeron leptospirosis aguda durante la carrera.⁴ La enfermedad se asoció con la navegación en kayak, la espeleología y la natación o la ingestión de agua en el río Segama.

Los factores epidemiológicos asociados con la leptospirosis en Hawaii fueron la recolección de agua de lluvia para uso doméstico, el contacto con ganado bovino y su orina, o la manipulación de tejidos de animales.²³⁸ Feigin y cols. registraron una pequeña epidemia en University City, Missouri, un suburbio de clase media alta de St. Louis.⁷⁸ Estos autores pudieron aislar *Leptospira interrogans* sv. icterohaemorrhagiae en ratas y animales domésticos y en la tierra de los jardines de las casas. Algunos de los perros a partir de los cuales aislaron leptospirosis habían sido inmunizados con vacunas contra *Leptospira* que se adquieren en el comercio. La enfermedad epidémica puede ocurrir a partir de una fuente común, como se encontró hace poco en un brote transmitido por agua en Italia.⁴⁰ En esa epidemia se sugirió que el brote asociado con una fuente del pueblo fue causado por un erizo atrapado en un depósito de agua. La pesquisa epidemiológica de un brote reciente en

Illinois condujo hasta un estanque contaminado; se adelantó la hipótesis de que una época de sequía había aumentado el riesgo de exposición a excretas de animales infectados.¹²⁴ *Leptospira* tiene distribución mundial, por lo que la enfermedad importada debe considerarse en los viajeros.²⁹³

ENFERMEDAD CLÍNICA

La leptospirosis clásica es una enfermedad bifásica que consiste en una fase septicémica inicial y una fase inmunitaria secundaria. La gravedad varía desde la infección subclínica hasta la enfermedad sistémica mortal, conocida como enfermedad de Weil, por el primero que describió la fiebre icterohemorrágica en 1886. En los casos graves, las dos fases se confunden y no existe un intervalo asintomático.

Los estudios serológicos realizados en trabajadores con riesgo profesional han demostrado la presencia de anticuerpos, sin un episodio reconocido de leptospirosis, en el 5-16% de ellos. En una revisión clásica, se describió la enfermedad de Weil en el 5-10% de los casos de pacientes con una infección conocida por leptospirosis. Sin embargo, más recientemente, la ictericia se observó en el 39% de los casos producidos en Hawaii entre 1974 y 1998. La inyección conjuntival se encontró en el 28% de los pacientes.¹³¹

La fase septicémica inicial de la enfermedad es de comienzo abrupto, precedido por fiebre alta, dolor intenso de cabeza, malestar general y dolores musculares. En forma característica, hay dolor de ojos, fotofobia e inyección conjuntival o incluso hemorragias. Debe subrayarse que no hay inflamación o verdadera conjuntivitis visible. Los infiltrados pulmonares son relativamente frecuentes. La enfermedad es por lo general leve, pero la leptospirosis puede presentarse como un síndrome de dificultad respiratoria del adulto^{71, 169, 196} y se describió hemorragia pulmonar.²⁵¹

Los pacientes pueden presentar erupción cutánea macular, maculopapular, urticariana o hemorrágica. Una erupción cutánea pretibial característica acompañó una infección epidémica de *L. interrogans* sv. autumnalis, que se denominó fiebre de Fort Bragg. Esta erupción cutánea pretibial se ha visto asociada con infecciones por otras serovariedades.

Después de un intervalo asintomático de 1 a 3 días, comienza la fase inmunitaria de la infección. Se han informado reacciones de Jarisch-Herxheimer después del tratamiento temprano. Las leptospirosis se eliminan con rapidez de la sangre y del LCR, y comienza un proceso inflamatorio. El 90% de los pacientes presentan pleocitosis del LCR durante la segunda semana de la enfermedad, pero sólo la mitad de ellos tienen síntomas de meningitis aséptica. *L. interrogans* fue responsable del 5-13% de los casos de meningitis aséptica en una serie.

Las características distintivas de la enfermedad de Weil son la ictericia y la insuficiencia renal aguda. La ictericia y otros signos de disfunción hepática aparecen ya en la tercera semana y pueden demorarse hasta la novena semana después de la infección.

El diagnóstico de infección clásica es bastante sencillo, pero es mucho más difícil en el caso promedio sin exposición ocupacional. Schmid y cols. informaron un caso muy raro de leptospirosis en el que los síntomas clínicos imitaban la enfermedad de Lyme. El agente etiológico fue una leptospira antes no reconocida, que estos autores denominaron "*L. inadai*" sv. lyme.²⁴²

DuPont y cols. evaluaron los factores pronósticos en 68 pacientes de las Antillas francesas.⁶⁴ Por análisis de multivariación, hay cinco factores asociados con la mortalidad: disnea,

oliguria, recuento leucocitario superior a $12\,900/\text{mm}^3$, alteraciones de la repolarización en los electrocardiogramas e infiltrado alveolar en las radiografías de tórax.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La leptospirosis puede diagnosticarse por cultivo de la espiroqueta, por la demostración de los microorganismos en las muestras, por la detección de antígenos o de ácidos nucleicos, o por serología.

Detección directa. La demostración directa de *Leptospira* puede intentarse por examen de campo oscuro de sangre, LCR u orina. Se ha recomendado la centrifugación a baja velocidad de sangre oxalatada o heparinizada para eliminar los elementos celulares, y después a velocidad alta para concentrar las leptospirosas. Lamentablemente, el diagnóstico por examen directo suele ser rápido pero erróneo, porque las fibrillas eritrocíticas o los eritrocitos crenados se interpretan equivocadamente como espiroquetas. Aunque el examen del LCR y la orina es un poco menos erróneo, puede tener dificultades similares.²⁶² Se describió la identificación directa de leptospirosas con antisueros marcados, pero los reactivos no se comercializan.

Cultivo. Los medios de cultivo habituales son el medio semisólido de Fletcher, el medio líquido de Korthof y el medio albúmina sérica bovina-Tween 80, que puede ser líquido o sólido. Los medios pueden almacenarse a temperatura ambiente durante períodos largos. Casi siempre se agregan antibióticos cuando hay probabilidades de que las muestras como la orina estén contaminadas con bacterias, pero algunos de los antibióticos, en la concentración requerida, también inhiben las leptospirosas. Se ha encontrado que la combinación de fosfomicina y 5-fluorouracilo es eficaz para usar con el medio de Korthof, pero los autores advierten que los resultados no pueden extrapolarse automáticamente a otros medios para *Leptospira*.¹⁹⁸

Leptospira puede aislarse con facilidad en sangre y LCR durante la primera semana de enfermedad. Durante el estadio inmune los microorganismos desaparecen de la sangre y del LCR. Sin embargo, el riñón es un sitio privilegiado y *Leptospira* se excreta en la orina hasta durante un mes (véase lámina en color 20-1G).

Se recomienda sembrar por lo menos cuatro tubos de 5 mL de medios de cultivo con dos porciones diferentes de la muestra clínica. Para el aislamiento de serotipos con requerimientos nutricionales especiales, puede agregarse 0,4% a 1% de suero de conejo estéril al medio albúmina sérica bovina-Tween 80. Deben sembrarse sólo volúmenes pequeños de sangre u orina, porque los más grandes pueden introducir sustancias que interfieren en el desarrollo. Los medios deben sembrarse con una a dos gotas de muestra por tubo. Si el procedimiento no puede hacerse a la cabecera del paciente, puede enviarse sangre oxalatada o heparinizada al laboratorio. También puede sembrarse un coágulo desmenuzado, pero la sangre citratada puede ser inhibitoria. Cuando se realiza el cultivo de orina, debe sembrarse una muestra pura y otra diluida al décimo. Cuando se usa LCR, deben sembrarse 0,5 mL a 5 mL.

Los cultivos se incuban en la oscuridad a 28 °C a 30 °C hasta 6 semanas y se examinan semanalmente por microscopia de campo oscuro para buscar leptospirosas (véase fig. 20-6). A menudo el desarrollo tarda varias semanas pero ocurre mucho más temprano en el medio Tween 80-albúmina. *Leptospira* se desarrolla típicamente como una banda, 0,5 a 1 centímetros debajo de la superficie del medio de cultivo semisólido (véase lámina en color 20-1H).

Manca y cols. informaron el aislamiento de *L. interrogans* en muestras simuladas y en sangre humana mediante un sistema de hemocultivo radiométrico comercial. Usaron el medio de Stuart y de Middlebrook para TB (12A) con el agregado de albúmina sérica bovina, catalasa e hidrolizado de caseína marcado con ácidos grasos C. El tiempo de aislamiento en sangre humana fue de 2 a 5 días.¹⁶⁷

Serología. El cultivo establece un diagnóstico de certeza de leptospirosis, pero requiere técnicas especializadas y difíciles de mantener en la mayoría de los laboratorios si la prevalencia de la enfermedad es baja. Por consiguiente, el procedimiento principal para el diagnóstico en la mayoría de los hospitales es el análisis serológico, y la técnica de referencia es la prueba de microaglutinación, con leptospirosas vivas. La dificultad de mantener un gran número de cultivos de *Leptospira* es obvia. En la práctica se usan leptospirosas muertas por formol, pero tienen una sensibilidad algo menor. La prueba de referencia de microaglutinación, a menudo considerada específica para serovariedades es, de hecho, específica para serogrupos. No obstante, debe probarse un gran número de antígenos contra los sueros para detectar las serovariedades locales con certeza. Se usan antígenos de leptospirosas específicos de serogrupo disponibles en el comercio, en una prueba de aglutinación macroscópica que puede usarse para la detección sistemática. Las reacciones positivas deben confirmarse en laboratorios de referencia con la prueba de microaglutinación.

Varias versiones de una prueba de hemaglutinación se usan con menos frecuencia. Seki y cols. describieron una prueba rápida de aglutinación de microcápsulas,²⁵³ pero no ha sido evaluada por otros investigadores. Varios grupos han publicado enzimoinmunoanálisis que parecen prometedores.^{8,203,300} Los anticuerpos IgM son los más específicos para detectar infección actual. La prueba parece funcionar bien y puede reemplazar en el futuro la engorrosa microaglutinación, pero hay reacciones cruzadas. Se requieren más investigaciones antes de aceptarlas como nuevos procedimientos de referencia, como lo demuestran dos informes recientes. Los investigadores de las Antillas hallaron una sensibilidad del 100% para una prueba de hemaglutinación indirecta comercial,¹⁵⁰ pero los investigadores de Hawái observaron una sensibilidad de sólo el 68% en pacientes infectados con la serovariedad icterohaemorrhagiae y una sensibilidad del 47% en pacientes infectados con la serovariedad Australis.⁶⁹ Las diferencias de sensibilidad entre los dos estudios puede representar las diferencias de serovariedades en las dos localidades. Esta experiencia es un llamado de atención para todos aquellos que intenten el diagnóstico serológico de las infecciones por *Leptospira*.

Se han informado otras técnicas serológicas, como la aglutinación del látex,²⁶³ la aglutinación de partículas³² y una prueba de inmunotransferencia en tiras por inmersión.¹⁰² Estos ensayos no se comercializan o no han sido ampliamente evaluados. Los investigadores de los CDC observaron que una prueba con tiras por inmersión comercial (Dip-S, PanBio INDX, Inc., Baltimore, MD) producía más resultados positivos (al parecer verdaderos positivos) que el enzimoinmunoanálisis en fase sólida comercial para IgM (P Brisbane, Australia).

Los CDC sugieren un título superior a 1:200 en una muestra aislada de suero por la prueba de microaglutinación como evidencia presuntiva de leptospirosis en un paciente con una enfermedad clínica compatible, pero otros expertos proponen un título de 1:800 o 1:1 600 como mejores valores de corte. Los títulos pueden alcanzar niveles sumamente altos y tardan meses o años en disminuir, por lo que la magnitud del título no puede usarse para determinar infección reciente.²²⁶

Detección de antígeno y ácidos nucleicos. Se han usado anticuerpos monoclonales para detectar antígeno de leptospirosis en orina en muestras de Tailandia, con resultados prometedores.²³³

Las técnicas de amplificación molecular se han utilizado con éxito para el diagnóstico de leptospirosis.^{19,175} El DNA de *Leptospira* estaba presente en orina incluso en los estadios tempranos de la infección, cuando predomina la espiroquetemia. Se encontró que un porcentaje alto de pacientes con meningitis aséptica tenía DNA de leptospirosis en el LCR, pero no se hicieron cultivos ni análisis serológicos de las muestras de sangre en este estudio, por lo que es difícil interpretar los resultados.²²⁵ Estas pruebas no están ampliamente disponibles, pero pueden ser de importancia en los laboratorios de referencia.

Spirillum minor (fiebre por mordedura de rata)

Spirillum minor es un bacilo corto, grueso, espiralado, con espiras muy juntas, que mide 0,2 µm a 0,5 µm de diámetro por 3 µm a 5 µm de longitud. Causa gran parte de los cuadros de fiebre por mordedura de rata en Asia, pero es raro en los Estados Unidos. La transmisión es, como su nombre lo indica, por la mordedura de ratas. No se ha demostrado la transmisión interhumana. Una a cuatro semanas después de la mordedura, comienza una enfermedad sistémica caracterizada por escalofríos, cefalea y fiebre. El sitio de la mordedura, que había curado, se reactiva y se acompaña por linfadenitis regional y una erupción cutánea macular. La fiebre recurrente puede durar semanas, meses o años. La complicación más seria es la endocarditis infecciosa.²⁹⁹ Aunque rara, esta infección todavía es una amenaza cuando la exposición a las ratas es una posibilidad.¹⁹⁹

Spirillum minor no puede cultivarse in vivo y no hay ninguna prueba serológica específica. Hasta el 50% de los pacientes infectados tienen resultados falsos positivos en las pruebas serológicas para sífilis. Las espiroquetas pueden visualizarse en sangre, exudados o tejidos mediante la tinción de Giemsa o de Wright o por microscopía de campo oscuro.

REFERENCIAS

- Guidelines for laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. American College of Physicians. Ann Intern Med 1997;127:1106-1108.
- Outbreak of leptospirosis among white-water rafters-Costa Rica, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997;46:577-579.
- Recommendations for the use of Lyme disease vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 1999;48:1-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000-Borneo, Malaysia, 2000. JAMA 2001;285:728-730.
- Lyme disease-United States, 2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:29-31.
- Primary and secondary syphilis-United States, 2000-2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:971-973.
- Ackerman R, et al: Spirochäten-Ätiologie der Erythema-chronicum-migrans-Krankheit. Dtsch Med Wochenschr 1984;109:92-97.
- Adler B, et al: Detection of specific and anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1980;11:452-452.
- Agüero-Rosemfield ME, et al: Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. J Clin Microbiol 1996;34:1-9.
- Agüero-Rosemfield ME, et al: Effects of OspA vaccination on Lyme disease serologic testing. J Clin Microbiol 1999;37:3718-3721.
- Alexander-Rodriguez T, Vermund Sh: Gonorrhea and syphilis in incarcerated urban adolescents: prevalence and physical signs. Pediatrics 1987;80:561-564.
- Alford CA, et al: Gamma-M-fluorescent treponemal antibody in the diagnosis of syphilis. N Engl J Med 1969;280:1086-1091.
- Anderson Jf: Epizootiology of *Borrelia* in Ixodes tick vectors and reservoir hosts. Rev Infect Dis 1989;11(Suppl 6):S1451-S1459.

- Andrus IK, et al: Partner notification: can it control epidemic syphilis? Ann Intern Med 1990;112:539-543.
- Augenbraun Mh: Treatment of syphilis 2001: nonpregnant adults. Clin Infect Dis 2002;35:S187-S190.
- Augenbraun MH, et al: Biological false-positive syphilis test results for women infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1994;19:1040-1044.
- Badon SJ, et al: Survival of *Borrelia burgdorferi* in blood products. Transfusion 1989;29:581-583.
- Bakken LL, et al: Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. JAMA 1992;268:891-895.
- Bal AE, et al: Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 1994;32:1894-1898.
- Barbour Ag: Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984;57:521-525.
- Barton JR, et al: Nonimmune hydrops fetalis associated with maternal infection with syphilis. Am J Obstet Gynecol 1992;167:56-58.
- Benditt J. The syphilized world. Sci Am 1989;260:30-30.
- Berardi VP, et al: Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay. J Infect Dis 1988;158:754-760.
- Berger Bw: Erythema chronicum migrans of Lyme disease. Arch Dermatol 1984;120:1017-1021.
- Berger BW, et al: Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from human tick bite sites: a guide to the risk of infection. J Am Acad Dermatol 1995;32:184-187.
- Bergmann AR, et al: Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. J Clin Microbiol 2002;40:4581-4584.
- Berry CD, et al: Neurologic relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in a patient with HIV infection. N Engl J Med 1987;316:1587-1589.
- Blank S, et al: Incident syphilis among women with multiple admissions to jail in New York City. J Infect Dis 1999;180:1159-1163.
- Borgnoli G, et al: Louse-borne relapsing fever: a clinical and an epidemiological study of 389 patients in Asella Hospital, Ethiopia. Trop Geogr Med 1993;45:66-69.
- Bourke SJ, et al: Lyme disease with acute purulent meningitis. BMJ 1988;297:460.
- Bowen GS, et al: Clinical manifestations and descriptive epidemiology of Lyme disease in New Jersey, 1978 to 1982. JAMA 1984;251:2236-2240.
- Brandao AP, et al: Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol 1998;36:3138-3142.
- Bromberg K, et al: Diagnosis of congenital syphilis by combining *Treponema pallidum*-specific IgM detection with immunofluorescent antigen detection for *T. pallidum*. J Infect Dis 1993;168:238-242.
- Brown RN, Lane RS: Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. Science 1992;256:1439-1442.
- Brunet LR, et al: Density of Lyme disease spirochetes within deer ticks collected from zoönotic sites. Am J Trop Med Hyg 1995;53:300-302.
- Bryceson ADM, et al: Louse-borne relapsing fever: a clinical and laboratory study of 62 cases in Ethiopia and reconsideration of the literature. Q J Med 1970;39:129-170.
- Burgdorfer W, et al: Lyme disease: a tick-borne spirochetosis. Science 1982;216:1317-1319.
- Butler T, et al: *Borrelia recurrentis* infection: single-dose antibiotic regimens and management of the Jarisch Herxheimer reaction. J Infect Dis 1978;137:573-577.
- Byrne RE, et al: Evaluation of a *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 1992;30:115-122.
- Cacciapuoti B, et al: A waterborne outbreak of leptospirosis. Am J Epidemiol 1987;126:535-545.
- Cadavid D, Barbour AG: Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals. Clin Infect Dis 1998;26:151-164.
- Canale-Parola E: Spirochetes. In Krieg NR, Holt JR, eds.: Bergey's Manual of Systematic Microbiology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
- Centers For Disease Control: Syphilis and congenital syphilis-United States 1985-1988. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1988;37:486-489.
- Centers For Disease Control: Comparison of early and late latent syphilis-Colorado, 1991. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993;42:155-157.
- Centers For Disease Control And Prevention: Lyme disease—United States 1994. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995;44:459-462.
- Centers For Disease Control And Prevention: Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995;44:590-591.
- Centers For Disease Control And Prevention: Surveillance Summaries: Surveillance for Lyme Disease-United States, 1992-1998. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 49:1-11, 2000.
- Chambers RW, et al: Transmission of syphilis by fresh blood components. Transfusion 1969;9:32-34.
- Chang SN, et al: Seroreversion of the serological tests for syphilis in the new-borns born to treated syphilitic mothers. Genitaurin Med 1995;71:68-70.
- Chhabra RS, et al: Comparison of maternal sera, cord blood, and neonatal sera for detecting presumptive congenital syphilis: relationship with maternal treatment. Pediatrics 1993;91:88-91.
- Colebunders R, et al: Imported relapsing fever in European tourists. Scand J Infect Dis 1993;25:533-536.
- Craft JE, et al: Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. J Infect Dis 1984;149:789-795.
- Cutler SJ, Wright DJ: Predictive value of serology in diagnosing Lyme borreliosis. J Clin Pathol 1994;47:344-349.

54. Daniels TJ, et al: Deer ticks (*Ixodes scapularis*) and the agents of Lyme disease and human granulocystic ehrlichiosis in a New York City park. *Emerg Infect Dis* 1997;3:353-355.
55. Deblinger RD, et al: Reduced abundance of immature *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) following incremental removal of deer. *J Med Entomol* 1993;30:144-150.
56. Dekonenko EJ, et al: Lyme borreliosis in the Soviet Union: a cooperative US-USSR repon. *J Infect Dis* 1988;158:748-753.
57. Demaerschalck I, et al: Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:602-608.
58. Des Vignes F, et al: Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001;183:773-778.
59. Dobson SR, et al: Recognition of *Treponema pallidum* antigens by IgM and IgG antibodies in congenitally infected newborns and their mothers. *J Infect Dis* 1988;157:903-910.
60. Dressler F, et al: Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *J Infect Dis* 1994;169:313-318.
61. Dressier F, et al: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167:392-400.
62. Durnier JS: Molecular diagnosis of Lyme disease: review and meta-analysis. *Mol Diagn* 2001;6:1-11.
63. Dunn RA, et al: Surveillance for geographic and secular trends in congenital syphilis-United States, 1983-1991. *MMWR CDC Surveill Summ* 1993;42:59-71.
64. Dupont H, et al: Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1997;25:720-724.
65. Duray PH: The surgical pathology of human Lyme disease: an enlarging picture. *Am J Surg Pathol* 1987;11(Suppl 1):47-60.
66. Dworkin MS, et al: Tick-borne relapsing fever in the northwestern United States and southwestern Canada. *Clin Infect Dis* 1998;26:122-131.
67. Ebel A, et al: Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. *J Clin Microbiol* 1998;36:358-361.
68. Edwards GA, Domm BM: Human leptospirosis. *Medicine (Baltimore)* 1960;39:117-117.
69. Effler PV, et al: Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 2000;38:1081-1084.
70. El-Zaatari MM, et al: Incidence of the prozone phenomenon in syphilis serology. *Obstet Gynecol* 1994;84:609-612.
71. Emmanouilides CE, et al: Leptospirosis complicated by a Jarisch-Herxheimer reaction and adult respiratory distress syndrome: case report. *Clin Infect Dis* 1994;8:1004-1006.
72. Ehgstrom SM, et al: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:419-427.
73. Erbeling EJ, et al: Syphilis serology in human immunodeficiency virus infection: evidence for false-negative fluorescent treponemal testing. *J Infect Dis* 1997;176:1397-1400.
74. Falco RC, et al: Duration of tick bites in a Lyme disease-endemic area. *Am J Epidemiol* 1996;143:187-192.
75. Fears ML, Pope V: Syphilis fast latex agglutination test, a rapid confirmatory test. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:841-842.
76. Feder HM, Jr, Hunt MS: Pitfalls in the diagnosis and treatment of Lyme disease in children. *JAMA* 1995;274:66-68.
77. Fdgin RD, Anderson DC: Human leptospirosis. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1975;5:413-467.
78. Feigin Rd, et al: Human leptospirosis from immunized dogs. *Ann Intern Med* 1973;79:777-777.
79. Felsenfeld O: Borreliae, human relapsing fever, and parasite-vector-host relationships. *Bacteriol Rev* 1965;29:46-46.
80. Fikrig E, et al: Serologic diagnosis of Lyme disease using recombinant outer surface proteins A and B and flagellin. *J Infect Dis* 1992;165:1127-1132.
81. Fiumara NJ: Acquired syphilis in three patients with congenital syphilis. *N Engl J Med* 1974;290:1119-1120.
82. Fiumara NJ: Reinfection primary, secondary, and latent syphilis: the serologic response after treatment. *Sex Transm Dis* 1980;7:111-115.
83. Fix AD, et al: Tick bites and Lyme disease in an endemic setting: problematic use of serologic testing and prophylactic antibiotic therapy. *JAMA* 1998;279:206-210.
84. Fiod JM, et al: Neurosyphilis during the AIDS epidemic, San Francisco, 1985-1992. *J Infect Dis* 1998;177:931-940.
85. Fohn MJ, et al: Specificity of antibodies from patients with pinta for antigens of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *J Infect Dis* 1988;157:32-37.
86. Fornaciari G, et al: Syphilis in a Renaissance Italian mummy. *Lancet* 1989;2:614-614.
87. Fraser CM, et al: Genetic sequence of a Lyme disease spirochete. *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997;390:580-586.
88. Fraser CM, et al: Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998;281:375-388.
89. Fraser JR: Lyme disease challenges Australian clinicians: the implications of Australia's first reported case of Lyme arthritis. *Med J Aust* 1982;1:101-102.
90. Fukunaga M, et al: Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:898-905.
91. Fung BP, et al: Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun* 1994;62:3213-3221.
92. Gardella C, et al: Persons with early syphilis identified through blood or plasma donation screening in the United States. *J Infect Dis* 2002;185:545-549.
93. Gelfand JA, et al: Endotoxemia associated with the Jarisch-Herxheimer reaction. *N Engl J Med* 1976;295:211-213.
94. Gerber AR, et al: An outbreak of syphilis on an Indian reservation: descriptive epidemiology and disease-control measures. *Am J Publ Health* 1989;79:83-85.
95. Gerber MA, et al: Lyme Disease in children in Southeastern Connecticut. *N Engl J Med* 1996;335:1270-1274.
96. Gerber MA, et al: The risk of acquiring Lyme disease or babesiosis from a blood transfusion. *J Infect Dis* 1994;170:231-234.
97. Godsey MS, Jr, et al: Lyme disease ecology in Wisconsin: distribution and host preferences of *Ixodes dammini*, and prevalence of antibody to *Borrelia burgdorferi* in small mammals. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:180-187.
98. Goldschmid JM, Mahomed K: The use of the microhematocrit technic for the recovery of *Borrelia duttonii* from the blood. *Am J Clin Pathol* 1972;58:165-169.
99. Goodman JL, et al: Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am J Med* 1995;99:6-12.
100. Grimpel E, et al: Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1991;29:1711-1718.
101. Guamu J, et al: Testing umbilical cords for funisitis due to *Treponema pallidum* infection, Bolivia. *Emerg Infect Dis* 2000;6:487-492.
102. Gussenhoven GC, et al: LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997;35:92-97.
103. Haas IS, et al: Sensitivity of treponemal tests for detecting prior treated syphilis during human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1990;162:862-866.
104. Hagedorn HJ, et al: Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 2002;40:973-978.
105. Hahn RA, et al: Race and the prevalence of syphilis seroreactivity in the United States population: a national sero-epidemiologic study. *Am J Publ Health* 1989;79:467-470.
106. Hammers-Berggren S, et al: Serological follow-up after treatment of patients with erythema migrans and neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1519-1525.
107. Hanrahan JP, et al: Incidence and cumulative frequency of endemic Lyme disease in a community. *J Infect Dis* 1984;150:489-496.
108. Hart G: Syphilis tests in diagnostic and therapeutic decision making. *Ann Intern Med* 1986;104:368-376.
109. Heath CW, Jr, et al: Leptospirosis in the United States (concluded) analysis of 483 cases in man, 1949-1961. *N Engl J Med* 1965;273:915-922.
110. Heath CW, Jr, et al: Leptospirosis in the United States: analysis of 483 cases: in man. *N Engl J Med* 1965;273:857-864.
111. Hechemy KE, et al: Fluoroimmunoassay studies with solubilized antigens from *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1989;27:1854-1858.
112. Hernandez-Aguado I, et al: False-positive tests for syphilis associated with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus infection among intravenous drug abusers. Valencian Study Group on HIV Epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:784-787.
113. Hilton E, et al: Recommendation to include QspA and OspB in the ne immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1996;34:1353-1354.
114. Hook EW III: Treatment of syphilis: current recommendations, alternatives, and continuing problems. *Rev Infect Dis* 1989;11:S1511-S1517.
115. Hook EW III, Marra CM: Acquired syphilis in adults. *N Engl J Med* 1992;326.
116. Hook EW III, et al: Detection of *Treponema pallidum* in lesion exudate with a pathogen-specific monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1984;22:241-244.
117. Hooshmand H, et al: Neurosyphilis a study of 241 patients. *JAMA* 1972;219:726-729.
118. Horton JM, Blaser MJ: The spectrum of relapsing fever in the Rocky Mountains. *Arch Intern Med* 1985;145:871-875.
119. Hunter EF, et al: Evaluation of sera from patients with the disease in the fluorescent treponemal antibody-absorption test for syphilis. *Sex Transm Dis* 1986;13:232-236.
120. Hutchinson CM, et al: Altered clinical presentation of early syphilis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 1994;121:94-100.
121. Hyde FW, Johnson RC: Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *J Clin Microbiol* 1984;20:151-154.
122. Ito F, et al: Specific immunofluorescent staining of pathogenic treponemes with a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1992;30:831-838.
123. Ito F, et al: Specific immunofluorescence staining of *Treponema pallidum* in smears and tissues. *J Clin Microbiol* 1991;29:444-448.
124. Jacitson LA, et al: Outbreak of leptospirosis associated with swimming. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:48-54.
125. James AM, et al: *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. *J Infect Dis* 2001;183:1810-1814.
126. Johnson RC, Faine S: *Leptospira* Noguchi 1917. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:62-67.
127. Johnson RC, et al: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:496-497.
128. Kaell AT, et al: Occurrence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with nonspirochetal subacute bacterial endocarditis. *Ann Intern Med* 1993;119:1079-1083.
129. Kaell AT, et al: Positive Lyme serology in subacute bacterial endocarditis: a study of four patients. *JAMA* 1990;264:2916-2918.

130. Kadish RA, et al: Evaluation of study patients with Lyme disease, 10-20-year follow-up. *J Infect Dis* 2001;183:453-460.
131. Kat AR, et al: Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clin Infect Dis* 2001;33:1834-1841.
132. Kaufman RE, et al: Biological false positive serological tests for syphilis among drug addicts. *Br J Vener Dis* 1974;50:350-353.
133. Kelly R: Cultivation of *Borrelia hermsii*. *Science* 1971;173:443-444.
134. Keiij RT: *Borrelia Swellengrebel* 1907. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. Williams & Wilkins, 1984:57-62.
135. Klass PE, et al: The incidence of prenatal syphilis at the Boston City Hospital: a comparison across four decades. *Pediatrics* 1994;94:24-28.
136. Klausner JD, et al: Tracine a syphilis outbreak through cyberspace. *JAMA* 2000;284:447-449.
137. Klempner MS, et al: Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. *N Engl J Med* 2001;345:85-92.
138. Klempner MS, et al: Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. *Am J Med* 2001;110:217-219.
139. Koff AB, Rosen T: Nonvenereal treponematoses: yaws, endemic syphilis, and pinta. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:519-535.
140. Kornblatt AN, et al: Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1985;186:960-964.
141. Klaus S, et al: Fluorescent treponema antibody-absorption test reactions in lupus erythematosus: atypical beading pattern and probable false-positive reactions. *N Engl J Med* 1970;282:1287-1290.
142. Kurt DJ, et al: Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1987;25:2054-2058.
143. Larsen SA: Syphilis. *Clin Lab Med* 1989;9:545-557.
144. Larsen SA, et al: Specificity, sensitivity, and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody-absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. *J Clin Microbiol* 1981;14:441-445.
145. Latsen SA, et al: Manual of Tests for Syphilis. 8th Ed. Washington, D.C.: American Public Health Association. 1990.
146. Larsen SA, et al: Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
147. Lebech AM, Hansen K: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1646-1653.
148. Lee CB, et al: Epidemiology of an outbreak of infectious syphilis in Manitoba. *Am J Epidemiol* 1987;125:277-283.
149. Levett PN: Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
150. Levett PN, Whittington CU: Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:11-14.
151. Levine JF, et al: Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:355-360.
152. Ley C, et al: The use of serologic tests for Lyme disease in a prepaid health plan in California. *JAMA* 1994;271:460-463.
153. Lin T, et al: Genetic diversity of the outer surface protein C gene of southern *Borrelia* isolates and its possible epidemiological, clinical, and pathogenetic implications. *J Clin Microbiol* 2002;40:2572-2583.
154. Liu CC, et al: Congenital syphilis: clinical manifestations in premature infants. *Scand J Infect Dis* 1993;25:741-745.
155. Liu H, et al: New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001;39:1941-1946.
156. Liveris D, et al: Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:565-569.
157. Liveris D, et al: Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* in 2-millimeter skin samples of erythema migrans lesions: correlation of results with clinical and laboratory findings. *J Clin Microbiol* 2002;40:1249-1253.
158. Lovrich SD, et al: Seroprotective groups of Lyme borreliosis spirochetes from North America and Europe. *J Infect Dis* 1994;170:115-121.
159. Luh BJ, et al: Invasion of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* in acute disseminated infection. *JAMA* 1992;267:1364-1367.
160. Lukehart SA, et al: Invasion of the central nervous system by *treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1988;109:855-862.
161. Ma B, et al: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1992;30:370-376.
162. Magid D, et al: Prevention of Lyme disease after tick bites: a cost-effectiveness analysis. *N Engl J Med* 1992;327:534-541.
163. Magnarelli LA, et al: Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis* 1987;156:183-188.
164. Magnarelli LA, et al: Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1991;34:237-240.
165. Magnarelli LA, et al: Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1984;20:181-184.
166. Magnuson HJ, et al: Inoculation syphilis in human volunteers. *Medicine (Baltimore)* 1956;35:33-33.
167. Manca N, et al: Radiometric method for the rapid detection of *Leptospira* organisms. *J Clin Microbiol* 1986;23:401-493.
168. Marfin AA, et al: Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:163-166.
169. Marotto PC, et al: Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1999;29:1561-1563.
170. Marshall WB, et al: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Peromyscus leucopus*. *J Infect Dis* 1994;170:1027-1032.
171. Matuschka FR, et al: Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 1992;165:479-483.
172. Matuschka FR, et al: Antiquity of the Lyme-disease spirochete in Europe. *Lancet* 1995;346:1367-1367.
173. Matuschka FR, Spielman A: Risk; of infection from and treatment of tick bite. *Lancet* 1993;342:529-530.
174. Maupin GO, et al: Discovery of an enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi* in *Neotoma mexicana* and *Ixodes spinipalpus* from northern Colorado, an area where Lyme disease is nonendemic. *J Infect Dis* 1994;170:636-643.
175. Metjen F, et al: Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995;172:281-285.
176. Meyer MP, et al: Analysis of western blotting immunoblotting technique in diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol* 1994;32:629-633.
177. Miao RM, Fieldsteel AH: Genetic relationship between *Treponema pallidum* and *Treponema pertenue* two noncultivable human pathogens. *J Bacteriol* 1980;141:427-429.
178. Michelow IC, et al: Central nervous system infection in congenital syphilis. *N Engl J Med* 2002;346:1792-1798.
179. Mitchell PD, et al: Comparison of four immunoserologic assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with culture-positive erythema migrans. *J Clin Microbiol* 1994;32:1958-1962.
180. Mitchell PD, et al: Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol* 1996;34:724-727.
181. Mitchell PD, et al: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from skin biopsy specimens of patients with erythema migrans. *Am J Clin Pathol* 1993;99:104-107.
182. Molloy PJ, et al: Detection of multiple reactive protein species by immunoblotting after recombinant outer surface protein A Lyme disease vaccination. *Clin Infect Dis* 2000;31:42-47.
183. Molloy PJ, et al: False-positive results of PC testing for Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001;33:412-413.
184. Moore VA IV, et al: Detection of *Borrelia lonestari*, putative agent of southern tick-associated rash illness, in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from the southeastern United States. *J Clin Microbiol* 2003;41:424-427.
185. Morgan J, et al: Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 2002;34:1593-1599.
186. Murray T, Feder HM Jr.: Management of tick bites and early Lyme disease: a survey of Connecticut physicians. *Pediatrics* 2001;108:1367-1370.
187. Musber DM, et al: Effect of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the course of syphilis and on the response to treatment. *Ann Intern Med* 1990;113:872-881.
188. Nadelrnsn RH, et al: Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an Ixodes scapularis tick bite. *N Engl J Med* 2001;345:79-84.
189. Nakao M, Miyamoto K: Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol* 1995;33:490-492.
190. Negussie Y, et al: Detection of plasma tumor necrosis factor, interleukins 6, and 8 during the Jarisch-Herxheimer reaction of relapsing fever. *J Exp Med* 1992;175:1207-1212.
191. Noordhoek GT, et al: A new attempt to distinguish serologically the subspecies of *Treponema pallidum* causing syphilis and yaws. *J Clin Microbiol* 1990;28:1600-1607.
192. Noordhoek GT, et al: *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (Nichols) and *Treponema pallidum* subspecies *pertenue* (CDC 2575) differ in at least one nucleotide: comparison of two homologous antigens. *Microb Pathog* 1989;6:29-42.
193. Noordhoek GT, et al: Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1991;29:1976-1984.
194. Nowakowski J, et al: Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin Infect Dis* 2001;33:2023-2027.
195. Nowakowski J, et al: Culture-confirmed infection and reinfection with *Borrelia burgdorferi*. *Ann Intern Med* 1997;127:130-132.
196. O'neil KM, et al: Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Rev Infect Dis* 1991;13:705-709.
197. Obenchain ED, et al: Implications of tick size on the quantifications of engorgement in female *Dermacentor variabilis*. *J Parasitol* 1980;66:282-286.
198. Oie S, et al: In vitro evaluation of combined usage of fosfomicin and 5-fluorouracil for selective isolation of *Leptospira* species. *J Clin Microbiol* 1986;23:1084-1087.
199. Ojukwu IC, Christy C: Rat-bite fever in children: case report and review. *Scand J Infect Dis* 2002;34:474-477.
200. Oliver JH, Jr, et al: Specificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *dammini* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1993;30:54-63.
201. Pacittier AR, Steere AC: The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 1985;35:47-53.
202. Pal U, et al: Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest* 2000;106:561-569.
203. Pappas MG, et al: Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IGM-specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:346-354.

204. Pennell DR, et al: Evaluation of a quantitative fluorescence immunoassay (FIAX) for detection of serum antibody to *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 1987;25:2218-2220.
205. Perine PL, et al: New technologies for use in the surveillance and control of yaws. Rev Infect Dis 1985;7:295-295.
206. Persing DH, et al: Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. J Infect Dis 1994;169:668-672.
207. Piesman J, et al: Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J Clin Microbiol 1987;25:557-558.
208. Pillay A, et al: Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. J Clin Microbiol 2002;40:256-258.
209. Poland GA: Prevention of Lyme disease: a review of the evidence. Mayo Clin Proc 2001;76:713-724.
210. Pollack RJ, et al: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. J Clin Microbiol 1993;31:1251-1255.
211. Pope V, Castro A: Replacement for 30-milliliter flat-bottomed, glass-stoppered, round bottles used in VDRL antigen preparation. J Clin Microbiol 1999;37:3053-3054.
212. Pope V, et al: Comparison of the Serodia *Treponema pallidum* particle agglutination, Capita Syphilis-G, and SpiroTek Reagin II tests with standard test techniques for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 2000;38:2543-2545.
213. Postic D, et al: Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *borrelia* group DN127). J Clin Microbiol 1998;36:3497-3504.
214. Preac-Mursic V, et al: Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. Eur J Clin Microbiol 1984;3:564-565.
215. Qureshi MZ, et al: Overdiagnosis and overtreatment of Lyme disease in children. Pediatr Infect Dis J 2002;21:12-14.
216. Raoult D, et al: Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis, and leptospirosis. J Clin Microbiol 1989;27:2152-2155.
217. Rathinavelu S, De Silva AM: Purification and characterization of *Borrelia burgdorferi* from feeding nymphal ticks (Iodes scapularis) Infect Immun 2001;69:3536-3541.
218. Rauter C, et al: Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. J Clin Microbiol 2002;40:36-43.
219. Reed KD: Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. J Clin Microbiol 2002;40:319-324.
220. Riggsbee JH, Lamke CL: An evaluation of the double-staining proced for the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test. L Sied 1981;12:232-234.
221. Riviere GR, et al: Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. N Engl J Med 1991;325:539-543.
222. Rodriguez S, et al: Gummatous syphilis: a reminder. J Infect Dis 1988;157:606-607.
223. Rolfs RT, et al: Risk factors syphilis: cocaine use and prostitution. Am J Publ Health 1990;80:853-857.
224. Rolfs RT, Nakashima AK: Epidemiology of primary and secondary syphilis in the United States, 1981 through 1989. JAMA 1990;264:1432-1437.
225. Romero EC, et al: Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1453-1455.
226. Romero EC, et al: The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopical agglutination test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1998;40:183-184.
227. Rompalo AM, et al: Association of biologic false-positive reactions for syphilis with human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 1992;165:1124-1126.
228. Rosen EU, Richardson NJ: A reappraisal of the value of the IM fluorescent treponemal antibody absorption test in the diagnosis of congenital syphilis. Pediatrics 1975; 87:38-42.
229. Rothschild BM, et al: First European exposure to syphilis. The Dominican Republic at the time of Columbian contact. Clin Infect Dis 2000;31:936-941.
230. Rothschild BM, Rothschild C: Treponemal disease revisited: skeletal discrimination for yaws, bejel, and venereal syphilis. Clin Infect Dis 1995;20:1402-1408.
231. Russell H, et al: Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. J Infect Dis 1984;149:465-470.
232. Russell RC, et al: Lyme disease: a search for a causative agent in ticks in south-eastern Australia. Epidemiol Infect 1994;112:375-384.
233. Saengiaruk P, et al: Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. J Clin Microbiol 2002;40:481-489.
234. Salazar JC, et al: The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. Microbes Infect 2002;4:1133-1140.
235. Sambri V, et al: Evaluation of recomWell *Treponema*, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. Clin Microbiol Infect 2001;7:200-205.
236. Sanchez PJ, et al: Molecular analysis of the fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. J Infect Dis 1989;159:508-517.
237. Sanchez PJ, et al: Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. J Infect Dis 1993;167:148-157.
238. Sasaki DM, et al: Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. Am J Trop Med Hyg 1993;48:35-43.
239. Scheck DN, Hook Ew3: Neurosyphilis. Infect Dis Clin North Am 1994;8:769-795.
240. Schlesinger PA, et al: Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete. *Borrelia burgdorferi*. Ann Intern Med 1985;103:67-68.
241. Schmid GP, et al: Surveillance of Lyme disease in the United States, 1982. J. Infect Dis 1985;151:1144-1149.
242. Schmid GP, et al: Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadai*") serovar lyme) isolated from human skin. J Clin Microbiol 1986;24:484-486.
243. Schmid GP, et al: DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. J Clin Microbiol 1984;20:155-158.
244. Schmidt BL: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev 1997;10:185-201.
245. Schmidt BL, et al: Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. J Clin Microbiol 2000;38:1279-1282.
246. Schutzer SE, et al: Early and specific antibody response to OspA in Lyme Disease. J Clin Invest 1994;94:454-457.
247. Schwaiger M, et al: Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin Microbiol Infect 2001;7:461-469.
248. Schwan TG, et al: Identification of the de-k-borne relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii* by using a species-specific monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1992; 30:790-795.
249. Sciutto CG, et al: Detection of *Borrelia* in acridine orange-stained blood smears by fluorescence microscopy. Arch Pathol Lab Med 1983;107:384-386.
250. Seboxa T, Rahienbeck SJ: Treatment of louse-borne relapsing fever with low dose penicillin of tetracycline: a clinical trial. Scand J Infect Dis 1995;27:29-31.
251. Seijo A, et al: Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis 2002;8:1004-1005.
252. Seinst G, et al: Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. Infect Immun 1999;67:3518-3524.
253. Seki M, et al: One point method for serological diagnosis of leptospirosis: a microcapsule agglutination test. Epidemiol Infect 1987;99:399-405.
254. Seppala D, et al: Diagnosis of Lyme borreliosis: non-specific serological reactions with *Borrelia burgdorferi* sonicate antigen caused by IgG2 antibodies. J Med Microbiol 1994;40:293-302.
255. Shapiro ED: Dnocyline for tick bites-not for everyone. N Engl J Med 2001; 345:133-134.
256. Shapiro ED, Gerber MA: Lyme disease. Clin Infect Dis 2000;31:533-542.
257. Shaw RD: Kayaking as a risk factor for leptospirosis. Mo Med 1992;89:354-357.
258. Sigal LH, et al: A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease: Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. N Engl J Med 1998;339:216-222.
259. Singh AE, Romanowski B: Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. Clin Microbiol Rev 1999;12:187-209.
260. Smith RP, Jr., et al: Norway rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes on Monhegan Island, Maine. J Infect Dis 1993;168:687-691.
261. Smith RP, et al: Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. Ann Intern Med 2002;130:421-428.
262. Smith TF, et al: Pseudospirochetes, a cause of erroneous diagnoses of leptospirosis. Am J Clin Pathol 1979;72:459-463.
263. Smits HL, et al: Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol 2000;38:1272-1275.
264. Sood SK: Effective retrieval of Lyme disease information on the Web. Clin Infect Dis 2002;35:451-464.
265. Sood SK, et al: Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. J Infect Dis 1997;175:996-999.
266. Souther P, Sanford JP: Relapsing fever: a clinical and microbiological review. Medicine (Baltimore) 1969;48:129-149.
267. Spiach DH, et al: Tick-borne diseases in the United States. N Engl J Med 1993; 329:936-947.
268. Sperring LC, et al: Occult primary syphilis: the nonerosive chancre. J Am Acad Dermatol 1990;23:514-515.
269. Spielman A, et al: Human babesiosis on Nantucket Island, USA: description of the vector, *Ixodes (Ixodes) dammini* N. Sp. (Acarina: Ixodidae). J Med Entomol 1979; 15:218-234.
270. Stamm LV, et al: Identification, cloning, and purification of protein antigens of *Treponema pallidum*. Rev Infect Dis 1988;10(Suppl 2):S403-S407.
271. Stamm WE, et al: The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men. JAMA 1988;260:1429-1433.
272. Stechenberg BW: Lyme disease: the latest great imitator. Pediatr Infect Dis J 1988; 7:402-409.
273. Steere AC: Lyme disease. N Engl J Med 1989;321:S86-S96.
274. Steere AC: Lyme disease. N Engl J Med 2001;345:115-125.
275. Steere AC, et al: The early clinical manifestations of Lyme disease. Ann Intern Med 1983;99:76-82.
276. Steere AC, et al: The spirochetal ecology of Lyme disease. N Engl J Med 1983; 308:733-740.
277. Steere AC, Malawisia Se: Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. Ann Intern Med 1979;91:730-733.
278. Steere AC, et al: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheum 1977;20:7-17.
279. Steere AC, et al: The clinical evolution of Lyme arthritis. Ann Intern Med 1987; 107:725-731.
280. Steere AC, et al: Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein. A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med 1998;339:209-215.

281. Steere AC, et al: The overdiagnosis of Lyme disease JAMA 1993;269:1812-1816.
282. Steere AC, et al: Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. J Infect Dis 1986;154:295-300.
283. Stoll BJ, et al: Clinical and serologic evaluation of neonates for congenital syphilis: a continuing diagnostic dilemma. J Infect Dis 1993;167:1093-1099.
284. Strle F, et al: Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. ADD Intern Med 1999;130:32-36.
285. Su SJ, et al: Evaluation of the equivocal test results of *Treponema pallidum* haemagglutination assay. J Clin Pathol 1990;43:166-167.
286. Sundnes KO, Haimanot AT: Epidemic of louse-borne relapsing fever in Ethiopia. Lancet 1993;342:1213-1215.
287. Sutton MY, et al: Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona county with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. J Infect Dis 2001;183:1601-1606.
288. Theisen M, et al: Polymorphism in OspC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. Clin Microbiol 1993;31:2570-2576.
289. Thomas DL, et al: Association of hepatitis C virus infection with false-positive tests for syphilis. J Infect Dis 1994;170:1579-1581.
290. Thompson RS, et al: Outbreak of tick-borne relapsing fever in Spokane county, Washington. JAMA 1969;210:1045-1050.
291. Tramoto EC. Syphilis in adults: from Christopher Columbus to Sir Alexander Fleming to AIDS. Clin Infect Dis 1995;21:1361-1371.
292. Tugwell P, et al: Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1997;127:1109-1123.
293. Van Crevel R, et al: Leptospirosis in travelers. Clin Infect Dis 1994;19:132-134.
294. Van Dam AP, et al: Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. J Clin Microbiol 1999;37:2027-2030.
295. Van Orden AE, Greer PW: Modification of the Dieterle spirochete stain Histo-technology 1977;1:51-53.
296. Villanueva AV, et al: Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998;36:2117-2119.
297. Wallach FR, et al: Circulating *Borrelia burgdorferi* in patients with acute Lyme disease: results of blood cultures and serum DNA analysis. J Infect Dis 1993;168:1541-1543.
298. Wang G, et al: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999;12:633-653.
299. Washburn RG: *Spirillum minor* (Rat-bite fever). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.: Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th Ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2155-2156.
300. Watt G, et al: The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages. J Infect Dis 1988;157:840-842.
301. Weber K, et al: *Borrelia burgdorferi* in a newborn despite oral penicillin for Lyme borreliosis during pregnancy. Pediatr Infect Dis J 1988;7:286-289.
302. Wendel GD: Gestational and congenital syphilis. Clin Perinatol 1988;15:287-303.
303. Wormser GP, et al: A limitation of 2-stage serological testing for Lyme disease: enzyme immunoassay and immunoblot assay are not independent test. Clin Infect Dis 2000;30:545-548.
304. Wormser GP, et al: Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. The Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000;31(Suppl 1):1-14.
305. Yasuda PH, et al: Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for SCVCD new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol 1987;37:407-415.
306. Zarakolu P, et al: Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. J Clin Microbiol 2002;40:3064-3005.
307. Zbinden R, et al: Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. J Clin Microbiol 1994;32:1795-1798.
308. Zenker PN, Rolfs RT: Treatment of syphilis. 1989. Rev Infect Dis 1990;12(Suppl 6):S590-S609.

Micología

Pacientes con riesgo de contraer infecciones micóticas

Signos y síntomas generales que sugieren infección micótica

Clasificación clínica de las infecciones micóticas

Términos comunes en micología

Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones micóticas

Recolección y transporte de la muestra

Procesamiento de la muestra

Examen directo

Preparación en fresco para estudio

Selección e inoculación de medios de cultivo

Incubación de los cultivos para hongos

Procedimientos de laboratorio para la identificación presuntiva de aislamientos de hongos

Importancia de la identificación del género o la especie en el laboratorio

Identificación del género y la especie de los principales grupos de hongos

Especies de *Zygomycetes* y zigomicosis

Histopatología de las infecciones causadas por zigomicetos

Hongos filamentosos hialinos e hialohifomicosis

Especies de *Aspergillus* y aspergilosis

Presentación en el laboratorio

Morfología de la colonia

Características microscópicas

Aspergillus fumigatus

Aspergillus flavus

Aspergillus niger

Aspergillus terreus

Aspergillus nidulans

Histopatología

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Otros hongos filamentosos hialinos de crecimiento rápido

Características de las colonias

Géneros de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en cadenas

Especies de *Penicillium*

Especies de *Paecilomyces*

Especies de *Scopulariopsis*

Identificación de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en racimos

Especies de *Acremonium*

Especies de *Fusarium*

Especies de *Gliocadium*

Especies de *Trichoderma*

Identificación de los géneros de hialohifomicetos productores de conidios aislados

Especies de *Scedosporium*

Especies de *Chrysosporium*

Especies de *Sepedonium*

Especies de *Beauveria*

Identificación de los dermatófitos

Identificación de especies de *Microsporum*

Microsporum canis

Microsporum gypsum

Microsporum nanum

Identificación de especies de *Trichophyton*

Trichophyton mentagrophytes

Trichophyton rubrum

Trichophyton tonsurans

Trichophyton verrucosum

Epidermophyton floccosum

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Hongos dimorfos

Blastomyces dermatitidis y blastomicosis

Presentación en el laboratorio

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Coccidioides immitis y coccidioidomicosis

Presentación en el laboratorio

Histoplasma capsulatum e histoplasmosis

Presentación en el laboratorio

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Sporothrix schenckii y esporotricosis

Presentación en el laboratorio

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Paracoccidioides brasiliensis y paracoccidioidomicosis

Presentación en el laboratorio

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Hongos dematiáceos

Agentes de feohifomicosis

Presentación en el laboratorio

Macroconidios con tabiques transversales y longitudinales (muriformes)

Especies de *Alternaria*

Especies de *Ulocladium*

Especies de *Stemphylium*

Especies de *Epicoccum*

Macroconidios con tabiques transversales

Especies de *Bipolaris*

Especies de *Drechslera*

Especies de *Curvularia*

Especies de *Exserohilum*

Macroconidios que nacen de modo individual o por conidiación especial

Especies de *Nigrospora*

Especies de *Phoma*

Especies de *Chaetomium*

Agentes de cromomicosis y micetomas

Cladophialophora (Cladosporium) carrionii

Phialophora verrucosum

Phialophora richardsiae

Fonsecaea pedrosoi

Exophiala jeanselmei

Identificación por el laboratorio de las levaduras

Tubo germinal

Preparaciones a partir del agar harina de maíz

Patrones de crecimiento de las levaduras en agar harina de maíz

CHROMagar

Candida albicans

Candida tropicalis

Candida parapsilosis

Candida kefyr (pseudotropicalis)

Otras especies patógenas emergentes de *Candida*

Especies de *Candida* y candidiasis

Especies que producen hifas verdaderas

Especies que no producen hifas verdaderas

Criptococosis y *Cryptococcus neoformans*

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Otras levaduras de importancia médica que no forman hifas

Candida (Torulopsis) glabrata

Especies de *Rhodotorula*

Especies de *Saccharomyces*

Hansenula anomala

Malassezia furfur

Identificación en el laboratorio de las “levaduras negras”

Aureobasidium pullulans

Phaeoannellomyces werneckii

Sistemas comerciales para la identificación de levaduras

Pruebas de sensibilidad a los antimicóticos (antifungigrama)

Diagnóstico serológico de las enfermedades micóticas

El diagnóstico de una infección micótica requiere la colaboración entre el médico de atención primaria, el anatomopatólogo quirúrgico y el microbiólogo. El médico de atención primaria es responsable de evaluar los signos y los síntomas de las infecciones micóticas, y de investigar el tipo de muestras adecuadas para recolectar y transportar al laboratorio en condiciones óptimas sin retraso. El anatomopatólogo quirúrgico debe estar alerta a las reacciones del tejido que hacen pensar en una infección micótica o debe poder reconocer los elementos micóticos en cortes teñidos de tejido. El micólogo del laboratorio es responsable de llevar a cabo las técnicas de laboratorio para el aislamiento óptimo de hongos por cultivo y realizar las identificaciones precisas de género y especie.

Pacientes con riesgo de contraer infecciones micóticas

- Individuos inmunodeprimidos o que presentan reducción de la cantidad o alteraciones de la función de los leucocitos polimorfonucleares circulantes.
- Receptores de trasplantes de órganos, en especial durante el período de inmunosupresión posterior al trasplante.
- Pacientes con neoplasias malignas, en especial los afectados por leucemia y linfoma, más aún durante los períodos de quimioterapia.
- Pacientes con diversos trastornos inmunitarios y metabólicos debilitantes, como lupus eritematoso sistémico y otras colagenopatías, diabetes mellitus, alteraciones de las γ -globulinas, alcoholismo y drogadicción intravenosa.
- Pacientes que recibieron tratamientos con corticosteroides, agentes citotóxicos o antibióticos durante un tiempo prolongado.
- Residentes o viajeros hacia regiones del mundo conocidas como endémicas de ciertas infecciones micóticas.
- Participantes en actividades u ocupaciones que implican el contacto directo de la piel con animales infectados, con materiales contaminados o ambos, o que presentan riesgo de ingestión o inhalación de aerosoles o polvo contaminados con esporas de hongos.

Sobre esta base, una revisión reciente de Nucci¹⁹⁹ hace hincapié en que la incidencia de infecciones por hongos filamentosos que no pertenecen al género *Aspergillus* ha aumentado durante la última década, en especial en los receptores de trasplantes. Según sugieren los datos epidemiológicos recientes, una causa fundamental parece ser la profundidad mayor de la inmunosupresión en los protocolos cambiantes de trasplantes. Estas infecciones micóticas tienden a diseminarse y el pronóstico suele ser desfavorable porque los hongos son resistentes a la mayoría de los agentes antimicóticos disponibles.

Signos y síntomas generales que sugieren infección micótica

- Los síntomas de presentación tempranos que suelen llevar a la sospecha de una infección micótica son atípicos, vagos e inespecíficos, lo que reduce la posibilidad de realizar el diagnóstico clínico correcto.
- Algunos síntomas frecuentes son fiebre de baja intensidad, sudores nocturnos, pérdida de peso, lasitud, fatiga fácil, tos y dolor torácico.
- Las micosis profundas o diseminadas pueden asemejarse a otras infecciones, como tuberculosis, brucelosis, sífilis, sarcoidosis y carcinomatosis diseminada.

- Siempre debe realizarse el examen cuidadoso de la piel y las mucosas, ya que las micosis sistémicas a menudo se acompañan de lesiones mucocutáneas.
- Las lesiones ulcerosas del intestino, la laringe, la faringe, los órganos genitales y la lengua pueden complicar la histoplasmosis diseminada hasta en el 50% de los casos.
- Los pacientes con blastomycosis pueden presentar al comienzo lesiones cutáneas verrugosas o pustulosas o granulomas ulcerados de las mucosas laríngea,⁶⁶ esofágica y bucal, incluso con afectación de la lengua.²⁰⁷
- La coccidioidomicosis en el SIDA puede presentarse como lesiones cutáneas papulares o maculares.²²⁶
- En el cuadro 21-1 se mencionan los signos, los síntomas y los agentes probables de las micosis pulmonares.
- Los signos, los síntomas y los agentes probables de las micosis extrapulmonares se resumen en el cuadro 21-2.
- Los hallazgos de laboratorio inespecíficos, como el aumento de la velocidad de eritrosedimentación, el aumento de la proteína C-reactiva, las elevaciones de la γ -globulina, o las elevaciones de baja intensidad y persistentes de los neutrófilos, los monocitos o ambos de sangre periférica pueden proporcionar los indicios iniciales para sospechar una infección micótica.

Clasificación clínica de las infecciones micóticas

Desde una perspectiva amplia, las micosis pueden denominarse “superficiales” o “profundas” (o “sistémicas”). Sin embargo, esta clasificación ya no sirve para las necesidades de la práctica clínica, dado que varias especies de hongos considerados productores de enfermedad “superficial” pueden causar enfermedad diseminada. Por eso fueron surgiendo varios términos específicos con los que los médicos y los micólogos se comunican mejor.

Los términos **profundo** y **sistémico** clásicamente se referían a un grupo de micosis causadas por agentes que en esencia pueden ser muy virulentos, invadir profundamente los tejidos y los órganos y diseminarse por todo el cuerpo. Hasta hace poco, la mayoría de estas infecciones eran ocasionadas por hongos dimorfos, es decir, las especies que existen en la forma de hongos filamentosos en el ambiente (“la temperatura de incubación ambiente”), pero como levaduras cuando se incuban a 35-37 °C (la temperatura del cuerpo). En la actualidad, debido al aumento del número de individuos inmunosuprimidos o que presentan una afección intensa de la inmunidad celular, otros agentes micóticos, considerados antes sólo como “saprófitos” o “contaminantes” son ahora agentes de enfermedad sistémica. Un excelente ejemplo es el hongo filamentoso hialino *Penicillium marneffii*, que causa infección reticuloendotelial diseminada que se asemeja desde el punto de vista clínico y anatomopatológico a la histoplasmosis.

El término **oportunista** se utiliza ahora para describir a los hongos “no patógenos” que pueden causar infecciones subcutáneas y diseminadas. Estos hongos presentan una capacidad de virulencia baja o limitada; no obstante, pueden causar enfermedad local o diseminada en los drogadictos intravenosos, los debilitados, los inmunodeprimidos o los portadores de dispositivos intravasculares o protésicos. Las especies de *Aspergillus*, de *Candida* y de *Zygomycetes* (mucormicosis) son los tres grupos de hongos considerados clásicamente oportunistas. En los últimos tiempos, las infecciones localizadas y profundas se han atribuido a varias otras especies de hongos filamentosos claros (hialinos) y oscuros (dematiáceos) de crecimiento rápido antes

Cuadro 21-1 Signos y síntomas de las micosis pulmonares

TIPO DE INFECCIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS
General	Síndrome gripal transitorio o neumonía localizada en un lóbulo o diseminada a otros en la infección temprana Tos, producción mínima de esputo, disnea, taquipnea, hemoptisis Dolor torácico, con frecuencia de naturaleza pleurítico En la auscultación pueden detectarse estertores, roncus y frote pleural La radiografía de tórax puede revelar infiltrados pulmonares pequeños y adenopatías hilares u opacidades más difusas y confluentes
Broncopulmonar alérgica	Síntomas característicos del asma: tos no productiva, sibilancias, opresión en el tórax Episodios de broncoespasmo Atelectasia segmentaria causada por el taponamiento de los bronquiólos por el moco Cristales de Charcot-Leyden y eosinófilos en el esputo; eosinofilia de sangre periférica Reacción de hipersensibilidad cutánea a los antígenos de especies de <i>Aspergillus</i> Concentración elevada en suero de IgE y anticuerpos IgG contra <i>Aspergillus</i>.
Bola micótica	Crecimiento de la colonia del hongo dentro de una cavidad preexistente Hemoptisis, a pesar de la escasa o ninguna invasión de la pared de la cavidad La diseminación es rara, incluso en los pacientes que reciben corticosteroides
Invasora	Síntomas de neumonía aguda. Fiebre ondulante de baja intensidad La tos puede ser productiva o no; el dolor torácico suele estar presente Disnea progresiva La hemoptisis puede indicar infarto y necrosis del parénquima La radiografía de tórax puede revelar un infiltrado difuso que se irradia desde los hilios, fibrosis nodulillar fina, abscesos multifocales o cavitación, lo que depende de la especie del hongo. Indicios de agentes específicos: Fibrosis como "semillas de mijo": histoplasmosis Lesión periféricas numulares: coccidioidomicosis Lesiones cavitarias: histoplasmosis o coccidioidomicosis Bolas micóticas: aspergilosis, pseudoalergias, zigomicosis Enfermedad broncopulmonar alérgica: <i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>

consideradas contaminantes. Con la comprensión de que diversas especies micóticas pueden causar casi todas las formas clínicas de micosis, Ajello ^{5,6} ha sugerido los términos genéricos de **feohifomicosis** y **hialohifomicosis** en referencia a los hongos saprófitos que aparecen oscuros o negros en los cultivos (dematiáceos) y que producen hifas incoloras y transparentes (hialina), respectivamente. Esta terminología evolucionó para eliminar la necesidad de usar los términos peniciliosis, fusariosis y curvulariosis en referencia a cada una de la miríada de especies oportunistas de hongos que en ocasiones actúan como agentes de infecciones micóticas. Así, los términos globales de feohifomicosis y hialohifomicosis también liberan al médico de tener que recordar los nombres de muchos agentes micóticos específicos que sólo se encuentran rara vez en la práctica clínica.

Términos comunes en micología

Antes de continuar, deben definirse algunos otros términos que se utilizan en este libro. La palabra **micología** proviene del griego *mykes*, la contraparte directa de la palabra latina *fungus*, que a su vez se considera una modificación de la palabra griega *sponges*, de la cual proviene "esponja". **Zigomicosis** ha reemplazado el término **ficomicosis** más antiguo para hacer referencia a las enfermedades micóticas causadas por este

grupo importante de hongos oportunistas. El prefijo "zigo" proviene del griego *zygon*, para indicar una fusión o unión a la manera de un yugo. Esta derivación se refiere a la fase sexual de reproducción en la que hay una unión o fusión de las dos células sexuales independientes para formar la zigospora. La designación anterior, ficomiceto (del griego *phykos* para significar "alga marina") para este grupo de hongos se ha reemplazado más correctamente por el término zigomiceto. La **mucoromicosis** también es un término más antiguo para este grupo de enfermedades micóticas, derivado del término utilizado para el orden "Mucorales" del latín *mucere*, que significa "mohoso". El término **anamorfo** se refiere a la reproducción asexual de los hongos, mientras que **teleomorfo** alude a la forma sexual de reproducción en que cada célula nueva se origina de la unión de dos células separadas. La mayoría de los micólogos consideran que cada hongo tiene una fase sexual que puede manifestarse si se le proporcionan las condiciones medioambientales y nutricionales adecuadas.

En un contexto amplio, los hongos son miembros del reino vegetal que están desprovistos de hojas, tallos o raíces. Los hongos son **eucariontes**, es decir, cada célula tiene un núcleo, membrana nuclear, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias. También tienen una pared celular rígida compuesta por quitina (*N*-acetil-D-glucosamina unida por enlaces glucosídicos β 1-4), mananos (polímeros de glucosa en los

Cuadro 21-2 Signos, síntomas y agentes etiológicos probables de las micosis extrapulmonares	
TIPO DE INFECCIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS
Cutánea	Lesiones superficiales descamativas, que varían en tamaño, forma y color, del tórax o de la espalda: tiña versicolor secundaria a la infección por <i>Malassezia furfur</i> Prurito, lesiones descamativas conocidas como tiña: dermatofitosis Afección fungoide exofítica e hiperqueratósica que produce engrosamiento y costras conocida como tiña fávica: <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>T. violaceum</i> y <i>T. schoenleinii</i> Lesiones descamativas o con costras limitadas a las zonas intertriginosas húmedas de piel sugieren infecciones por levaduras: <i>Candida albicans</i> Infección pustular subcutánea primaria en el sitio de inoculación, con diseminación proximal y evolución de úlceras cutáneas secundarias a lo largo de los trayectos linfáticos: <i>Sporothrix schenckii</i> . Pústulas que no curan, úlceras o fístulas: enfermedades micóticas diseminadas por hongos dimorfos y micetomas secundarios a una diversidad de hongos Lesiones purpúricas y quistes subcutáneos: feohifomicosis Lesiones fungoides, hemorrágicas y con cambio de coloración: cromomicosis
SNC	Comienzo insidioso de cefaleas que aumentan en frecuencia e intensidad, acompañado por náuseas, irritabilidad y torpeza; criptococosis Meningitis y meningoencefalitis: zigomicosis, en especial en diabéticos. Abscesos cerebrales: <i>Xylophyla bantiana</i> , otros hongos dematiáceos; especies de <i>Aspergillus</i>
Urinaria	Pielitis y pielonefritis asociadas con la administración prolongada de antibióticos, corticosteroides, inmunosupresores, fármacos antineoplásicos y la inserción durante períodos prolongados de sondas urinarias, en especial en mujeres mayores: candidiasis Piuria limitada, dolor abdominal en hipogastrio, polaquiuria: cistitis no bacteriana en mujeres de mediana edad: <i>Torulopsis glabrata</i>
Ocular	Conjuntivitis, infecciones de la córnea y queratoconjuntivitis: especies de <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Acremonium</i> y otros. Las infecciones intraoculares, por lo general secundarias a traumatismo o cirugía ocular: <i>Candida albicans</i> , especies de <i>Aspergillus</i> o de <i>Zygomycetes</i>
Endocarditis	Fiebre de baja intensidad, soplos cardíacos, vegetaciones en la ecocardiografía: especies de <i>Candida</i> , de <i>Aspergillus</i> , de <i>Paecilomyces</i>
Sinusitis	Dolor facial e hiperemia cutánea, cefalea, fiebre de baja intensidad, evidencia radiográfica de senos paranasales ocupados o con niveles líquidos: <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , especies de <i>Alternaria</i> y <i>Pseudallescheria boydii</i>

enlaces glucosídicos α o β (1-4) y a veces celulosa. Estos constituyentes de la pared adsorben varios colorantes, lo cual permite la aplicación de diversas tinciones especiales por las que pueden identificarse en las preparaciones en fresco y en los cortes de tejidos en el laboratorio.

Las formas de hongos que tienen una sola célula se conocen como **levaduras**; las que presentan múltiples células que forman un micelio filamentosos se denominan **hongos filamentosos** (mohos). Los hongos se reproducen por **esporas**, ya sea de modo sexual o asexual, que pueden originarse directamente del micelio vegetativo (**artrosporas**, **clamidosporas**, **blastosporas**) o de la superficie de cuerpos de fructificación aéreos especiales (**conidios**). La morfología, la disposición y el modo de origen de las esporas sirven como criterios importantes por los cuales puede hacerse la identificación de género y especie. En el recuadro 21-1 se presentan otros términos utilizados en el proceso diagnóstico del laboratorio para los hongos.

Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones micóticas

Una vez que se reconoce un hongo en el cultivo, primero se realiza una identificación presuntiva basada en el examen

visual de la morfología de la colonia o de las observaciones microscópicas de una preparación directa en fresco. Con la identificación presuntiva presente, puede consultarse al médico de cabecera para determinar si la historia clínica exige la identificación completa de género o especie.

Aunque la mayoría de las identificaciones de los hongos se basa sobre todo en la evaluación de la morfología de la colonia y de las características microscópicas, pueden requerirse pruebas bioquímicas especiales para diferenciar entre géneros o especies estrechamente relacionadas dentro de un grupo dado. Cada vez con más frecuencia se están utilizando ensayos con sondas de ácidos nucleicos para proporcionar una confirmación temprana del cultivo en los casos sospechosos de micosis profundas. En algunos casos se requieren estudios serológicos para establecer el diagnóstico clínico definitivo, evaluar el estado de una micosis diagnosticada con anterioridad o determinar la eficacia del tratamiento. Por consiguiente, en este capítulo se establecerán pautas para ayudar al micólogo a realizar estas diversas tareas y ampliar las observaciones del laboratorio para incluir evaluaciones de los parámetros clínicos y los criterios histopatológicos que deben entrecruzarse para realizar el diagnóstico definitivo.

La identificación definitiva de un hongo en el laboratorio depende de la visualización de la morfología de la colonia y las

Recuadro 21-1 Términos útiles en el examen de los hongos

La unidad microscópica fundamental de un hongo es la estructura en forma de hebra denominada **hifa**. Varias hifas se combinan para formar la maraña de crecimiento conocida como **micelio**. Las hifas que se subdividen en células individuales por paredes o tabiques transversales se denominan **tabicadas**; las que no los tienen se denominan **sin tabiques**. Las pseudohifas se forman a partir de un alargamiento de las células levaduriformes que emiten un brote (**blastoconidio**) y muestra estrechamientos similares a una ristra de salchichas entre los segmentos (fig. 21-1).

La porción del micelio que se extiende en el sustrato del medio de cultivo y determina la absorción del agua y los nutrientes es el **micelio vegetativo**; la porción que se proyecta sobre el sustrato es el **micelio aéreo**, también denominado **micelio reproductor**, ya que de esta porción se originan esporas especiales o cuerpos de fructificación productores de conidios.

La identificación y la clasificación de los hongos se basan sobre todo en las diferencias morfológicas en las estructuras reproductivas y en la manera en que las esporas o los conidios se forman a partir de células especializadas denominadas **células conidiógenas**.

En las especies de hongos de importancia médica suelen observarse tres tipos generales de reproducción: esporulación **vegetativa**, esporulación **aérea** y esporulación **sexual**.

Reproducción vegetativa

Tres tipos de esporas o conidios pueden formarse directamente del micelio vegetativo: **blastoconidios**, **clamidioconidios** y **artroconidios** (el término antiguo para las esporas vegetativas era **talosporas**). El término **espora** debe reservarse para los elementos reproductivos que se originan por meiosis (reproducción sexual), como ascosporas, oosporas o zigosporas, o por mitosis (reproducción asexual) dentro de un esporangio (como en los **zigomicetos**). El término **endospora** también se usa para las esporas producidas dentro de un espacio confinado (la forma tisular de *Coccidioides immitis*, por ejemplo). Todas las otras esporas "asexuales" son conidios.

Blastoconidios son las formas tan conocidas que producen brotes de las levaduras. En el punto en el cual el conidio se desprende queda una cicatriz del brote (disyuntor).

Los **clamidioconidios** (clamidosporas) se forman a partir de células preexistentes en la hifa, que se engrosa y a menudo se agranda. Aunque **clamidioconidios** es el término correcto, se utiliza **clamidosporas** en la mayoría de los círculos de laboratorio clínicos. Las clamidosporas pueden encontrarse dentro de la hifa (**intercalar**), junto a uno de sus lados (**sésil**) o en su extremo (**terminal**). Este tipo de conidiación es característico de *Candida albicans*.

Los **artroconidios** también se forman de células preexistentes en las hifas que se agrandan y engrosan. Cuando maduran, estos conidios se liberan por la lisis de las células adyacentes de la hifa. Este tipo de esporulación es característico de la forma filamentosa de *Coccidioides immitis* y de especies de *Geotrichum*, entre otros.

Reproducción aérea

De las hifas se originan y se extienden por la superficie del micelio cuerpos de fructificación especializados que dan lugar a una variedad de esporas o conidios. Los cuerpos de fructificación pueden formar bolsas cerradas denominadas **esporangios**, dentro de los cuales se producen las esporas conocidas como **esporangiosporas**. El segmento especializado de la hifa que sostiene o sirve de apoyo al esporangio se denomina **esporangióforo** (el sufijo "foro" [del griego *phoros*], "que sostiene") (fig. 21-2). Este tipo de esporulación es característico de *Zigomycetes*. Muchos otros hongos producen cuerpos de fructificación elaborados que dan origen a las esporas formadas desde la superficie, para las cuales se aplica el término **conidios** (polvo). El segmento especializado de la hifa que sostiene la cabeza de fructificación que tiene los conidios se llama **conidióforo** (fig. 21-2).

Los conidióforos pueden ramificarse en segmentos secundarios denominados **métulas**, que a su vez forman segmentos productores de conidios: las **fiálides**. Esta propiedad de ramificarse en métula y fiálides es característica del cuerpo de fructificación digitiforme de las especies de *Penicillium*. Las fiálides por definición son células conidiógenas que producen conidios desde un locus dentro de su ápice, que no aumenta de ancho ni de longitud durante la conidiogénesis. Esto es diferente de la formación del **anélido**, en el cual la punta de la fiálide se extiende y se retrae cíclicamente cuando se forman los conidios, lo que deja una sucesión de cicatrices o anillos. Los conidios de las especies de *Scopulariopsis*, por ejemplo, son **anelidoconidios**; es decir, se forman en una secuencia basípeta en la cual la parte conidiógena de cada conidio se alarga en el momento en el que se forma uno nuevo, luego se contrae para formar una **cicatriz anular**, **anillo o collar** en la base truncada. Los conidios pueden ser individuales, en cadenas largas (**catenulados**) o en grupos firmemente unidos. **Acrópeta** es un término para describir el proceso de formación de la cadena en que cada nuevo conidio se origina a continuación del anterior, de modo que la célula más joven esté en el ápice (especies de *Penicillium*, por ejemplo), en contraste con la **esporulación basípeta**, en el que cada conidio nuevo se forma en la base de la cadena y empuja a los otros conidios de la cadena hacia adelante, de modo que la célula más vieja queda en el ápice (especies de *Paecilomyces*).

Una única célula diminuta de los conidios, originada directamente de los lados de la hifa o sujeta por un conidióforo del tipo de un pelo, se denomina **microconidio**, en contraposición al **macroconidio**, mucho más grande y multicelular que asume diversos tamaños y formas. Un macroconidio que se encuentra dividido por tabiques transversales y longitudinales, que da un aspecto de mosaico, es una **dictiospora**, denominado con más frecuencia **muri-forme** (porque recuerda a una pared de piedra). El término **aleuriospora** se refiere a un conidio, por lo general un macroconidio, que está adherido a la hifa por una célula de apoyo que se fractura cuando el conidio se libera (p. ej., *Microsporum canis*).

(Continúa)

Recuadro 21-1 Términos útiles en el examen de los hongos (cont.)**Esporulación sexual**

El esporulación sexual requiere la fusión y la recombinación nuclear de dos células fértiles especializadas (cada una de las cuales ha sufrido el proceso de meiosis) que se origina sobre las hifas aéreas. Si las células reproductivas se originan por la fusión de células morfológicamente idénticas, a menudo de la misma hifa (homotálica), la espora se denomina **zigospóra**, característica de *Zigomycetes*. Si la fusión de las células reproductivas proviene de dos células diferentes, a menudo originadas de segmentos separados de hifas, la espora resultante se denomina **oospóra** (fig. 21-3).

Las esporas sexuales de varios miembros de la clase **Ascomycetes** ya mencionados, que tienen importancia médica se denominan **ascosporas**. Por ejemplo, ciertas cepas de las especies de *Aspergillus*, notablemente de los grupos *A. nidulans* y *A. glaucus*, producen estructuras cerradas y grandes, como una bolsa, denominadas cleistotecios, que a su vez contienen estructuras más pequeñas, con forma de sacos, conocidas como ascos (fig. 21-3). Dentro de cada asco se observan cuatro ascosporas, producto de la división meiótica. Los hongos importantes desde el punto de vista médico, distintos de las especies de *Aspergillus*, en los que puede observarse la esporulación sexual incluyen especies de *Saccharomyces* y *Pseudallescheria boydii* (fig. 21-3).

La forma sexual de un hongo se conoce como **teleomorfo**, en contraste con el término **anamorfo**, que se refiere a las diversas formas reproductivas asexuales o estructuras producidas por un hongo imperfecto (como filídes, anélidos o cadenas ramificadas). Así, por ejemplo, *Pseudallescheria boydii* es el teleomorfo de esta especie y pueden observarse varias formas "perfectas" como cleistotecios, ascos y ascosporas. *Scedosporium monosporium* es la forma imperfecta de esta especie, que produce principalmente conidios unicelulares anamorfos.

características microscópicas, que se tratarán después con mayor detalle. Deben llevarse a cabo varias prácticas y procedimientos previos para asegurar que el aislamiento en el cultivo sea óptimo. Cualquier interrupción en la cadena de eventos, comenzando con la recolección inadecuada de la muestra, la falta de conservación durante el traslado, el retraso del procesamiento una vez recibida en el laboratorio y, por último, la inoculación a medios de cultivo primarios para hongos seleccionados de modo incorrecto ponen en peligro las posibilida-

des de hacer la identificación final. También deben implementarse pautas para el estudio microscópico de un aislamiento desconocido y la selección apropiada de pruebas diferenciales cuando sean necesarias para hacer una identificación importante de género y especie. Los párrafos que siguen detallan estos pasos.

Cuando sea adecuado, también se incluirán secciones breves para describir los métodos que no usan cultivos para establecer la identidad de especies determinadas de hongos, mediante técnicas que utilizan anticuerpos y antígenos, ya sea por métodos convencionales como por otros más nuevos basados en la biología molecular. Con vista al futuro, cabe mencionar que la secuenciación de ácidos nucleicos es promisorio para convertirse en el método estándar para la identificación de los hongos en los "laboratorios de referencia."¹¹ En este momento, debido a la especialización técnica requerida y al costo de instrumen-

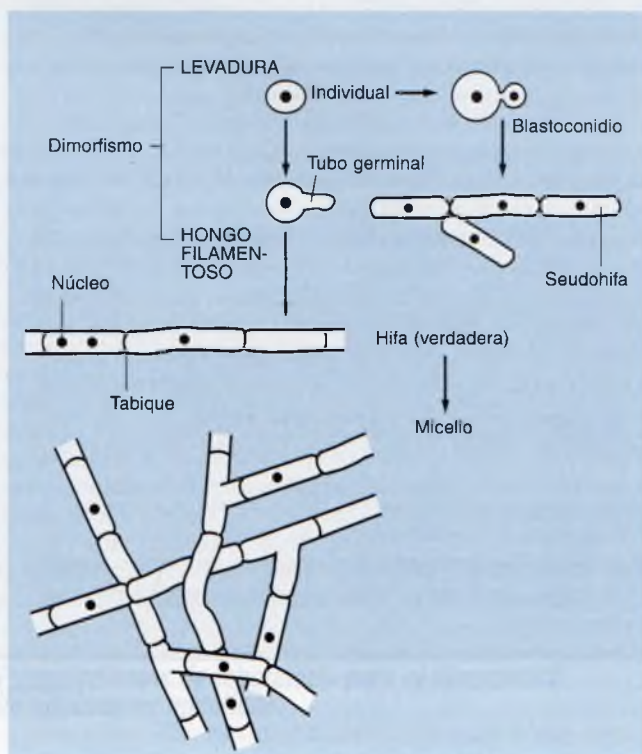


Figura 21-1 Esquema que ilustra las estructuras básicas de los hongos.

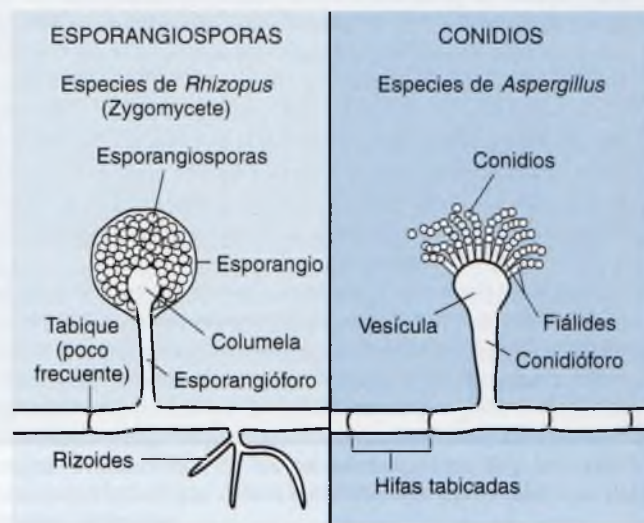


Figura 21-2 Esquemas que ilustran las estructuras del micelio aéreo y la reproducción asexual.

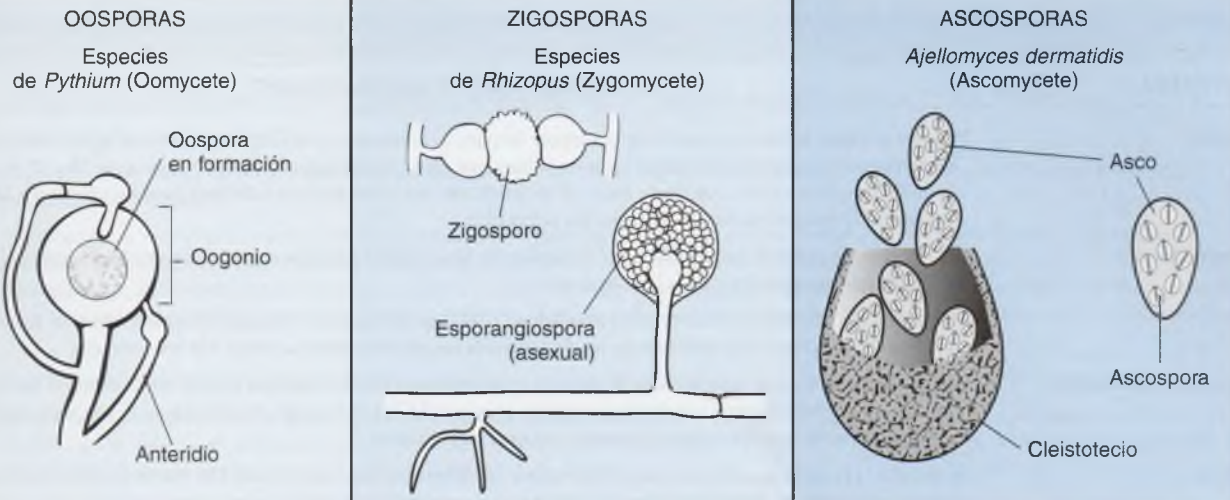


Figura 21-3 Esquemas que ilustran las estructuras de la reproducción sexual.

tación y suministros, esta técnica no se implementa en los laboratorios más pequeños en los que sólo se realizan prácticas básicas.

El único sistema que se comercializa en la actualidad es el equipo para secuenciación de la subunidad grande del rDNA de los hongos Applied Biosystems (Foster City, CA) MicroSeq D2. Un estudio del uso de la secuenciación de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras reveló que permitía identificar el 98% de 19 especies diferentes de *Candida* observadas en el laboratorio clínico en comparación con la identificación por métodos fenotípicos.¹¹⁰ La secuenciación de DNA identificó 32 aislamientos de levaduras que pertenecen a nueve géneros, incluso *Trichosporon*, *Cryptococcus* y otros. Alrededor del 81% se identificó correctamente y la principal razón para la mayoría de las identificaciones incorrectas fue el resultado de la falta de entradas de datos en la genoteca que contiene las secuencias de muchas levaduras.

En otro estudio realizado en la Clínica Mayo para determinar la utilidad de la secuenciación para la identificación de los hongos filamentosos, la secuenciación del ácido nucleico y los métodos fenotípicos identificaron 234 aislamientos (67,5%) al nivel correcto de género o especie.¹¹¹ Las identificaciones incorrectas se debieron sobre todo a la lista incompleta de secuencias en la base de datos. Cada laboratorio puede construir una base de datos personalizada de secuencias, lo que incrementa en gran medida la precisión del diagnóstico. Esta técnica es muy promisoría para simplificar la identificación de levaduras y hongos filamentosos aislados en muestras clínicas, así como de los que son importantes para la industria y la agricultura. Sin duda, en el futuro puede convertirse en el estándar para la identificación de los hongos.

Recolección y transporte de la muestra

En el capítulo 2 se dieron las pautas generales para la recolección y el transporte de muestras para el cultivo. En el cuadro 21-3 se presentan las pautas para la recolección de diversos tipos de muestras. Médicos, enfermeras, personal de guardia y técnicos del laboratorio deben trabajar juntos en la elaboración de protocolos que aseguren la recolección adecuada y el transporte rápido de muestras remitidas para cultivos de hongos. La

selección correcta de los dispositivos para la recolección y de los recipientes de transporte, el pegado de etiquetas que incluyan la información pertinente del paciente y el establecimiento de un medio de comunicación para solicitudes especiales son tal vez las consideraciones más importantes para asegurar el diagnóstico exacto de las infecciones micóticas.

Las muestras deben remitirse al laboratorio rápidamente. Las que no se procesan de inmediato deben mantenerse a temperatura ambiente. *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* no sobreviven bien en muestras congeladas o en hielo. Varias especies de hongos, incluso las especies antedichas y las especies de *Aspergillus* pueden aislarse en muestras que han estado en tránsito durante 16 días siempre que no sufran desecación; por consiguiente, siempre debe hacerse el intento de aislar los hongos aun cuando el procesamiento se retrase.²⁴³ Deben usarse recipientes de transporte estériles y sellados para todas las muestras líquidas o húmedas. Los raspados de piel, los fragmentos de uñas y los pelos pueden transportarse en seco en un sobre, caja de Petri u otro vehículo conveniente. Para reducir el crecimiento de bacterias comensales posiblemente presentes en las muestras no estériles en las que puede retrasarse el procesamiento o deben enviarse por correo a un laboratorio de referencia, puede agregarse penicilina (20 U/mL), estreptomycin (100 000 µg/mL) o cloranfenicol (0,2 mg/mL). En el capítulo 2 se describen las directivas para el envase y rotulado adecuados de las muestras que deben transportarse o enviarse por correo.

Los criterios por los que una muestra se considera inaceptable para el cultivo y se rechaza deben registrarse en el protocolo del laboratorio. En el recuadro 21-2 se presentan criterios de rechazo seleccionados y las acciones para tomar cuando se procesan muestras inaceptables. Estos criterios también deben ser considerados por médicos, enfermeras y el personal asignados para recolectar la muestra, ya que no sólo se ahorrará tiempo y dinero en el laboratorio de micología, sino que puede evitarse un retraso inaceptable para establecer el diagnóstico. Deben determinarse criterios individuales dentro de cada ámbito de práctica para adaptarse a la situación local. Con experiencia, el individuo que obtiene la muestra puede hacer una observación preliminar del material obtenido y recolectar de inmediato una segunda muestra si lo cree necesario.

Cuadro 21-3 Recomendaciones de la American Thoracic Society para la recolección de muestras para el cultivo de hongos	
MUESTRA	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO
Espujo	Debe recolectarse la primera muestra de la mañana después de levantarse, pero antes del desayuno. Se les indica a los pacientes que se enjuagen en forma vigorosa la boca con agua inmediatamente antes de expectorar 15 a 30 mL de espujo en un recipiente estéril, con tapa a rosca. Si no puede obtenerse una muestra suficiente puede ser necesaria la inducción del espujo con una nebulización con solución salina tibia
Broncoscopia	Las muestras de cepillado bronquial, biopsia o líquido de lavado broncoalveolar deben transportarse enseguida al laboratorio en recipientes estériles y con cierre hermético En algunos laboratorios se utiliza el caldo Middlebrook 7H11 como medio de transporte porque también se conservarán las micobacterias. Cuando sea posible debe recolectarse una muestra de espujo posterior a la broncoscopia
Líquido cefalorraquídeo	Para el cultivo de hongos debe usarse tanto líquido cefalorraquídeo (LCR) como sea posible. Si se retrasa el procesamiento, las muestras deben dejarse a temperatura ambiente porque el LCR es un medio de cultivo líquido adecuado en el que los elementos micóticos pueden sobrevivir hasta que sean subcultivados
Orina	Se prefiere la primera muestra de orina de la mañana; son aceptables muestras al azar. Las muestras deben recolectarse de modo aséptico en recipientes estériles, con tapa a rosca y enviarse de inmediato para su procesamiento. Si se prevé un retraso para el procesamiento de más de 2 horas, la muestra de orina debe refrigerarse a 4 °C para inhibir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido
Secreciones prostáticas	Algunas micosis profundas, en especial blastomicosis y, con menos frecuencia, histoplasmosis o coccidioidomicosis, pueden diagnosticarse mediante la recolección de secreciones prostáticas. Primero se vacía la vejiga, seguido por el masaje prostático. Las secreciones deben inocularse directamente en los medios de cultivo para hongos apropiados; también, deben recolectarse 5-10 mL de orina en un recipiente separado
Exudados	Debe desinfectarse la piel que recubre las lesiones pustulosas y los exudados aspirados mediante una aguja y jeringa estériles. La jeringa también puede servir como recipiente de transporte si la aguja se tapa. Puede ser necesaria la biopsia de la lesión si el aspirado no muestra la presencia de hongos
Piel, uñas y pelos	Primero, limpiar el área de la piel con alcohol al 70% para eliminar de la superficie los contaminantes bacterianos. La muestra se toma del borde de crecimiento periférico y eritematoso de las lesiones típicas de la tiña, raspando con el borde de un portaobjetos o de una hoja de bisturí. Las muestras de las uñas infectadas deben tomarse de la parte inferior de la uña para obtener el material ablandado del lecho ungular. Si esto no es posible, debe rasparse lejos de la superficie de la uña antes de recolectar rasurados colectivos de las porciones más profundas. Los pelos deben recolectarse de las áreas de descamación o alopecia, u obtener aquellos que presentan fluorescencia cuando se observan con la lámpara ultravioleta de Wood (longitud de onda larga)
Biopsias de tejidos	Las biopsias del tejido de sitios sospechosos de infección deben transportarse en una gasa estéril humedecida con solución fisiológica estéril no bacteriostática en un recipiente con tapa a rosca. La muestra no debe congelarse ni debe permitirse su deshidratación antes del cultivo
Sangre	Los frascos con medio bifásico agar-caldo, diseñados específicamente para los cultivos de hongos son superiores a los frascos utilizados habitualmente para el aislamiento de patógenos bacterianos. También se recomiendan los sistemas de lisis-centrifugación, como el Isolator (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ), en especial para aislar <i>H. capsulatum</i> y otras levaduras

Procesamiento de la muestra

Una vez recibida por el laboratorio, la muestra debe examinarse lo antes posible. Las muestras de hisopados suelen ser inadecuadas para el aislamiento de hongos filamentosos y también son subóptimas para las levaduras; debe procurarse recibir material aspirado o biopsias de tejido. Deben realizarse preparaciones directas en fresco o frotis, si se considera conveniente, y transferir una porción de la muestra a los medios de cultivo para hongos. Este último paso también es importante en la recuperación final de hongos y no puede descuidarse o delegarse al personal sin la capacitación suficiente. En el cuadro 21-4 se presentan pautas adicionales para el procesamiento y el examen directo de muestras clínicas.

Examen directo

Es muy recomendable realizar el examen microscópico directo de la mayoría de las muestras remitidas para el cultivo

de hongos. No sólo puede brindar un diagnóstico presuntivo inmediato al médico; también puede ayudar en la selección de los medios de cultivo adecuados. La preparación en fresco con tinta china y KOH/calcoflúor, las preparaciones con cintas transparentes teñidas con el colorante de anilina azul de lactofenol y los cortes obtenidos por congelación de biopsias de tejidos son distintos métodos que se utilizan para los exámenes microscópicos directos rápidos.

El microscopio con contraste de fase es un valioso auxiliar en el examen directo de las muestras. Las ventajas son: 1) pueden hacerse las preparaciones en fresco y examinarse rápidamente, 2) no hay necesidad de realizar la tinción directa y 3) los objetos pueden visualizarse con claridad.

PREPARACIÓN EN FRESCO PARA ESTUDIO

La preparación en fresco por disección, la preparación con cinta transparente y la técnica de microcultivo en portaobjetos son los tres métodos que suelen utilizarse para el examen micros-

Recuadro 21-2 Criterios para el rechazo de la muestra

Situación: falta de identificación del paciente en el recipiente o una diferencia entre el formulario de solicitud y el rótulo del recipiente.

Acción: retornar al remitente para la resolución.

Situación: muestra de esputo con > 25 células epiteliales pavimentosas por campo de bajo aumento (criterios para el rechazo de muestras respiratorias remitidas para el cultivo bacteriano).

Acción: los criterios para el rechazo de muestras remitidas para el cultivo bacteriano no necesariamente pueden pertenecer a las muestras para hongos. Pueden aislarse hongos patógenos en estas muestras a pesar de la contaminación oral, en especial si se utilizó un medio de cultivo selectivo que contiene antibiótico. Sin embargo, el informe final debe indicar que había contaminación oral significativa, lo que deja al médico la opción de hacer una interpretación basada en la información clínica u obtener una muestra de mejor calidad si se necesita una diferenciación más clara entre infección respiratoria alta o baja.

Situación: se recibe un hisopo seco o el material recolectado presenta un volumen insuficiente.

Acción: informar a la persona que remite la muestra para que envíe una segunda muestra si es posible. Como criterio general, las muestras con hisopo no son convenientes para el aislamiento de hongos y deben rechazarse, excepto en circunstancias ocasionales. En cambio, puede ser necesaria la aspiración profunda o la biopsia del sitio afectado, lo cual depende de la presentación clínica.

Situación: la muestra se remite en un recipiente inadecuado o en una condición incorrecta (evidencia de secado, pérdida o falta de esterilidad).

Acción: notificar al individuo que remite la muestra acerca de que se ve afectada la posibilidad de obtener resultados relevantes. Si no puede obtenerse una segunda muestra de modo adecuado, la muestra puede procesarse, pero debe indicarse en el informe final que la calidad de la muestra era deficiente y que el resultado sólo puede interpretarse considerando la presentación clínica.

Situación: se recibe una muestra de esputo o de orina de 24 horas para el cultivo de hongos.

Acción: en el protocolo de rechazo debe aclararse que las muestras de esputo y de orina de 24 horas son subóptimas para el aislamiento y la identificación de hongos. Las posibilidades de contaminación con bacterias y hongos filamentosos ambientales son altas, lo que presta a confusión cualquier resultado que pueda obtenerse. Establecer en el protocolo que las muestras de la mañana deben obtenerse en tres días sucesivos. Como sucede con las micobacterias, los hongos también tienden a eliminarse en las secreciones a intervalos intermitentes, lo cual aumenta la posibilidad de aislamiento si se recolectan muestras sucesivas durante 3 días.

cópico de los hongos filamentosos.¹⁴⁷ En cada caso, una porción de la colonia del hongo se coloca con una gota de la anilina azul de lactofenol (colorante azul de algodón) sobre un portaobjetos y se examina con el microscopio. La técnica para llevar a cabo la preparación por disección se presenta en el recuadro 21-3; para la preparación con cinta transparente, en el recuadro 21-4, y para el procedimiento de microcultivo, en el recuadro 21-5. En el recuadro 21-1 se presentan otros términos utilizados durante la secuencia diagnóstica del laboratorio para los hongos.

SELECCIÓN E INOCULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La serie de medios de cultivo para el aislamiento de hongos en muestras clínicas no necesita ser detallada. Aunque la tasa de aislamiento puede aumentarse en cierta medida mediante diversos medios, las consideraciones respecto del costo, el espacio para el almacenamiento y la incubación, y las demandas de tiempo del técnico microbiólogo por lo general determinan, en la mayoría de los laboratorios, un enfoque más conservador.

Dos tipos generales de medios de cultivo son esenciales para asegurar el aislamiento primario de los hongos clínicamente importantes en las muestras clínicas. Un medio no debe ser selectivo (como el agar de infusión de cerebro y corazón), es decir, que permitirá el crecimiento de casi todas las especies de hongos importantes en clínica. Se desalienta el uso del agar dextrosa de Sabouraud como medio de aislamiento primario porque es insuficientemente enriquecido para aislar ciertas especies patógenas con requerimientos nutricionales especiales, sobre todo la mayoría de los hongos dimorfos. Se recomienda el uso de agar con láminas de patata (*potato flake agar*,

PFA), el agar inhibidor de hongos filamentosos (*inhibitory mold agar*, IMA) o la combinación de agar dextrosa de Sabouraud con infusión de corazón (SABHI).¹⁴⁷ El agar dextrosa de Sabouraud es suficiente para el aislamiento de dermatófitos de muestras cutáneas o de levaduras de los cultivos vaginales. Los agares Mycosel o Mycobiotic, que en esencia son agar dextrosa de Sabouraud con el agregado de cicloheximida y cloranfenicol, pueden considerarse para el aislamiento de dermatófitos.

El agar dextrosa de Sabouraud (2%) es muy útil como medio para el subcultivo de hongos aislados en un medio enriquecido para aumentar la esporulación típica y proporcionar la morfología de la colonia más característica. Si la morfología de la colonia es un criterio de identificación importante para cualquier aislamiento desconocido de especies de *Aspergillus* debe usarse el subcultivo en agar de Czepak.

Para el aislamiento de los hongos dimorfos con requerimientos nutricionales especiales, como *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, debe utilizarse un agar base enriquecido como el agar inhibidor de hongos filamentosos, SABHI (agar dextrosa de Sabouraud más agar infusión de corazón) o infusión de cerebro y corazón (con cicloheximida y cloranfenicol). En el cuadro 21-5 se detallan los medios de aislamiento para hongos utilizados con mayor frecuencia, los ingredientes importantes de cada fórmula y las aplicaciones específicas para las cuales está diseñado cada uno. Para el aislamiento óptimo de algunas especies con requerimientos nutricionales especiales, sobre todo *Histoplasma capsulatum*, se recomiendan medios de cultivo con el agregado de 5-10% de sangre de carnero. Si se utilizan estos medios enriquecidos con sangre puede ser necesario subcultivar en un medio menos

Cuadro 21-4 Pautas para el examen directo y el procesamiento de muestras remitidas para cultivos de hongos

Respiratorias	El sistema de graduación de la calidad del esputo descrito en el capítulo 2 no es aplicable a las muestras remitidas para cultivos de hongos. Seleccionar las partes más purulentas o manchadas de sangre de la muestra. Si la muestra es muy viscosa, debe homogeneizarse mediante el agregado de una pequeña cantidad de <i>N</i>-acetil-L-cistina cristalina a la muestra. No deben usarse NaOH u otros agentes que digieren el material utilizado para el procesamiento de muestras para el aislamiento de micobacterias. Realizar la preparación en fresco de la muestra homogeneizada para el examen microscópico directo e inocular alrededor de 0,5 mL a cada uno de los medios de cultivo que se van a usar. Como las secreciones respiratorias a menudo están contaminadas con bacterias, deben usarse medios de cultivo que contengan antibióticos. Se recomienda una combinación de agar no selectivo, como agar inhibidor de hongos filamentosos o agar SABHI y agar inhibitorio, como infusión de cerebro y corazón con cloranfenicol y cicloheximida.
Líquido cefalorraquídeo	Las muestras de LCR pueden centrifugarse a 1 500-2 000 g durante 20 min y el sedimento inoculado en la superficie de medios de cultivo no inhibidores, como agar inhibidor de hongos filamentosos o agar SABHI. Si se dispone de más de 2 mL de líquido es preferible filtrar el líquido a través de una membrana de 0,45 µm, mediante el empleo de una jeringa Swinnex. Colocar el lado filtrado del papel de filtro boca abajo en la superficie del medio de cultivo apropiado. El papel debe colocarse en otros sitios con una pinza estéril utilizando un esquema de día por medio. Si sólo se dispone de una cantidad escasa de líquido, inocular tipo mancha la superficie del agar directamente en alícuotas de tres o cuatro gotas. Las preparaciones en fresco con tinta china (la nigrosina es un sustituto aceptable) son útiles cuando se sospecha <i>Cryptococcus neoformans</i>. Para realizar la preparación se mezcla una gota del sedimento centrifugado o una cantidad pequeña de material de la superficie de la membrana con una gota de tinta china en un portaobjetos. Se aplica un cubreobjetos y se lo observa con el microscopio para determinar la presencia de formas levaduriformes encapsuladas con brotes.
Orina	Centrifugar alrededor de 10 mL de muestra de orina, inocular 0,5 mL del sedimento en un agar no inhibidor, como agar inhibidor de hongos filamentosos o agar de SABHI y a un medio inhibidor, como el agar de infusión de cerebro y corazón, que contenga cloranfenicol y cicloheximida. Pueden realizarse preparaciones directas en fresco y examinarse con el microscopio para determinar la presencia de levaduras o formas filamentosas.
Piel, uñas y pelo	Las escamas de piel, los raspados de uñas y los pelos deben examinarse después del tratamiento con KOH. Esta preparación se realiza emulsionando la muestra en una gota de KOH al 10% sobre un portaobjetos. El propósito del KOH es eliminar cualquier resto de escamas o las membranas celulares que pueden confundirse con las hifas de hongos. El aclarado de la muestra puede acelerarse calentando la mezcla suavemente sobre la llama de un mechero Bunsen. Se aplica un cubreobjetos y la muestra se examina para determinar la presencia de hifas angostas y regulares que de modo característico terminan en artroconidios. La visualización de las hifas se mejora mediante el agregado de blanco de calcoflúor al reactivo de hidróxido de potasio y la observación con un microscopio de fluorescencia adaptado con filtros de longitudes de onda apropiados. En el caso de los pelos puede observarse la disposición en mosaico de las esporas sobre la superficie del tallo (infección ectotrix) o los fragmentos de hifas y artroconidios en el interior (infección endotrix). Las escamas de piel, los raspados de uñas o los pelos pueden colocarse directamente sobre la superficie del medio de cultivo, como agar infusión de cerebro y corazón con cloranfenicol y cicloheximida (disponible comercialmente como agares Mycosel o Mycobiotic). Con un alambre recto de inoculación se sumerge uno de los fragmentos debajo de la superficie del agar. Examinar en las áreas de inoculación a intervalos frecuentes para determinar la aparición de colonias en la superficie. Los cultivos deben incubarse durante un mínimo de 30 días antes de desecharlos como negativos.
Tejido	Cuando se procesan tejidos para el aislamiento de hongos, debe evitarse el uso de morteros u homogeneizadores de tejidos. Las hifas pueden destruirse con facilidad por la molienda, lo que dificulta el aislamiento de microorganismos viables en el cultivo (en especial si hay hifas no tabicadas de alguno de los zigomicetos). Es mejor desmenuzar el tejido en cubos de 1 mm con tijeras estériles o una hoja de bisturí afilada y colocar los fragmentos diminutos directamente sobre el agar, sumergiéndolos apenas debajo de la superficie con una aguja de inoculación. Una muestra de 5 a 10 mL de tejido homogeneizado, médula ósea o sedimento de la muestra líquida debe colocarse sobre la superficie de medios de cultivo apropiados. Los medios de cultivo no selectivos, sin antibióticos, como agar inhibidor de hongos filamentosos o SABHI, son probablemente adecuados, ya que estas muestras suelen ser estériles y no es necesaria la inhibición por antibióticos.
Sangre	Los frascos comerciales para hemocultivos diseñados para el aislamiento de bacterias de sangre no son convenientes para la recuperación de muchas especies de hongos. El sistema Isolator (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) resultó promisorio para el aislamiento más directo de hongos en muestras de sangre obtenidas de pacientes con sepsis por hongos. Si se utiliza este sistema, deben seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante. En particular, debe tenerse cuidado durante la fase de subcultivos para evitar la contaminación con microorganismos ambientales. Durante este procedimiento se aconseja trabajar en una cámara con flujo laminar.

enriquecido, como el agar dextrosa de Sabouraud o el agar dextrosa patata de manera que pueda observarse la morfología característica de la colonia y los modos de esporulación.

También debe usarse un segundo medio más selectivo para el aislamiento de hongos. El agregado de uno o más antibióti-

cos, como penicilina (20 U/mL), estreptomycin (40 U/mL), gentamicina (5 µg/mL) o cloranfenicol (16 µg/mL) puede utilizarse para inhibir el crecimiento de bacterias. La cicloheximida (Acti-Dione®) en una concentración de 0,5 µg/mL, también puede agregarse para evitar el sobrecrecimiento de ciertos hon-

Recuadro 21-3 Procedimiento: preparación en fresco por disección

- Con un par agujas de disección o palillos aplicadores puntiagudos, desprender una porción pequeña de la colonia por examinar, incluso las porciones del agar por debajo de la superficie.
- Colocar el fragmento de la colonia en un portaobjetos con una gota del colorante de anilina azul de lactofenol, disgregar la colonia con las agujas de disección (fig. 21-4) y cubrir con un cubreobjetos.
- Ejercer una presión suave sobre la superficie del cubreobjetos con el extremo de goma de un lápiz puede ayudar a dispersar la preparación, en especial si hay pequeños trozos cortos y gruesos de agar.
- Examinar la preparación con el microscopio, primero con objetivo de bajo aumento (10×) y luego de gran aumento (40×) o con inmersión (100×) si se observan estructuras sospechosas de hongos.
- Al disgregar la colonia a menudo se rompen las delicadas estructuras de fructificación de los hongos filamentosos, lo que en algunos casos dificulta visualizar las disposiciones características de las esporas o las uniones a las hifas necesarias para la identificación definitiva. En estos casos puede requerirse la preparación con cinta transparente o microcultivo en portaobjetos.

gos filamentosos ambientales de crecimiento rápido. Los hongos patógenos oportunistas, como *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, pueden ser inhibidos de modo parcial o total por la cicloheximida; por consiguiente, siempre debe usarse en paralelo un medio no selectivo.

INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS PARA HONGOS

En la actualidad se recomienda la incubación de todos los cultivos para hongos a la temperatura controlada de 30 °C. La incubación de un segundo conjunto de placas a 35 °C para el aislamiento de las formas levaduriformes de los hongos dimorfos no es rentable. La práctica anterior de intentar convertir los aislamientos sospechosos de hongos filamentosos dimorfos a su forma levaduriforme fue reemplazada en gran medida por los ensayos con sondas de ácidos nucleicos. Este último método puede realizarse en cuanto se visualizan las colonias en los medios de aislamiento primarios, antes de la observación de la esporulación diagnóstica.

Todos los cultivos para hongos deben incubarse durante un mínimo de 30 días antes de desecharlos como negativos, aun cuando las placas parezcan contaminadas por bacterias u otros hongos. Las colonias de *H. capsulatum*, por ejemplo, pueden observarse creciendo en la superficie de colonias de *C. albicans* o en la parte superior de hongos filamentosos contaminantes.

La elección entre el uso de tubos o placas es opcional. Para los laboratorios con bajo volumen de trabajo, con personal que puede no estar familiarizado con el manejo de los hongos o en los casos en que puede escasear el espacio en la estufa de incubación y para el almacenamiento se recomienda el uso de tubos, en especial de tubos de cultivos grandes (150 × 25 mm) con tapas a rosca, firmemente ajustadas. Los medios deben verse en forma de agar inclinado grueso para evitar la deshidratación durante el período prolongado de incubación. Después de inocular el medio, hay que asegurarse de no ajustar demasiado la tapa porque es necesario que los hongos “respiren” para poder sobrevivir. Una ventaja adicional de los cultivos en tubo es la facilidad para su transporte. La desventaja principal

Recuadro 21-4 Procedimiento: preparación con cinta transparente

- El método de preparación de cultivos con cinta transparente para el examen microscópico suele ser útil porque se conserva bien la disposición de las esporas de los hongos filamentosos más delicados.
- Presionar el lado adhesivo la cinta de celofán clara no esmerilada, en forma suave pero firme sobre la superficie de la colonia, recogiendo una porción del micelio aéreo (fig. 21-5A). Este procedimiento siempre debe realizarse bajo una campana de seguridad biológica. También debe tenerse cuidado de que los dedos expuestos no entren en contacto con la superficie del hongo filamentosos. Para máxima seguridad, deben usarse guantes.
- La preparación se realiza colocando una gota del colorante de anilina azul de lactofenol sobre un portaobjetos.
- Pegar un extremo de la cinta a la superficie del portaobjetos adyacente a la gota del colorante.
- Extender la cinta sobre el colorante, bajándola suavemente para que el micelio se embeba con aquel (fig. 21-5B).
- Estirar de modo tirante la cinta y pegar el extremo opuesto al vidrio, evitando todo lo posible el atrapamiento de burbujas de aire.
- Puede necesitarse cierta práctica para retirar la superficie pegajosa de la cinta si se usan guantes.
- La preparación puede examinarse ahora al microscopio de la misma manera como se describió para la preparación en fresco por disección, con excepción de que el uso de aceite de inmersión no es satisfactorio debido a la interferencia de la sustancia de la cinta.
- El método de la cinta transparente es económico, rápido, simple de realizar y, con algunas excepciones, permite una identificación exacta.

es la dificultad para realizar las preparaciones teñidas para el examen microscópico.

Las placas de Petri tienen la ventaja de proporcionar una superficie de crecimiento más grande, lo que produce mejor separación de las colonias y facilita la observación y la realización de subcultivos. Las colonias de hongos en cultivos mixtos



Figura 21-4 Preparación en fresco que ilustra la disección del fragmento con agujas en una gota del colorante de anilina azul de lactofenol antes de la colocación del cubreobjetos.

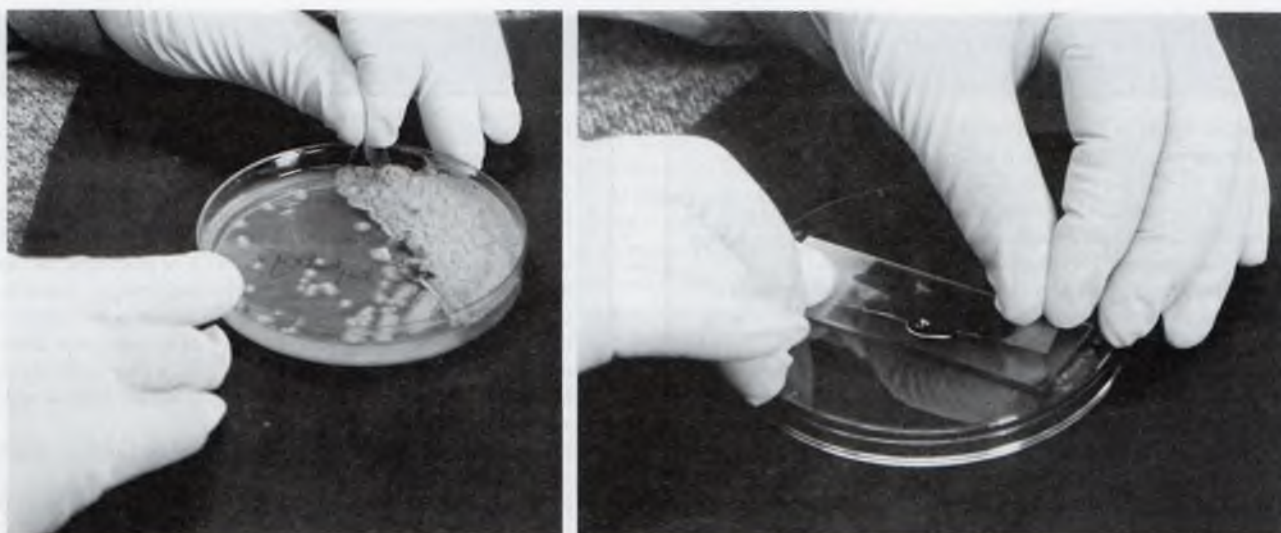


Figura 21-5 A. Preparación con cinta transparente: el lado adhesivo de la cinta se presiona en la superficie de la colonia del hongo. B. Preparación con cinta transparente: la cinta inoculada se estira sobre una gota del colorante azul de lactofenol en la superficie de un portaobjetos.

son más fáciles de separar y trabajar como colonias individuales. Las preparaciones por disección o con cinta transparente se efectúan de modo eficaz de los cultivos en placas, lo que tal vez determina mejores posibilidades de realizar la identificación presuntiva en menos tiempo. Como los cultivos en placa pue-

den deshidratarse durante el período de incubación prolongado, pueden sellarse, colocarse en bolsa de poliéster hidratada o el borde de la placa de Petri puede sellarse con cinta permeable al oxígeno. Si se utiliza una estufa de incubación sólo para los cultivos de hongos, la colocación en el último estante del piso

Recuadro 21-5 Procedimiento: técnica de microcultivo en portaobjetos

En los casos en que ni la preparación en fresco por disección ni la de la cinta transparente permitan establecer una identificación exacta, o cuando se deseen preparaciones permanentes para el estudio ulterior o para el uso con fines didácticos, se recomienda la técnica de microcultivo. Aunque algo tediosa para realizar, pueden hacerse preparaciones de alta calidad en las que se conservan a la perfección las estructuras y las disposiciones de las esporas. La técnica es la siguiente:

1. Colocar un trozo redondo de papel del filtro o de gasa en el fondo de una placa de Petri estéril. Colocar un par de varillas de vidrio delgadas o palillos de un aplicador cortados a la longitud necesaria para poner encima del papel del filtro y que sirva como apoyo a un portaobjetos de 7,5 × 2,5 cm (fig. 21-6A).
2. Colocar un bloque o tapón de agar harina de maíz o agar dextrosa patata (fig. 21-6B) en la superficie del portaobjetos (fig. 21-6C). Si se desea más de una preparación, pueden colocarse dos bloques, separados por cerca de 2,5 cm.
3. Inocular los márgenes del tapón de agar en tres o cuatro lugares con una porción pequeña de la colonia por estudiar, usando un alambre de inoculación recto o la punta de una aguja de disección (fig. 21-6D y E).
4. Calentar en forma suave un cubreobjetos pasándolo con rapidez a través de la llama de un mechero Bunsen y colocarlo de inmediato directamente en la superficie del bloque del agar inoculado. Al calentar el cubreobjetos se produce un sellado firme entre su fondo y la superficie de agar que se funde brevemente por el vidrio caliente.
5. Pipetear una cantidad pequeña de agua en el fondo de la placa de Petri para saturar el papel del filtro o la gasa. Colocar la tapa de la placa de Petri e incubar a temperatura ambiente (o 30 °C) durante 3 a 5 días.
6. Cuando el crecimiento parece estar maduro a simple vista (fig. 21-6F), el cubreobjetos pueden levantarse con suavidad de la superficie del agar con un par de pinzas. Debe tenerse cuidado para no romper el micelio que se adhiere al fondo del cubreobjetos más de lo necesario (fig. 21-6G).
7. Colocar el cubreobjetos en una gota pequeña del colorante azul de lactofenol aplicada a la superficie de un segundo portaobjetos de 7,5 × 2,5 cm (fig. 21-6H). La preparación puede conservarse para el estudio sellando los bordes externos del cubreobjetos con líquido de montar o esmalte de uñas claro. Esta actividad debe realizarse bajo una capucha de seguridad biológica.
8. Después de retirar el cubreobjetos del bloque (o bloques) de agar, éste puede sacarse del portaobjetos mediante el palillo de un aplicador. Esto se realiza sobre un recipiente que contenga líquido de desinfección con fenol al 5% donde se dejan caer los bloques de agar. El micelio que queda adherido a la superficie del portaobjetos original después de haber retirado el bloque también puede teñirse con azul de lactofenol y cubrirlo con un cubreobjetos, lo cual sirve como segunda preparación en fresco. De nuevo, esta preparación puede conservarse para el estudio futuro sellando el cubreobjetos con líquido de montar o esmalte de uñas claro, como ya se describió.

No hay que preocuparse si los bloques de agar están completamente secos antes de cosechar el cubreobjetos. Aun cuando éste esté firmemente adherido a la superficie del vidrio, puede colocarse una gota de azul de lactofenol adyacente a un borde del portaobjetos. Por acción capilar el colorante se difundirá entre la superficie inferior del cubreobjetos y el portaobjetos. De hecho, a menudo hay menos rotura de los elementos del micelio y se obtienen preparaciones de mejor calidad.

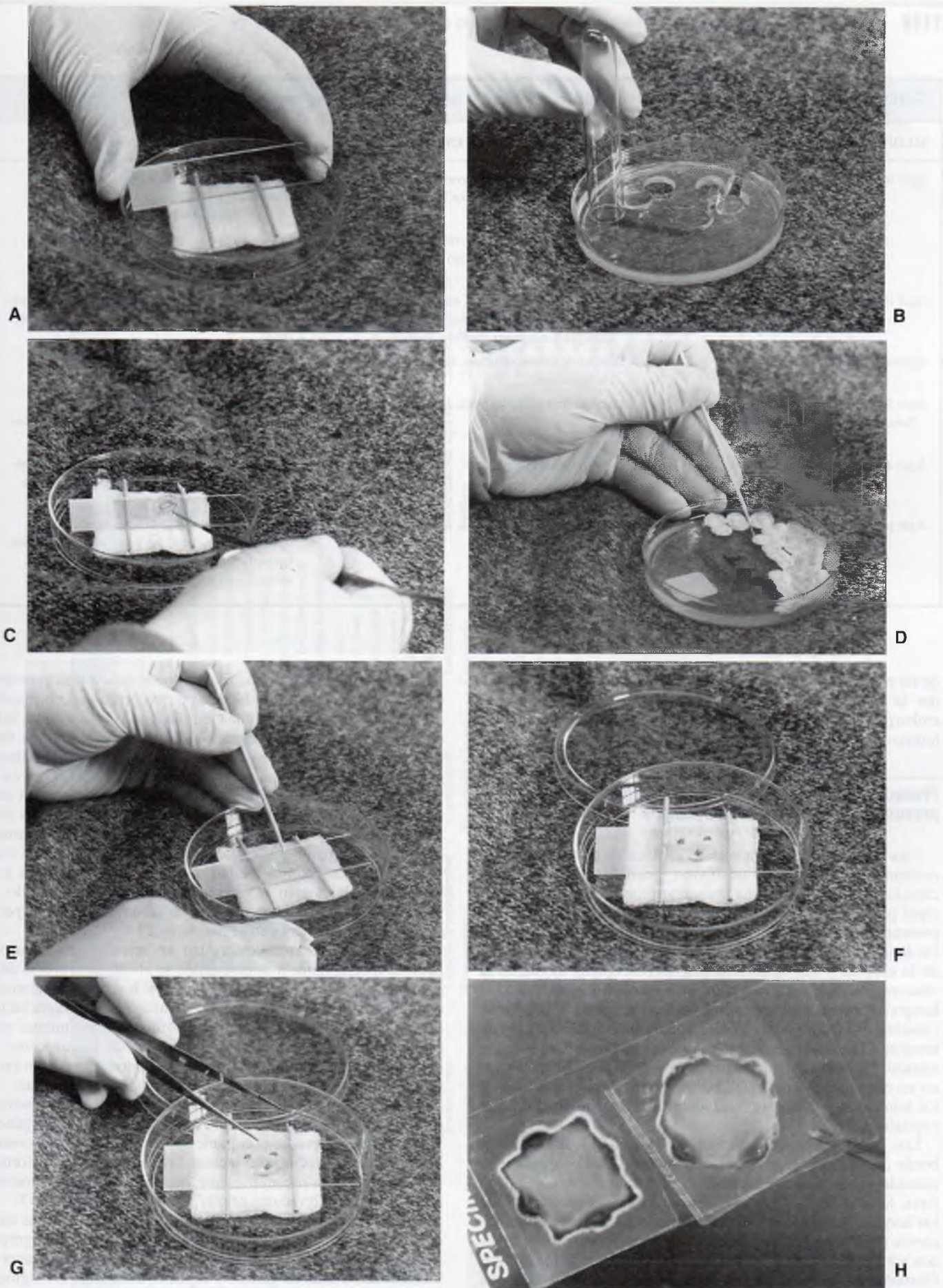


Figura 21-6 Serie de fotografías que describen la preparación de un microcultivo. Para los detalles, véase el recuadro 21-4.

Cuadro 21-5 Medios de cultivo para el aislamiento primario de hongos comunes e indicaciones para su uso		
MEDIOS DE CULTIVO	INGREDIENTES ESENCIALES	INDICACIONES PARA EL USO
Agar infusión de cerebro y corazón	Infusiones de cerebro de ternero y corazón de vaca; proteosa peptona, NaCl, fosfato disódico y agar (Pueden agregarse cicloheximida y cloranfenicol para el aislamiento selectivo de hongos filamentosos dimorfos)	Aislamiento primario de hongos saprófitos y dimorfos
Agar inhibidor de hongos filamentosos (IMA)	Triptona, extracto de carne, extracto de levadura, dextrosa, almidón, dextrina, cloranfenicol, gentamicina y tampones (buffers) salinos	Aislamiento primario de hongos patógenos dimorfos. No se aislarán hongos saprófitos y dermatófitos
Agares Mycosel/Mycobiotic	Peptona de fitona, dextrosa, agar, cicloheximida, cloranfenicol,	Aislamiento primario de dermatófitos
Agar SABHI (agar infusión de corazón de Sabouraud)	Láminas de patata, dextrosa, agar	Aislamiento primario de hongos saprófitos y dimorfos, en especial las cepas con requerimientos nutricionales especiales
Agar dextrosa de Sabouraud	Dextrosa, neopeptona, agar	No recomendado como medio de aislamiento primario. Es mejor para la secuencia diagnóstica secundaria de los cultivos
Agar patata	Láminas de patata, dextrosa, agar	Aislamiento primario de hongos saprófitos y dimorfos, en especial las cepas con requerimientos nutricionales especiales y de crecimiento lento

de un recipiente plano y abierto con agua sirve para proporcionar la humedad necesaria para el aislamiento óptimo. Sin embargo, debe tenerse cuidado de controlar el crecimiento de hongos filamentosos ambientales en el agua.

Procedimientos de laboratorio para la identificación presuntiva de aislamientos de hongos

Una vez que la observación de la placa de cultivo revela el crecimiento probable de un hongo, pueden evaluarse varias características de la colonia para determinar a qué grupo principal puede pertenecer el aislamiento. En el cuadro 21-6 se presenta una guía para la identificación de género y especie de los hongos importantes en medicina basada en la morfología de la colonia y las características microscópicas mediante la observación de los cultivos primarios incubados a 30 °C. Si el hongo se presenta con un micelio aéreo vellosos o algodonoso característico debe considerarse una de las varias especies de hongos filamentosos. Si el hongo filamentosos tiene crecimiento rápido, que llena la placa de Petri sin un borde externo en el transcurso de 48-72 horas, debe considerarse uno de los hongos zigomicetos (véase diagrama 21-1 al final de este capítulo).

Los hongos filamentosos que crecen en 3-5 días, con un borde distintivo y de color blanco o pastel en la superficie, a menudo con una zona blanca de crecimiento nuevo en la periferia, lo más probable es que pertenezcan al grupo hialino de los hongos filamentosos. En el diagrama 21-2 se presentan las claves para la identificación de los hongos filamentosos hialinos y en el diagrama 21-3 para la identificación de los hongos filamentosos aislados en raspados de piel, uñas o pelos, que con posibilidad pertenezcan al grupo de dermatófitos.

En el caso de los hongos filamentosos que suelen presentar crecimiento más lento (7-14 días) o que presentan un micelio aéreo delicado o similar a una telaraña, gris o gris castaño, debe considerarse una de las especies dimorfas. Los hongos filamentosos dimorfos se encuentran en la forma filamentosos cuando se incuban a temperatura ambiente (25-30 °C) y en la forma levaduriforme cuando se incuban a la temperatura corporal (35-37 °C). A veces, las colonias de ciertos hongos filamentosos dimorfos aparecen focalmente como levaduriformes cuando se incuban a 30 °C. Los hongos dimorfos pueden convertirse, a veces con dificultad, de la forma filamentosos a la levaduriforme cuando el subcultivo en agar enriquecido se incubaba a 35-37 °C. El enfoque para la identificación de especie de este tipo se presenta en el diagrama 21-4.

En las colonias que desarrollan un micelio gris oscuro o negro, especialmente notorio cuando se observa el reverso de la colonia, debe considerarse uno de los hongos filamentosos dematiáceos. En el diagrama 21-5 se muestra la diferenciación de género y especie de hongos saprófitos de crecimiento más rápido. Las claves para la identificación de las especies de dematiáceos patógenos de crecimiento lento se muestran en el diagrama 21-6, asociadas con cromomicosis y micetomas.

Si la colonia tiene un aspecto liso, cremoso, viscoso y pastoso debe considerarse una levadura. Para la identificación de género y especie de las levaduras comunes y menos comunes encontradas con mayor frecuencia, incluso las especies levaduriformes productoras de artroconidios que pueden producir un micelio aéreo bajo y las "levaduras negras", véase el diagrama 21-7.

Una vez realizadas las observaciones iniciales descritas en el cuadro 21-6 y ubicado el hongo dentro de uno de los grupos indicados allí, se requerirán estudios adicionales para hacer la identificación final de género y especie, utilizando los siguientes criterios microscópicos:

Cuadro 21-6 Identificación de hongos importantes desde el punto de vista médico, crecimiento inicial a 30 °C

HIALINO		COLONIAS FILAMENTOSAS		DEMATIÁCEOS		COLONIAS DE LEVADURAS	COLONIAS LEVADURIFORMES
Crecimiento < 3 días	Crecimiento de 3-5 días	Crecimiento de 3-5 días	Crecimiento > 5 días	Crecimiento de 3-5 días	Crecimiento > 5 días	Crecimiento de 2-5 días	Crecimiento de 2-5 días
Hifas anchas y sin tabiques	Hifas hialinas y tabicadas	Colonias a menudo granulares y pigmentadas; hifas tabicadas, hialinas	Hifas hialinas y delgadas	Colonia oscura; negra en el reverso; hifas pigmentadas de amarillo y tabicadas	Colonia oscura; negra en el reverso; hifas pigmentadas de amarillo y tabicadas	Colonias lisas, pastosas o mucoides	Colonias parecidas a las levaduras con bajo micelio aéreo
Sospecha de zigomicetos	Sospecha de agentes productores de hialohifomicosis	Sospecha de dermatófito	Crecimiento en agar cicloheximida	Sospecha de agentes de feohifomicosis:	Sospecha de agentes de cromomicosis o micetomas	Sospecha de levaduras	Producción de artroconidios
<i>Rhizopus</i>	Conidios en cadenas:	Género <i>Microsporium</i>	La levadura se forma cuando se incuba a 35 °C	Conidios muriformes:	Sospecha de agentes de cromomicosis o micetomas	Frecuentes:	Sospecha:
<i>Absidia</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Microsporium canis</i>	Sospecha de hongos dimorfos:	<i>Alternaria</i>	Esporulación tipo cladosporio:	<i>Candida albicans</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Syncephalastrum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Ulocladium</i>	<i>Cladophialophora carrionii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Complejo <i>Trichosporon beigelii</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>Paecilomyces</i>	Infrecuentes:	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Stemphylium</i>	<i>Cladophialophora bantianum</i>	<i>Cryptococcus Rhodotorula</i>	<i>Blastoschizomyces capitatus</i>
<i>Mucor</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Microsporium audouinii</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Epicoccum</i>	Conidios divididos sólo por tabiques transversales:	Infrecuentes:	
	Conidios en grupos:	<i>Microsporium nanum</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>	Conidios divididos sólo por tabiques transversales:	Esporulación tipo fiálora:	<i>Malassezia furfur</i>	
	<i>Acremonium</i>	Género <i>Trichophyton</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Phialophora verucosa</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Fusarium</i>	Frecuentes:		<i>Bipolaris (Drechslera)</i>	<i>Phialophora richardsiae</i>	Raros:	
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>		<i>Exserohilum</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Especies de <i>Basidiobolus</i>	
	<i>Gliocladium</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		Producción de picnidios:	Esporulación tipo acroteca:	Especies de <i>Conidiobolus</i>	
	Conidios que se disponen individualmente:	<i>Trichophyton tonsurans</i>		<i>Phoma</i>	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Levaduras negras:	
	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>		<i>Chaetomium</i>	<i>Fonsecaea compacta</i>	<i>Pullularia pullulans</i>	
	<i>Scedosporium prolificans</i> (inflatum)	Infrecuentes:				<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>	
	<i>Chrysosporium</i>	<i>Trichophyton violaceum</i>				Especies de <i>Phaeococcomyces</i>	
	<i>Sepedonium</i>	<i>Trichophyton schoenleinii</i>				Formas de levaduras de los hongos dimorfos (incubación a 35 °C)	
		Género					
		Epidermophyton:					
		<i>Epidermophyton floccosum</i>					
Véase diagrama 21-1 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-2 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-3 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-4 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-5 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-6 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-7 para las características de identificación de especie	Véase diagrama 21-7 para las características de identificación de especie

- Si se observan hifas, determinar su estructura. Son:
 - ¿tabicadas o no tabicadas?
 - ¿ramificadas (en ese caso, en qué ángulos) o no ramificadas?
 - ¿pigmentadas o no pigmentadas?
 - ¿con un ancho regular o irregular?
 - ¿compuestas por artroconidios o pseudohifas?
- Determinar la estructura y el origen de los cuerpos de fructificación.
- Visualizar el tipo de conidiación:
 - El tamaño y la forma de las esporas o los conidios.
 - El tamaño, la forma y la disposición de las esporas.
- Buscar la presencia de estructuras diagnósticas especiales: picnidios, cleistotecios, células de Hülle.
- Si sólo se observan levaduras:
 - Considerar su tamaño, forma y disposición.
 - Buscar la presencia o la ausencia de cápsulas.
 - Determinar el tipo de células hijas de la blastoconidiación; ¿son únicas o múltiples?

En el cuadro 21-7 se presentan otras pautas para la identificación presuntiva de hongos basada en el examen microscópico directo de muestras clínicas.

Importancia de la identificación del género o la especie en el laboratorio

El cuadro 21-6 también puede usarse como una guía de hasta qué punto se requieren las identificaciones de género y especie en la mayoría de las situaciones clínicas. Como casi cualquier hongo filamentoso aislado en cultivo puro de los sitios del cuerpo normalmente estériles puede representar un patógeno oportunista, antes de descartar el aislamiento como insignifi-

cante se recomienda realizar las correlaciones clínicas. Las identificaciones de especie no necesitan ir más allá de las mencionadas en el algoritmo; otros aislamientos no identificados específicamente deben informarse con el nombre del género adecuado y anteponiendo especies de (p. ej., especies de *Aspergillus*).

Dado que las levaduras suelen aislarse como comensales de muestras de piel y respiratorias, la secuencia diagnóstica definitiva debe ser limitada y sólo debe realizarse cuando está indicada por la clínica. Las cepas clínicas relevantes aisladas en tejidos (en especial si se observan los elementos micóticos en cortes teñidos de tejido), líquidos corporales normalmente estériles y aspirados deben identificarse en cuanto a género y especie. La identificación de ciertas especies, *Candida krusei* por ejemplo, predice la resistencia para seleccionar agentes antimicóticos, como los imidazoles. Si también se aíslan otros microorganismos, debe considerarse la posibilidad de contaminación y se recomienda la correlación clínica antes de proceder con la secuencia diagnóstica extensa. Los hongos aislados en hisopos o heridas superficiales deben evaluarse acerca de su importancia clínica. Se siguen los criterios por los cuales pueden identificarse los hongos que figuran en el cuadro 21-6. La presentación de los diversos grupos de hongos seguirá el orden de las columnas del cuadro 21-6, con enlaces a los diagramas 21-1 a 21-7 (que figuran al final de este capítulo) para los criterios de identificación más detallados.

Identificación del género y la especie de los principales grupos de hongos

ESPECIES DE ZYGOMYCES Y ZIGOMICOSIS

Los hongos que pertenecen a la subclase *Zygomycetes* son habitantes del medioambiente y están extensamente distribuidos en el suelo, el estiércol y la materia orgánica. Los seres

Cuadro 21-7 Identificación presuntiva de hongos basada en la observación microscópica directa del material proveniente de muestras clínicas	
OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS DIRECTAS	IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA
Hifas relativamente pequeñas (3-6 µm) de tamaño regular que se ramifican en forma dicotómica en ángulos de 45° con tabiques diferenciados transversales	Especies de <i>Aspergillus</i>
Hifas de tamaño irregular (6-50 µm), en forma de cintas y desprovistas de tabiques	<i>Zygomycetes</i> (<i>Phycomycetes</i>) <i>Rhizopus-Mucor-Absidia</i>
Hifas pequeñas (2-3 µm) y regulares, algunas ramificadas con artrosporas rectangulares a veces vistas; se encuentran sólo en piel, raspados de uña y pelo	Grupo de dermatófitos Especies de <i>Microsporum</i> Especies de <i>Trichophyton</i> Especies de <i>Epidermophyton</i>
Hifas de diámetro regular (3-6 µm), paredes paralelas, bifurcación irregular, tabicadas, amarillo oscuro, castañas o hialinas	Especies de <i>Phaeohyphomyces</i> Especies de <i>Hyalohyphomyces</i>
Hifas con puntos separados de contracción que simula la unión de una ristra de salchichas (pseudohifas); a menudo se observan formas de levaduras que emiten brotes (blastosporas)	Especies de <i>Candida</i>
Formas de levadura, células esféricas y de tamaño irregular (5-20 µm), clásicamente con una cápsula polisacárida gruesa (no todas las células son encapsuladas), con uno o más brotes adheridos por una unión estrecha	<i>Cryptococcus neoformans</i> Especies de <i>Cryptococcus</i> , no encapsulados
Levadura pequeña que emite brotes, de tamaño relativamente uniforme (3-5 µm), con un solo brote unido por una base estrecha, extracelular o dentro de macrófagos	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Formas de levadura, grandes (8-20 µm), con células que parecen tener una pared gruesa, con doble contorno y un solo brote unido por una base ancha	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
Grande, de tamaño irregular (10-50 µm), esférulas de pared gruesa muchas de las cuales contienen endosporas pequeñas (2-4 µm) y redondas	<i>Coccidioides immitis</i>



Figura 21-7 Microfotografía de las hifas anchas y acintadas de especies de *Zygomycetes*. Nótese el endoplasma claro y la ausencia de tabiques transversales.



Figura 21-8 Microfotografía de un esporangio de especies de *Mucor*, el órgano reproductor asexual de los zigomicetos. Nótese la extensión de la columela en el esporangio y la agregación de esporangiosporas.

humanos suelen sufrir infecciones de las vías respiratorias altas a través de la inhalación de esporas transportadas por el aire, aunque la ingestión de productos alimenticios contaminados puede causar enfermedad gastrointestinal primaria. La inoculación directa por traumatismos de la piel y las mucosas puede producir infección mucocutánea primaria. La mayoría de los miembros de los zigomicetos tiene una proclividad para producir la invasión por hifas de las paredes de los vasos sanguíneos una vez que se ha establecido la infección primaria, lo que a menudo causa la diseminación de trombos micóticos y el desarrollo de focos metastásicos en muchos órganos.

Los hongos importantes desde el punto de vista médico dentro de la subclase *Zygomycetes* incluyen varios géneros, de los cuales seis se presentan aquí, como figura en el diagrama 21-1. Las especies de *Rhizopus*, de *Absidia*, de *Syncephalastrum*, de *Circinella*, de *Cunninghamella* y de *Mucor* pueden identificarse por los criterios indicados. *Rhizomucor pusillus*, *Saksenaia vasiformis*, *Apophysomyces elegans* y los agentes del orden Entomoforales entomophthoromycotic, *Conidiobolus coronatus* y especies de *Basidiobolus*, raras veces se aíslan en los laboratorios clínicos y no se presentarán aquí.

Como se describe en el diagrama 21-1, el indicio inicial en el diagnóstico de las zigomicosis es el aislamiento de una colonia de crecimiento rápido en el medio de cultivo primario, por lo general dentro de las 48-72 horas, con la superficie del agar cubierta con un micelio vellosa que se extiende de un borde al otro de la placa de Petri ("levantador de tapa") (véase lámina en color 21-1A y B). El examen microscópico de la preparación en fresco de la colonia revela hifas anchas, irregulares, como cintas, no tabicadas (con escasos tabiques en los cultivos más viejos) (fig. 21-7) y las esporas producidas en estructuras con forma de bolsa conocidas como esporangios (fig. 21-8). El primer paso para realizar la identificación del género es observar la presencia o la ausencia de rizoides similares a raíces (fig. 21-9).

Las identificaciones del género pueden entonces hacerse siguiendo los criterios descritos en el diagrama 21-1; a continuación se presentan las descripciones y las referencias a la figura.

Especies de *Rhizopus*. La clave para la identificación de las especies de *Rhizopus* es la producción de **rizoides** característicos, similares a raíces. Los rizoides que de modo típico se originan de la hifa inmediatamente adyacente al esporangióforo se de-

nominan "**nodal**" (fig. 21-10). Los esporangióforos que miden hasta 1 000 μm terminan en una columela cóncava que se extiende al interior del esporangio sacular. El **colapso en forma de paraguas del esporangio posmaduro** se ilustra mejor en la imagen detallada de la figura 21-11. Este colapso se observa a menudo como un rasgo secundario en los cultivos más viejos, particularmente útil para identificación preliminar cuando los rizoides están desarrollados de manera insuficiente.

Especies de *Absidia*. Las especies de *Absidia* comparten con las especies de *Rhizopus* la producción de **rizoides**. Sin embargo, los rizoides de las especies de *Absidia* difieren, ya que suelen ser más delicados y se originan de hifas entre los conidióforos, un origen conocido como "**internodal**" (fig. 21-12). Los esporangióforos pueden ramificarse. Una característica secundaria de importancia, en especial en cepas en que los rizoides se desarrollan de modo deficiente, es la expansión en forma de embudo del conidióforo terminal en una estructura conocida como **apófisis** (fig. 21-13).

Especies de *Syncephalastrum*. Las especies de *Syncephalastrum* difieren de los otros zigomicetos en la forma y la disposición de los esporangios. En lugar de formar una esfera, los "**meros-**



Figura 21-9 Microfotografía de los rizoides similares a raíces de especies de *Rhizopus*, característicos de los zigomicetos.

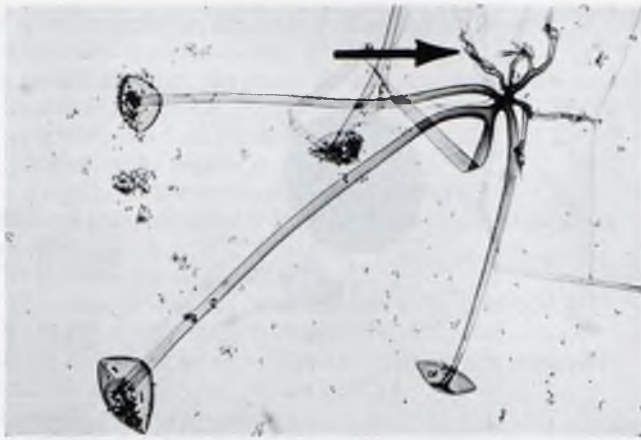


Figura 21-10 Microfotografía de la estructura de fructificación de especies de *Rhizopus*. Nótese el origen de los esporangióforos adyacentes a los rizoides similares a raíces (flecha), denominado "nodal".

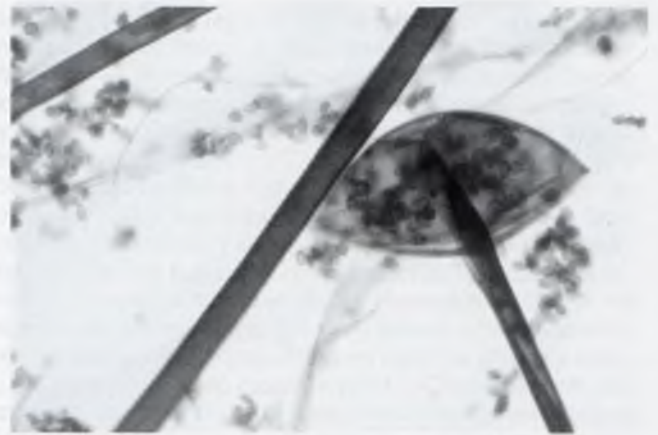


Figura 21-11 Imagen con mayor aumento de un esporangio posmaduro de especies de *Rhizopus* que ilustran el colapso característico en forma de paraguas.

porangios" de *Syncephalastrum* son cilíndricos y dispuestos como "pétalos de margarita" alrededor de una columela esférica, relativamente pequeña (10-50 μm) (fig. 21-14). Las esporangiosporas están alineadas en serie, una detrás de la otra, dentro de cada esporangio. Este aspecto hace recordar a *Aspergillus flavus*; sin embargo, cuando se examina la morfología de la colonia y la estructura de las hifas, la diferenciación se realiza con rapidez. En ocasiones se visualizan rizoides rudimentarios.

Especies de Circinella. La característica de identificación importante de las especies de *Circinella* es la **curva hacia atrás** distintiva de los **esporangióforos**. Éstos nacen lateralmente de la hifa, se curvan directamente en sentido inverso y terminan en un **esporangio globuloso** que suele estar repleto de esporangiosporas (fig. 21-15). Las especies de *Circinella* no producen rizoides.

Especies de Cunninghamella. La esporulación de las especies de *Cunninghamella* difiere de la de otros zigomicetos porque produce esporas esféricas especializadas, denominadas **esporan-**

giolas, a partir de la superficie de una columela grande, globulosa, sin estar envueltas por un esporangio (fig. 21-16). Cuando se ajusta el foco del objetivo del microscopio, puede observarse que cada esporangiola está adherida a la columela por una estructura diminuta, similar a un pelo, que se denomina **denticulo**.

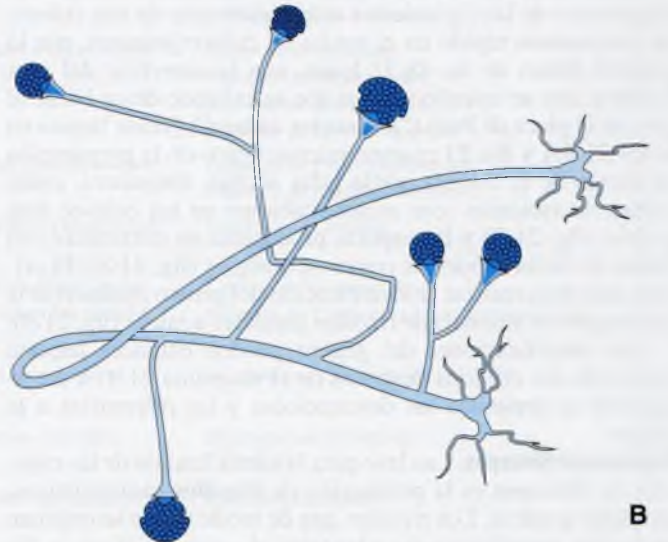
Especies de Mucor. La identificación de especies de *Mucor* a menudo se realiza después de que se ha descartado cada una de las especies anteriores. Las especies de *Mucor* no producen rizoides. Los esporangióforos se originan individualmente del micelio, que puede ser ramificado o no. Cada esporangióforo acaba en una columela ligeramente bulbosa que se extiende dentro de un esporangio esférico de pared lisa (fig. 21-17). Las esporangiosporas son esféricas o elipsoidales y pueden ser hialinas o pigmentadas de color amarillo castaño.

HISTOPATOLOGÍA DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR ZIGOMICETOS

Las hifas no tabicadas, anchas, en forma de cinta de los zigomicetos suelen ser distintivas de otros hongos productores de



Figura 21-12 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Absidia*, que muestran el origen internodal característico de los conidióforos.



hifas en cortes de tejido. Las hifas varían de 3 a 25 μm de ancho, con paredes no paralelas que a menudo tienden a romperse en fragmentos pequeños (fig. 21-18). Con frecuencia las hifas no se tiñen bien, incluso con las tinciones para hongos, como ácido peryódico de Schiff (PAS) o metenamina argéntica de Gomori. La reacción del tejido es típicamente purulenta y se observan tanto hifas intactas como fragmentadas en medio de una enorme cantidad de neutrófilos segmentados. Pueden observarse tabiques ocasionales. En cortes transversales de las hifas, éstas también pueden imitar esporas o esférulas inmaduras pequeñas de *Coccidioides immitis*, por lo que existe la posibilidad de arribar a una conclusión incorrecta. Los zigomicetos también tienen predilección por invadir los vasos sanguíneos, lo que causa infarto hemorrágico (una razón por la que el tejido infectado suele aparecer como carbonizado). Los zigomicetos también pueden presentarse como una bola micótica en las cavidades del cuerpo y, de vez en cuando, se observan las cabezas de fructificación típicas y completas con el esporangio y las esporangiosporas.

Los síndromes clínicos producidos por los zigomicetos se presentan en la recuadro de correlación clínica 21-1.

Hongos filamentosos hialinos y hialohifomicosis

Ajello⁶ acuñó originalmente el término "hialohifomicosis" para representar un grupo de infecciones micóticas oportunistas causadas por una variedad de hongos filamentosos saprofitos de crecimiento rápido. Este autor supuso que esa designación sería menos confusa para los médicos que utilizar los nombres individuales, como peniciliosis, paecilomicosis o escopulariopsis. Sin embargo, desde ese momento el personal de laboratorio se puso más hábil para realizar las identificaciones de género de los diversos hongos incluidos en el grupo y los médicos han tenido la experiencia adicional en las aplicaciones clínicas de informes del laboratorio que mencionan el nombre del género o de la especie de los hongos filamentosos hialinos aislados con mayor frecuencia. En particular, debe realizarse la identificación por cultivo de *Scedosporium apiospermum* (y también su teleomorfo, *Pseudallescheria boydii*) y de especies de *Fusarium*. Es importante distinguir estos hongos, muchas de cuyas cepas son resistentes a la anfotericina B, de

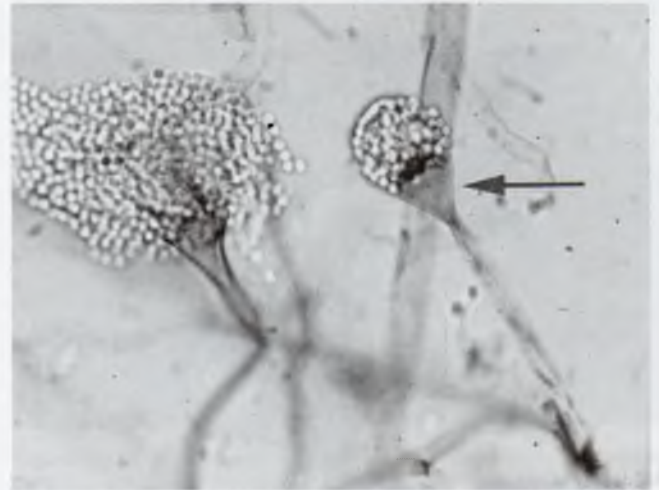


Figura 21-13 Imagen con mayor aumento de la apófisis de especies de *Absidia*; se observa la expansión del extremo terminal del esporangióforo en forma de embudo.

las especies de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos hialinos que pueden parecer similares en cortes de tejido. Cada micólogo debe determinar hasta qué punto debe extenderse la identificación de género y especie que se informa para adaptarse mejor a las necesidades de los médicos con los cuales trabaja.

Especies de *Aspergillus* y aspergilosis

Debido a su ubicuidad en la naturaleza y la frecuencia con que se aíslan en los laboratorios clínicos como agentes de enfermedades micóticas, las especies de *Aspergillus* suelen tratarse como un subconjunto separado de hongos filamentosos hialinos.

Las especies de *Aspergillus* están extensamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de materia orgánica. La inhalación de polvo contaminado por esporas es el modo más frecuente de infección para los seres humanos y causa

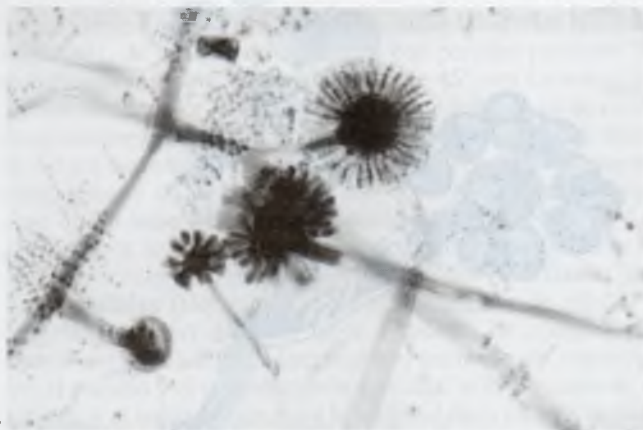
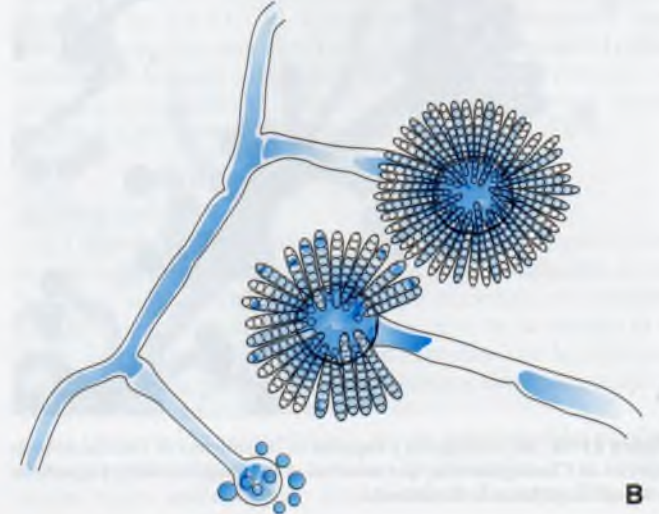


Figura 21-14 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Syncephalastrum*, que muestran los esporangios dispuestos en forma radiada alrededor de una columela esférica.



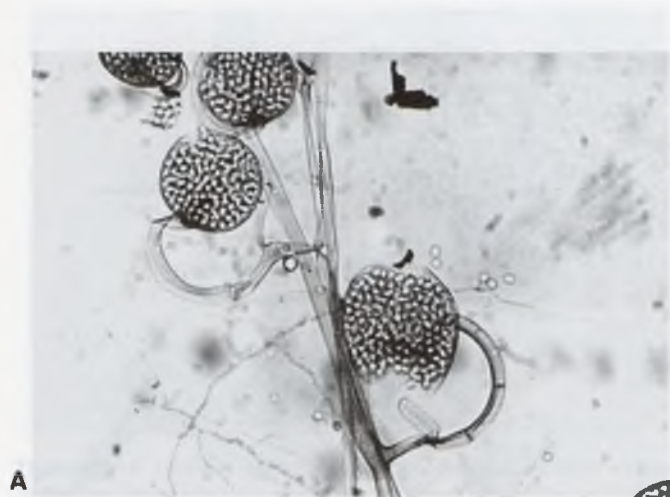
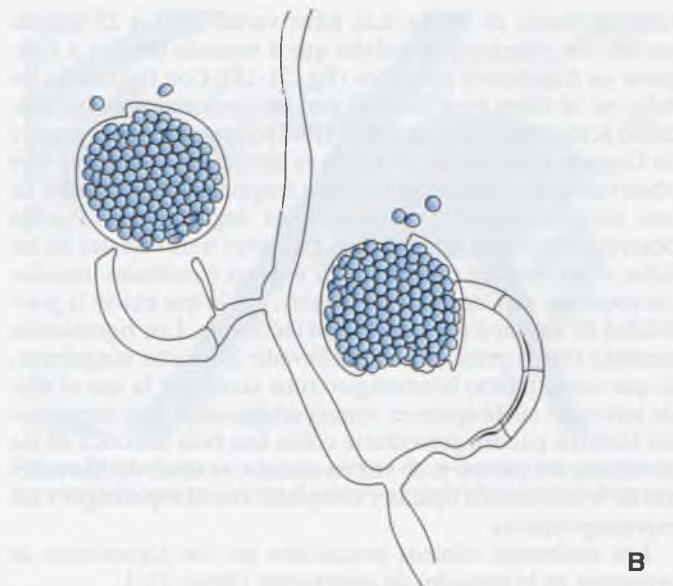


Figura 21-15 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Circinella*, que muestran la curva dirigida hacia atrás característica de los esporangióforos.



sinusitis o enfermedad broncopulmonar. Para la rinosinusitis micótica, Schubert²⁴⁸ describe tres formas invasoras (necrosante aguda, invasora crónica e invasora granulomatosa) y dos no invasoras (granuloma micótico y alérgica).

Durante los períodos de mayor construcción edilicia, en especial en las zonas lindantes a los hospitales, suele ser un aumento en la tasa de infección. Es oportuno mencionar un informe de hace muchos años de un brote de aspergilosis en pacientes con cáncer, relacionado con la realización de pruebas contra incendio en un hospital.⁴ Los estudios de vigilancia siempre deben incluir el muestreo de los filtros de aire hospitalarios que normalmente revelan recuentos elevados de esporas del hongo.²⁵⁸ Los conductos de ventilación pueden contaminarse con suciedad y fragmentos de materia orgánica que son transportados por el aire provenientes de la descomposición del suelo y las malezas.²⁰⁵ La incidencia de aspergilosis intrahospita-

laria guarda relación directa con la media del recuento de esporas transportadas por el aire ambiental, que es máxima cuando se liberan ráfagas mínimas de esporas al aire por agitación de ropas contaminadas o por el movimiento de polvo contaminado acumulado en suelos u otras superficies durante las tareas de limpieza.²³¹ Los pacientes inmunodeprimidos o los que reciben fármacos inmunosupresores, en especial los receptores de trasplantes de médula ósea y de órganos, y los que presentan procesos malignos hemáticos tienen una susceptibilidad especial a la infección.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

Las especies de *Aspergillus* que con mayor frecuencia se encuentran en los laboratorios clínicos son *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Casi todas las infecciones



Figura 21-16 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Cunninghamella*, que muestran la esporangióli esférica a partir de la superficie globular de la columela.



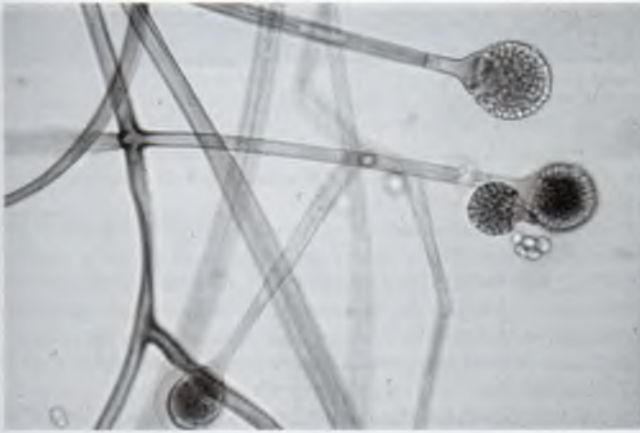


Figura 21-17 Microfotografía de la estructura de fructificación de especies de *Mucor*. Nótese la falta de rizoides y conidióforos que terminan en una columna globular dentro de los esporangios que contienen las esporangiosporas.

graves están causadas por *A. fumigatus*¹⁵⁴ *A. nidulans* también se menciona en esta sección porque la mayoría de las cepas producen con facilidad formas sexuales o teleomórficas, es decir, cleistotecios que encierran ascosporas específicas de especie.

MORFOLOGÍA DE LA COLONIA

El desarrollo de colonias de especies de *Aspergillus* puede sospecharse si se observa en el cultivo una proliferación rápida (dentro de 3-5 días) con un margen exterior distintivo, a menudo con una zona blanca de crecimiento nuevo. El aspecto como se describe debajo puede variar, lo que depende del medio de cultivo que se utilice. Las colonias tempranas pueden presentar una consistencia algodonosa; sin embargo, cuando maduran la superficie adquiere una consistencia azucarada o granular a medida que se producen los conidios. A continuación figuran las descripciones de las colonias cuando crecen en agar dextrosa de Sabouraud, características de cada una de las especies.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Observadas con el microscopio, las especies de *Aspergillus* se caracterizan por la producción de **hifas tabicadas hialinas**, uniformes, de 4-6 µm de diámetro, con paredes paralelas. La **ramificación dicotómica en ángulo de 45°**, tan característica del micelio invasor vista en los cortes de tejidos, suele observarse con menos frecuencia en las preparaciones microscópicas en fresco hechas a partir de placas de cultivo. Un segmento especializado de la hifa, conocido como **célula pie** o basal, sirve como base de origen del **conidióforo** (fig. 21-19). Los conidióforos terminan en una **vesícula** dilatada, a partir de cuya superficie nace una (**uniseriada**) o dos (**biseriada**) hileras de **fiálides** (técnicamente, la hilera interna de células se denomina **métula**), que dan lugar a cadenas de conidios pigmentados (fig. 21-20). La longitud y el ancho de los conidióforos, el tamaño y el contorno de la vesícula, la disposición de las fiálides, y el color, el tamaño y la longitud de la cadena de conidios son características utilizadas para realizar las identificaciones de especie. Algunas especies producen **cleistotecios teleomorfos** que contienen **ascosporas** (fig. 21-21).

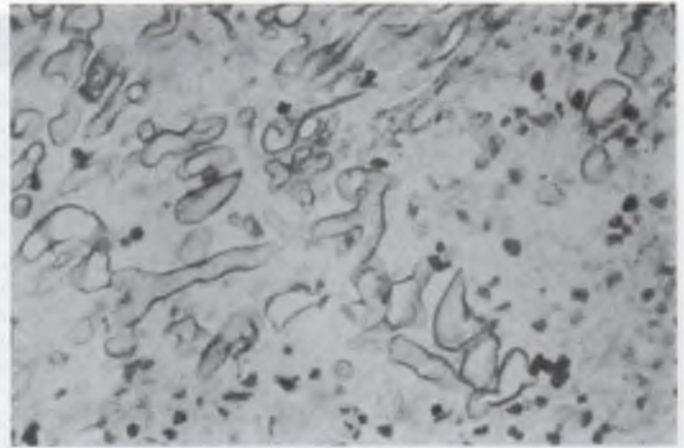


Figura 21-18 Microfotografía de un corte de tejido que muestra las anchas hifas fragmentadas, no tabicadas, de tamaño irregular, características de una de las especies de *Zygomycetes* (H-E, 400×).

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Las colonias de *A. fumigatus* son granulares a algodonosas y suelen tener cierto tono de pigmentación **azul verdoso, verde grisáceo o verde castaño** (véase lámina en color 21-1C).

En la microscopia debe buscarse específicamente la producción de **una sola hilera de fiálides** sobre la **mitad superior** de una **vesícula con forma de maza** (fig. 21-22). Los **conidios** son **esféricos**, por lo general lisos y dispuestos en **cadena largas** que tienden a **inclinarse hacia adentro**, hacia un eje central. Pueden presentar pigmentación amarilla verdosa o verde. Los conidióforos son relativamente largos (300-500 µm) y cada uno se origina de un segmento especial de una hifa tabicada conocido como **célula pie** o basal (véase fig. 21-18).

ASPERGILLUS FLAVUS

Las colonias de *A. flavus* son granulares a vellosas y presentan cierto tinte **amarillo, amarillo verdoso o amarillo castaño** (véase lámina en color 21-1D).

En el examen microscópico, lo que capta el ojo de inmediato es la disposición en **pétalos de margarita** de las **cadena de conidios**, de las cuales se origina **una sola hilera o dos de fiálides** que recubre la circunferencia completa de una vesícula esférica (fig. 21-23). El conidióforo es relativamente largo (500-800 µm), con una parte que presenta una **rugosidad característica** de la pared sólo proximal a la unión de la vesícula. Los conidios son esféricos, lisos o ligeramente ásperos cuando maduran y presentan una pigmentación amarillo castaño.

ASPERGILLUS NIGER

La superficie de una colonia madura de *A. niger* está cubierta por un agregado denso de **conidios negro azabache**, lo que le da un aspecto característico como sazonada con pimienta (véase lámina en color 21-1E). El reverso de la colonia es de color **beige** o amarillo grisáceo, en contraste con la pigmentación más oscura gris a negra de los hongos dematiáceos que se describen más adelante.

La observación microscópica revela **esporulación profusa**, con agregados densos de conidios individuales o en cadenas cortas negro azabache que suelen **cubrir la superficie de la**

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-1 Zigomicosis

Los hongos que pertenecen a los zigomicetos son habitantes ambientales extensamente distribuidos en el suelo, el estiércol y la materia orgánica. Los seres humanos suelen sufrir infecciones respiratorias altas a través de la inhalación de esporas transportadas por el aire, aunque la ingestión de productos alimenticios contaminados puede provocar enfermedad gastrointestinal primaria o la inoculación directa por traumatismos de la piel y las mucosas puede causar infección mucocutánea primaria. La proclividad de las hifas para invadir las paredes de los vasos sanguíneos una vez que se ha establecido la infección primaria produce la diseminación de trombos micóticos y el desarrollo de focos metastásicos en muchos órganos.

La zigomicosis afecta con mayor frecuencia en forma de infecciones oportunistas a huéspedes inmunodeprimidos. Los factores de riesgo del huésped son la diabetes mellitus, en especial durante los períodos de acidosis; la neutropenia; el tratamiento inmunosupresor sostenido (como puede suceder en los trasplantes de médula ósea);⁵⁵ el uso prolongado de antibióticos y la alteración de la integridad de la barrera cutánea secundaria a traumatismo, heridas quirúrgicas, punciones con aguja o quemaduras.²³² Estos autores también indican que la enfermedad angioinvasora es una complicación común y causa trombosis vascular, infarto del tejido afectado y destrucción tisular por acción de proteasas, lipasas y micotoxinas. La liberación de trombos micóticos desde los sitios primarios puede conducir a la enfermedad diseminada. Las formas de la enfermedad más frecuentes son la rinocerebral, la pulmonar, la cutánea y la diseminada.

Una revisión realizada por Prabhu y Patel²²⁵ reitera la mayoría de los factores de riesgo de base ya mencionados. En particular, los procesos malignos de la sangre, el trasplante de médula ósea o de células madre de sangre periférica, la neutropenia, el trasplante de órganos sólidos, la diabetes mellitus con cetoacidosis o sin ella, el uso excesivo de corticosteroides y el tratamiento con deferoxamina para la sobrecarga de hierro se citan como causales de predisponer a los pacientes a la infección. El interés está en reducir la elevada mortalidad que puede alcanzar al 100%, de acuerdo con las enfermedades subyacentes. Los resultados exitosos dependen del diagnóstico temprano, el tratamiento de la enfermedad médica de base, la cirugía cuando está indicada y el tratamiento con anfotericina B. Las fórmulas de anfotericina B con dosis elevadas de lípidos y el uso de oxígeno hiperbárico son estrategias particulares que han mostrado valor potencial en el tratamiento de la zigomicosis, como lo señalan González, Rinaldi y Sugar.⁹⁷

Rhizopus es el género de *Zygomycetes* aislado más a menudo por cultivo en las infecciones humanas, seguido en incidencia de las especies de *Mucor*. Otras especies de *Zygomycetes* se aíslan con menor frecuencia. No es habitual aislar especies de *Cunninghamella* en los laboratorios clínicos. No obstante, varios informes de casos indican que se ha aislado este microorganismo como agente causal de cada una de las formas más comunes de zigomicosis: rinocerebral, pulmonar, cutánea y enfermedad diseminada. Kontoyianis y cols.¹⁴⁸ describen las predisposiciones clínicas comunes de las infecciones por *Cunninghamella bertholletiae*; a saber, corticoterapia previa, granulocitopenia intensa prolongada y diabetes mellitus. La fiebre y la neumonía fueron las presentaciones clínicas más comunes en esta serie de pacientes, por lo general una indicación de enfermedad diseminada. Las infecciones por *Cunninghamella* suelen ser rápidamente progresivas y el resultado en la mayoría de los casos informados en la bibliografía ha sido casi siempre mortal. El tratamiento enérgico con anfotericina B, la resección de los tejidos infectados y el control de la enfermedad subyacente pueden revertir esta tendencia.

Enfermedad rinocerebral

Esta forma de infección comienza a menudo como sinusitis, que progresa a la enfermedad local invasora, con edema de párpados, proptosis, anestesia malar y oftalmoplejía interna y externa. En muchos casos, la infección es rápidamente progresiva, aunque también se informaron formas con progresión lenta.¹¹⁶ Puede observarse secreción nasal espesa, oscura, teñida con sangre; los materiales correspondientes a detritos del seno pueden parecer teñidos de negro y hemorrágicos debido a la invasión vascular y al infarto. La meningitis y la encefalitis pueden ocurrir por diseminación directa y suelen ser mortales. La enfermedad cerebral localizada es rara, pero más frecuente en drogadictos intravenosos.¹⁸² Nenoff y cols.¹⁹⁵ informaron un caso de infección cerebral ascendente en un paciente después del trasplante en quien se manifestó amaurosis total bilateral (ceguera). La enfermedad cerebral también se ha informado en pacientes con SIDA, relacionada tal vez con la inyección de drogas. La confusión y las perturbaciones del estado de ánimo son los signos de presentación más comunes del compromiso cerebral. En los drogadictos también se ven masas ocupantes y abscesos cerebrales. Una vez que se manifiestan los síntomas cerebrales, el proceso suele ser rápidamente mortal, como sucedió en el caso de Nenoff ya citado. También pueden verse infecciones con granulomas micóticos no invasores de los senos nasales.

Enfermedad pulmonar

En las radiografías pueden verse infiltrados difusos o finamente nodulares mal definidos.¹⁸⁹ También puede observarse **afectación por bolas micóticas** en lesiones naturales preexistentes o posinfección. El dolor torácico, la hemoptisis y la tos productiva purulenta o teñida con sangre del esputo son presentaciones clínicas frecuentes. La enfermedad pulmonar subaguda suele ser intrabronquial, con la formación de tapones de mucina. En ocasiones se afecta la pleura.

Enfermedad cutánea

La enfermedad cutánea suele ser secundaria al traumatismo y la contaminación con tierra,²⁷⁶ en pacientes con quemaduras,⁵¹ y episódica, por la implantación directa de vendas adhesivas Elastoplast®.²¹¹ En ocasiones, el compromiso subcutáneo por la diseminación hemática complica la enfermedad diseminada. Las lesiones varían de placas violáceas pequeñas hasta celulitis, ulceración y gangrena. En los últimos tiempos se citaron casos de enfermedad subcutánea por zigomicetos que pertenecen al orden Entomophthorales, en especial en niños y adultos jóvenes. Gugnani⁹⁹ ha revisado infecciones causadas por *Basidiobolus ranarum*, que se presentan sobre todo como lesiones granulomatosas fluctuantes de las piernas y el tronco, secundarias a traumatismo, picaduras de insectos o ambos. El yoduro de potasio, la anfotericina B y los azoles se utilizaron con éxito en el tratamiento de estos casos.

Enfermedad diseminada

Casi cualquier órgano puede estar afectado, a partir de la diseminación de infecciones primarias en pulmón, senos paranasales y aparato digestivo.²³⁴ Los individuos afectados con mayor frecuencia son los inmunodeprimidos debido a su edad (muy pequeños y ancianos), al tratamiento con fármacos o a enfermedades subyacentes, como procesos malignos hemáticos (en especial durante los períodos de leucopenia), diabetes mellitus y lupus eritematoso.²⁵¹ Aunque no define al SIDA, la enfermedad diseminada sucede con más probabilidad en los pacientes HIV positivos, como lo analizaron Van den Saffele y Boelaert.²⁷⁹ La diseminación metastásica ocurre por la propensión de las hifas para invadir la vasculatura, lo que causa trombosis y la liberación de émbolos micóticos a la circulación. La zigomicosis también se ha informado en casos de **sobrecarga de hierro**, específicamente en pacientes que sufren hemodiálisis secundaria al **tratamiento con deferoxamina**.²⁶ El crecimiento de muchos microorganismos, incluso los miembros de los zigomicetos, se refuerza por el aumento de las concentraciones de hierro. La relación entre zigomicosis y el tratamiento con deferoxamina depende de la acción quelante primaria del fármaco, lo que origina un aumento de la concentración local de hierro que estimula la proliferación del hongo.

vesícula (fig. 21-24, *recuadro superior*). En la madurez, los conidios se tornan ásperos (**equinulados**). Las vesículas desmenuadas, cuando se observan, son globulosas y cubren la superficie completa con una **hilera doble de fiálides** similar en el aspecto a *Aspergillus flavus* (fig. 21-24, *recuadro inferior*).

ASPERGILLUS TERREUS

Las colonias de *A. terreus* son granulares, con rugosidad radial y de color *beige* a canela, castaño o anaranjado castaño (véase lámina en color 21-1F).

A primera vista, las cabezas de fructificación de *A. terreus* aparecen microscópicamente similares a las de *A. fumigatus* (la esporulación desde la **mitad superior de una vesícula con forma de maza**). El examen más detallado revela que las vesículas de *A. terreus* son más pequeñas y las fiálides son mucho más largas, que de hecho representan una **hilera doble e interdigitada** de modo que la línea de división entre las dos suele ser oscura (fig. 21-25). Las fiálides primarias (**métulas**) son más cortas (5-8 μm) que las terminales (8-12 μm), las que a su vez dan lugar a cadenas largas de conidios lisos, casi esféricos. La identificación de *A. terreus* puede confirmarse mediante la demostración, en preparaciones de la zona de excavación del agar o por disección del micelio subyacente, de los **microconidios** lisos y esféricos adheridos lateralmente a las hifas vegetativas (fig. 21-26).

ASPERGILLUS NIDULANS

A. nidulans rara vez se aísla en los laboratorios clínicos, pero se incluirá aquí una descripción breve porque esta especie suele producir estructuras reproductivas sexuales (telomorfa) (cleistotecios y ascosporas) que se describirán a continuación. Las colonias suelen ser blancas o blanco grisáceas, con consistencia algodonosa a granular y pueden tener pliegues radiales (véase lámina en color 21-2G). En las colonias maduras aparece un moteado oscuro cuando se producen los cleistotecios. *Aspergillus glaucus* también pueden producir cleistotecios y ascosporas. La colonia suele ser algodonosa a granular y presenta pigmentación multicolor verde y amarilla (véase lámina en color 21-1H).

Los aspergilos, que pertenecen a la **clase Ascomycetes**, pueden reproducirse “sexualmente” a través de la unión de dos células con la formación de estructuras saculares conocidas

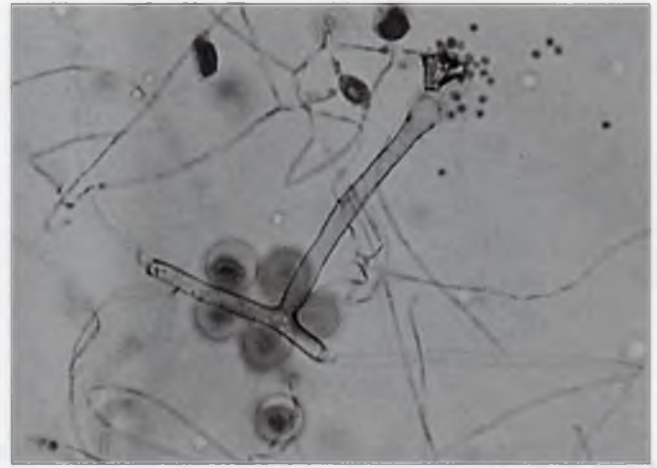


Figura 21-19 Microfotografía de la estructura de fructificación de una especie de *Aspergillus* que muestra el conidióforo originado de una “célula pie” o basal.

como **cleistotecios** (véase fig. 21-21). Dentro de cada cleistotecio se encuentran miríadas de ascos en el cada uno contiene cuatro u ocho **ascosporas** (infinidades de estructuras saculares pequeñas ilustradas en la fig. 21-27). Algunas cepas también producen cuerpos hialinos y esféricos conocidos como células de Hülle, mostradas en la figura 21-28 (*cuerpos esféricos grandes arriba y a la izquierda*). Estas **estructuras “telomorfas”** raras veces se observan en las muestras clínicas. *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus glaucus* son dos especies asiladas con poca frecuencia en los laboratorios clínicos que de modo característico producen cleistotecios y ascosporas. Las ascosporas son más grandes que los conidios, se tiñen de modo más intenso y tienen una morfología exclusiva para cada especie que puede ser reconocida por los especialistas en la disciplina.

Histopatología

Las hifas de las especies de *Aspergillus*, como se observan en los cortes teñidos de tejidos, son hialinas, tabicadas, con contorno regular y paredes paralelas. Miden de 3 a 6 μm de diámetro y están divididas por tabiques transversales (fig. 21-29).

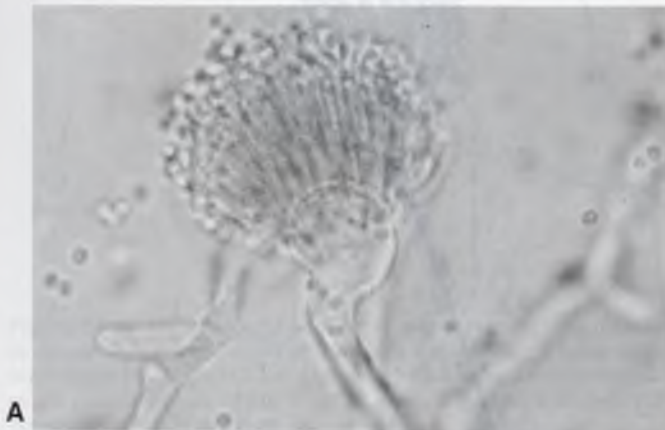


Figura 21-20 Microfotografía y esquema de una cabeza de fructificación de especies de *Aspergillus*, que muestran la vesícula dilatada que da origen a las fiálides, a partir de las cuales se producen cadenas de conidios.

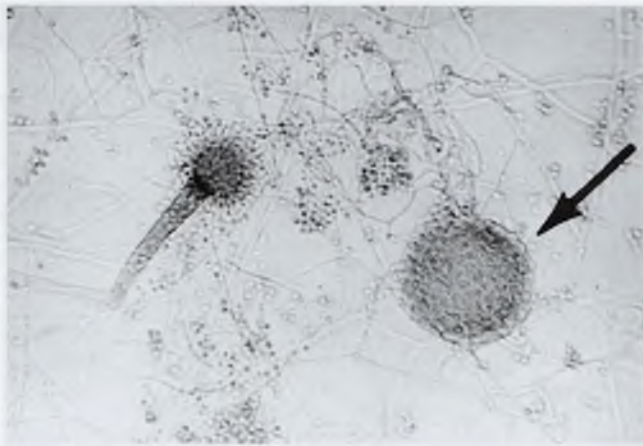


Figura 21-21 Microfotografía de un cleistotecio (flecha) de *Aspergillus glaucus*, que muestra la forma de reproducción sexual o teleomorfa. A la izquierda se observa una cabeza de fructificación anamorfa típica.

La ramificación dicotómica regular en ángulos de 45° es útil para diferenciar a estos hongos de otros que también forman hifas. Estas últimas no se tiñen bien en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina (H-E), pero se visualizan bien con las tinciones de PAS y metenamina argéntica de Gomori. La reacción del tejido en huéspedes inmunocompetentes infectados por estos hongos puede ser primero purulenta y luego granulomatosa. Con más frecuencia la invasión de las hifas a los tejidos no se acompaña por una respuesta celular y sólo se observan grados variables de necrosis. Las especies de *Aspergillus*

tienen una predilección particular para invadir los vasos sanguíneos y causar trombosis e infarto hemorrágico. Como ciertas cepas producen ácido oxálico, en el tejido invadido pueden observarse depósitos locales de oxalato de calcio, que aparecen como cristales birrefringentes.

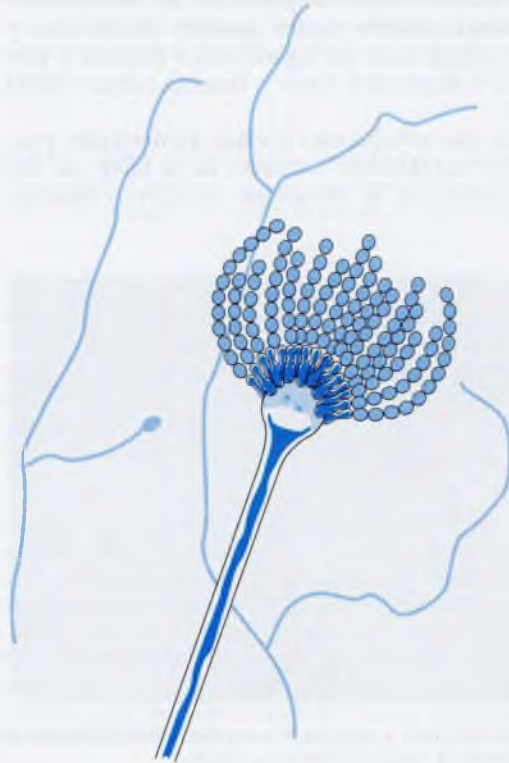
Cuando una colonia del hongo crece dentro de una cavidad preexistente, como en un seno nasal o dentro de un quiste pulmonar congénito o inflamatorio, la lesión se conoce como “bola micótica” o aspergiloma. Con frecuencia, las hifas son amorfas y se tiñen de modo deficiente. Pueden verse las cabezas de fructificación con vesículas bien formadas y cadenas de conidios dentro de cavidades que están conectadas para abrirse a los bronquios y quedar expuestas al aire (fig. 21-30). El revestimiento de la cavidad suele estar intacto, sin evidencia de extensión en el tejido circundante. En la aspergilosis broncopulmonar, los bronquios y los bronquiólos suelen dilatarse y se llenan con material viscoso, mucinoso, en el que quedan atrapados detritos celulares, muchos eosinófilos, neutrófilos esparcidos, linfocitos, plasmocitos y fragmentos de hifas. La ramificación a 45° típica de estos fragmentos puede verse en las preparaciones directas en fresco del esputo que, cuando se acompaña por eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden, proporciona la evidencia suficiente para hacer un diagnóstico presuntivo de aspergilosis.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

El sistema de prueba Platelia *Aspergillus*® es un equipo para el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) en sándwich que en la actualidad está disponible en muchos laboratorios de referencia y que proporciona un medio para la detección del galactomanano circulante de *Aspergillus* temprano en el curso de la enfermedad progresiva.¹⁸⁰ Aunque en ensayos clíni-



Figura 21-22 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de *Aspergillus fumigatus*, que muestran una sola hilera de filídes proveniente de la mitad superior de una vesícula a partir de la cual se producen cadenas de conidios.



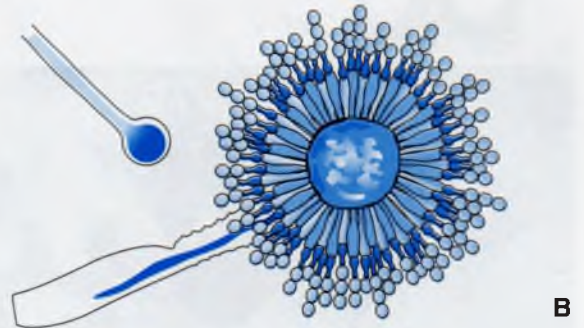
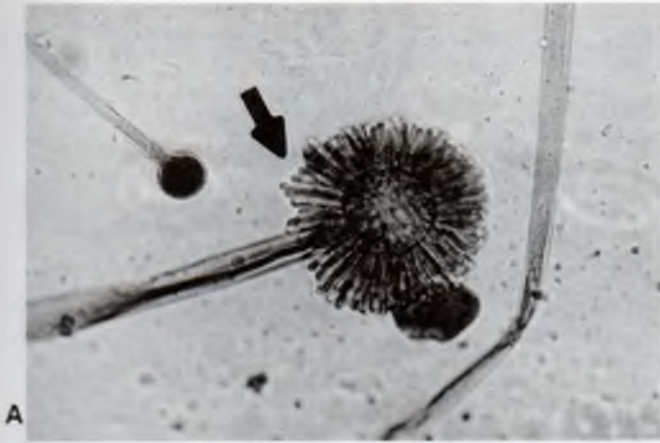


Figura 21-23 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de *Aspergillus flavus*, que muestran una vesícula esférica central que sostiene una hilera doble de filídes proveniente de toda la superficie.

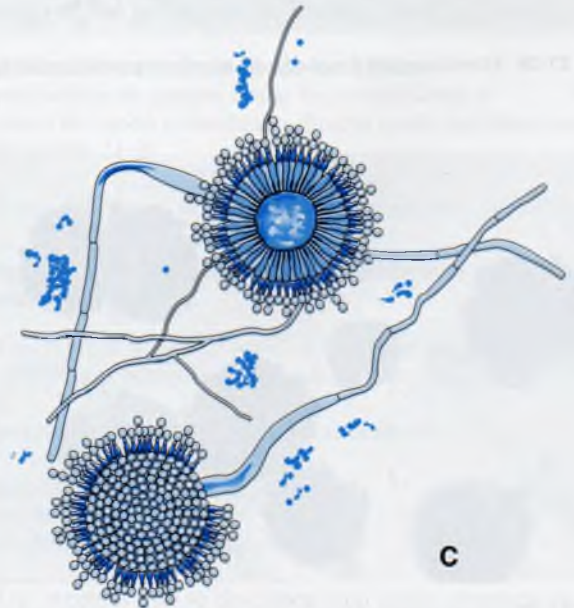
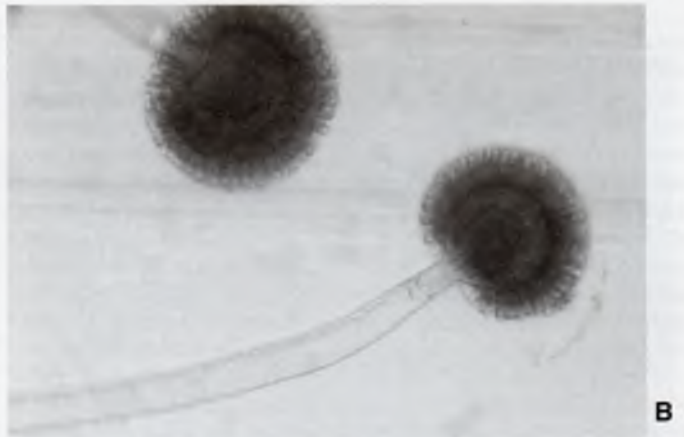
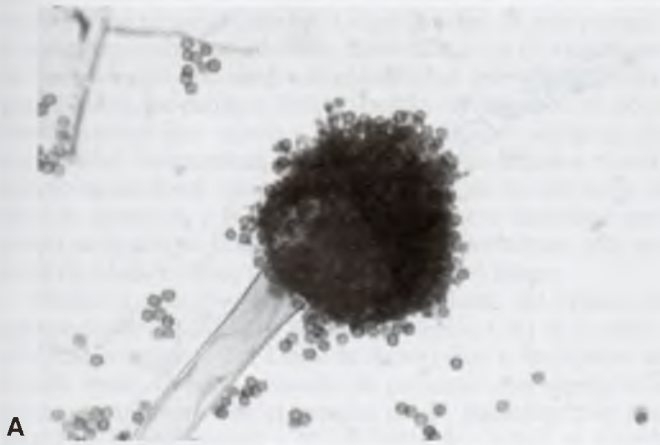


Figura 21-24 Microfotografías y esquema de la estructura de fructificación de *Aspergillus niger*. La esporulación suele ser tan densa que cubre toda la superficie de la vesícula (A). Las cabezas de fructificación desnudas consisten en una vesícula esférica a partir de la cual se origina una doble hilera de filídes que cubre toda la superficie (B).

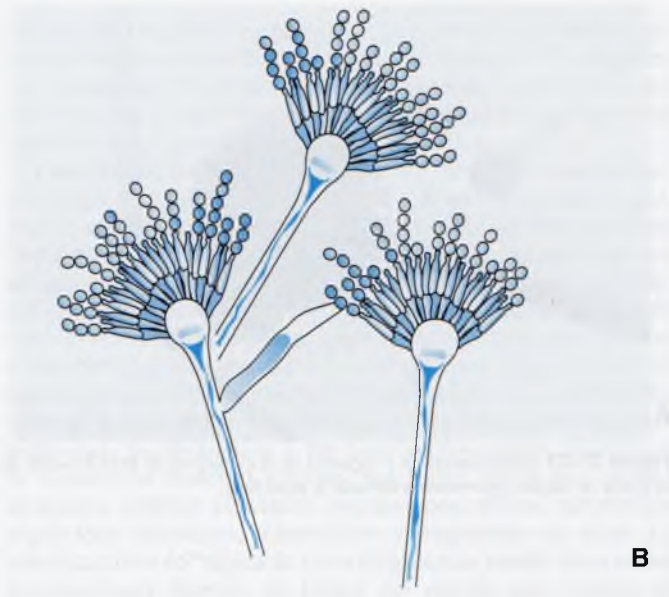
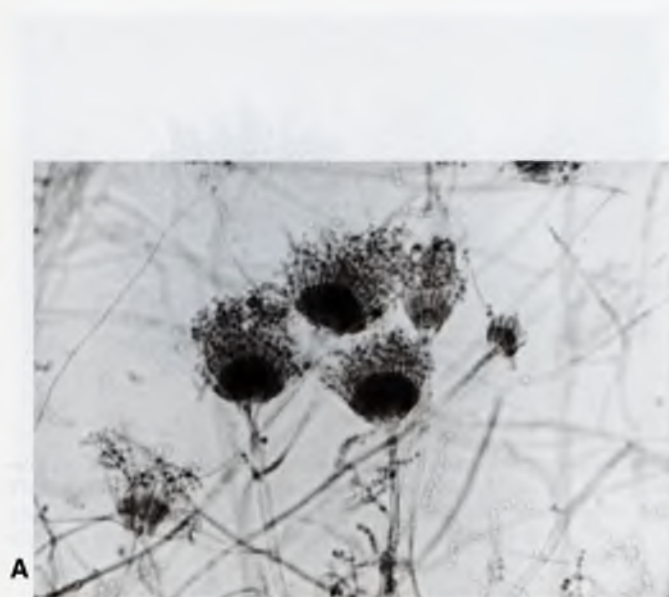


Figura 21-25 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de *Aspergillus terreus* que revela conidióforos que terminan en una vesícula dilatada desde la mitad superior de la cual se origina una hilera doble de esterigmas que da lugar a las cadenas de conidios.

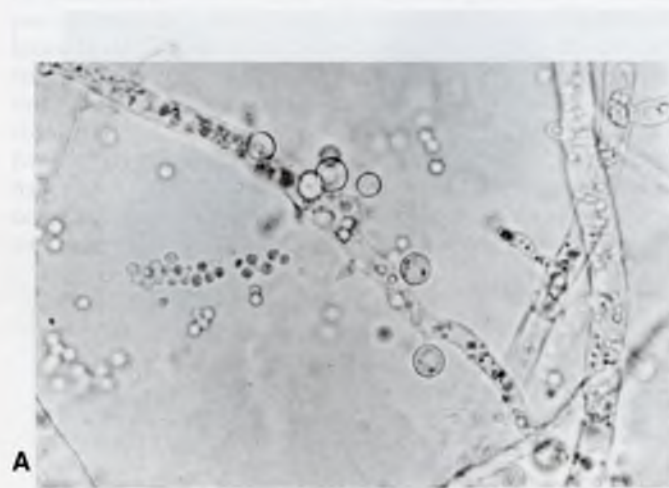


Figura 21-26 Microfotografía y esquema del micelio vegetativo profundo de *Aspergillus terreus*, que muestran los microconidios esféricos característicos de las especies.

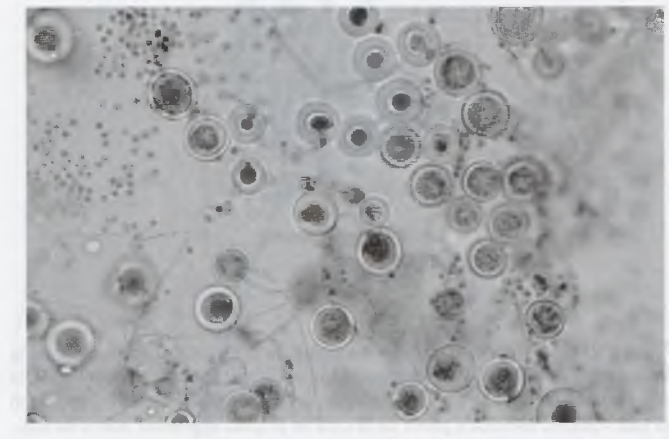
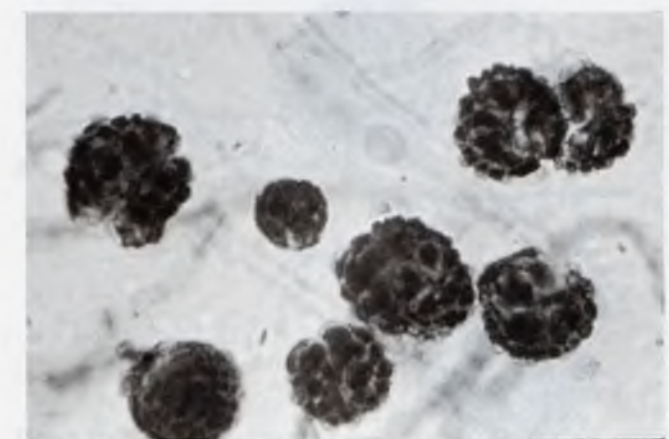


Figura 21-27 Microfotografía de varios cleistotecios de *Aspergillus nidulans* que incluyen ascos saculares más pequeños que contienen ascosporas.

Figura 21-28 Microfotografía de un cleistotecio de *Aspergillus nidulans* en cuya adyacencia se encuentran grupos de células de Hülle esféricas, hialinas y con paredes delgadas.

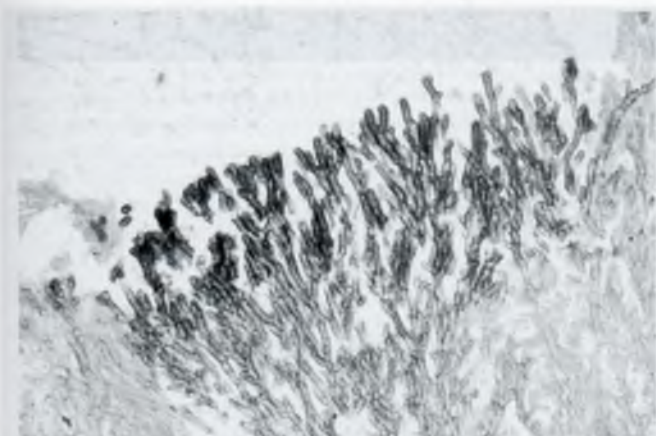


Figura 21-29 Microfotografía de la ramificación dicotómica de las hifas de especies de *Aspergillus* como se observan en un corte de tejido teñido con H-E.

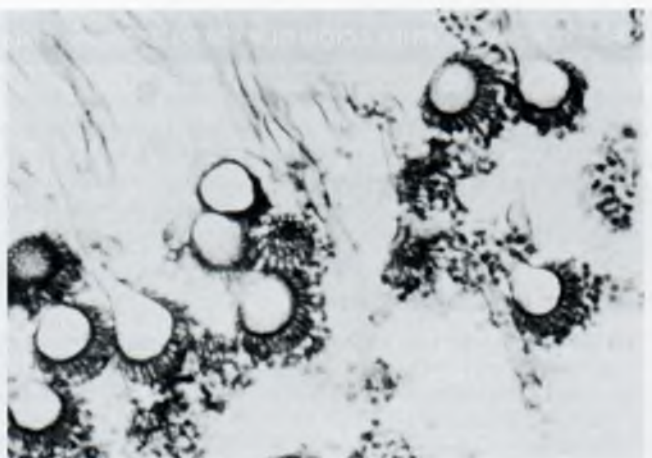


Figura 21-30 Microfotografía del material proveniente de la infección con bolas micóticas de *Aspergillus* (aspergiloma) que ilustra las vesículas con forma de maza con la esporulación sólo en la mitad superior de las vesículas, características de *Aspergillus fumigatus* (H-E, 400×).

cos y estudios de investigación diferentes se ha encontrado variación en la sensibilidad y la especificidad de este procedimiento, representa un adelanto fundamental en el tratamiento de los pacientes con riesgo de enfermedad diseminada, en especial en los que padecen SIDA. Se están investigando los posibles factores que afectan la liberación del antígeno de *Aspergillus*, la naturaleza del epítipo que reacciona con el anticuerpo monoclonal utilizado en el ELISA, su escape desde el sitio de infección y la manera como se une a sustancias presentes en la sangre. Una vez resueltos estos problemas, este sistema de ELISA ofrece gran esperanza para el futuro.

Musher y cols.¹⁹¹ evaluaron el rendimiento del ensayo de galactomanano (GM EIA, Bio-Rad, Benicia, CA) en la detección del antígeno o del DNA de *Aspergillus* o en líquido de lavado broncoalveolar obtenido de pacientes con aspergilosis pulmonar invasora. En el estudio de 47 pacientes con esta forma de la enfermedad y 46 pacientes de control, el ensayo GM EIA mostró una sensibilidad del 76% y una especificidad del 94%. Estos autores citan el costo relativamente bajo, la facilidad del proceso y los resultados rápidos obtenidos con este ensayo que usa la broncoscopia como una alternativa viable a una biopsia para establecer un diagnóstico de aspergilosis invasora, en especial en pacientes de alto riesgo.

En el recuadro de correlación clínica 21-2 se muestran las diversas presentaciones clínicas de la aspergilosis.

Otros hongos filamentosos hialinos de crecimiento rápido CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS

Como se muestra en el diagrama 21-2, puede sospecharse un hongo filamentosos hialino que pertenece al grupo general conocido como hialohifomicetos, si se aíslan colonias de crecimiento rápido, algodonosas, vellosas o granulares en el cultivo dentro de los 3-5 días y que por lo general presentan una diversidad de colores pasteles pálidos en la superficie. Las colonias tienen típicamente un borde externo liso, salvo las de especies de *Gliocladium* y *Trichoderma*, cuyas colonias cubren toda la superficie y forman un crecimiento confluyente ("en césped") verde o amarillo. Las colonias parecen más granulares en la superficie, lo cual depende del grado de esporulación. El reverso de las colonias sigue siendo de tinte gris pálido o beige.

Aunque suelen considerarse saprófitos no perjudiciales, durante las últimas dos décadas algunos de los hongos filamentosos hialinos han surgido como agentes de micosis oportunistas con la morbilidad consiguiente en los pacientes con enfermedades de base graves y compromiso de las defensas. Las últimas tendencias epidemiológicas indican un cambio en el aumento de las infecciones causadas por hongos oportunistas antes considerados infrecuentes, como las especies de *Fusarium*, de *Acremonium*, de *Paecilomyces*, *Pseudallescheria boydii* y *Scedosporium prolificans*. El aumento llamativo en los procedimientos de trasplantes de órganos y los nuevos tratamientos inmunosupresores más energéticos son los principales determinantes de este cambio.

Los hongos filamentosos hialinos de importancia médica y aislados con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos se dividen en tres subgrupos, de acuerdo con si los conidios son:

- producidos en cadenas desde las fiálides
- producidos en grupos desde los conidióforos o
- nacen de modo individual y directo desde las hifas (véase diagrama 21-2)

Estos subgrupos se presentan en los párrafos siguientes.

Géneros de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en cadenas

Los hongos filamentosos hialinos descritos aquí se caracterizan por la producción de conidios en las cadenas.

Especies de importancia en el laboratorio

Especies de *Penicillium*
Especies de *Paecilomyces*
Especies de *Scopulariopsis*

Las especies que se describen aquí están caracterizadas por la producción de conidios en cadenas. En el diagrama 21-2 se brindan las pautas para la separación de estas tres especies.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-2 Aspergilosis

La infección puede presentarse como síndromes clínicos bien definidos que afectan varios sitios y órganos: aspergilosis pulmonar, diseminada, del sistema nervioso central, cutánea, endocránea y nasoorbitaria. La aspergilosis pulmonar puede dividirse además en subgrupos: colonización saprofita, micetomas o infección por "bolas micóticas" o aspergilomas; forma broncopulmonar alérgica; e invasora.²⁵⁴ Estas formas clínicas de la enfermedad pulmonar constituyen un espectro continuo, que varía desde la enfermedad invasora en el paciente gravemente inmunodeprimido hasta las reacciones de hipersensibilidad en pacientes con respuesta inmunitaria hiperactiva a la colonización no invasora del árbol bronquial en personas por lo demás normales con áreas antes enfermas del pulmón. La aspergilosis diseminada ocurre con mayor frecuencia en pacientes gravemente inmunosuprimidos y puede estar afectado cualquier órgano.

Aspergilosis broncopulmonar alérgica

Esta forma afecta sobre todo los bronquios y los bronquiolos. Las características distintivas consisten en inflamación peribronquiolar, con infiltrados de eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden atrapados dentro de los tapones de mucina expectorados en las muestras de esputo. Lee y cols.¹⁵⁶ sugieren que para hacer un diagnóstico de aspergilosis broncopulmonar alérgica deben seguirse los siguientes criterios:

- obstrucción bronquial episódica
- eosinofilia en sangre periférica
- reactividad cutánea frente al antígeno de *A. fumigatus*
- anticuerpos precipitantes en suero contra *A. fumigatus*
- elevación de IgE total en suero
- antecedentes de infiltrado pulmonar
- elevación de IgE e IgG específicas en suero contra *A. fumigatus*
- bronquiectasia proximal

En los casos de aspergilosis broncopulmonar, las concentraciones de IgE e IgG contra *Aspergillus fumigatus* pueden estar elevadas tanto en suero como en muestras de lavado broncoalveolar. Las especies de *Aspergillus* que con mayor frecuencia causan la enfermedad broncopulmonar alérgica son *A. flavus* y *A. fumigatus*.

Infecciones con bolas micóticas (aspergilomas)

Las infecciones con formación de aspergiloma se desarrollan en cavidades preexistentes, ya sean naturales (senos paranasales) o adquiridas (neumoquistes inflamatorios, por lo general secundarios a una tuberculosis antigua). El aspergiloma a menudo consiste en una masa enredada de hifas, casi siempre muertas. En los aspergilomas pulmonares, cavidades provistas de aire a través de un bronquio abierto que pueden contener las cabezas de fructificación viables, la detección de éstas puede llevar al diagnóstico definitivo. En la mayoría de los casos, el aspergiloma permanece limitado a la cavidad sin invasión del parénquima circundante. Sin embargo, Nolan y cols.¹⁹⁶ advierten que los aspergilomas no deben considerarse un cuadro inactivo, ya que se han informado casos de hemoptisis intermitentes o exangües y, en ocasiones, la erosión de las estructuras adyacentes causa enfermedad o muerte.

Aspergilosis pulmonar invasora

Esta forma aparece casi con exclusividad en los pacientes inmunodeprimidos o neutropénicos, en especial en los que padecen leucemias y linfomas.²⁶² La enfermedad a menudo se presenta como neumonía (tos, fiebre, signos de dificultad respiratoria). La invasión pleural puede producir causar dolor torácico y frote pleural. Debido a la propensión de las hifas por crecer e invadir los vasos sanguíneos, es posible la enfermedad diseminada con focos metastásicos en el sistema nervioso central y otros órganos.

Aunque *Aspergillus fumigatus* y, con menor frecuencia, *Aspergillus flavus*, son las dos especies más implicadas,¹⁵⁴ en los últimos tiempos también se mencionó la participación de *Aspergillus terreus*. Woods y Goldsmith³⁰¹ informaron cuatro casos de enfermedad diseminada causados por *A. terreus* y encontraron cinco casos más publicados en la literatura médica. En una revisión más reciente de infecciones invasoras por *A. terreus*, Iwen y cols.¹²⁷ seleccionaron 13 pacientes de la literatura, 10 de los cuales fallecieron como consecuencia de la diseminación a distancia de la enfermedad. Casi todas las cepas implicadas eran resistentes a la anfotericina B.

Aspergilosis diseminada

Como las especies de *Aspergillus* son propensas a invadir los vasos sanguíneos, la diseminación extensa a casi cualquier tejido u órgano sigue siendo una amenaza en todo caso de enfermedad localizada. Denning y Stephens,⁶¹ en una revisión de más de 2 000 casos de aspergilosis escogidos de la literatura, encontraron que la aspergilosis en los receptores de trasplante de médula ósea es especialmente devastadora, con una mortalidad del 94% en los casos informados, a pesar del tratamiento. La tasa global de respuesta al tratamiento con anfotericina B de todos los casos revisados en esta serie fue del 55%.

Ho y Yuen¹²¹ postularon que la elevada mortalidad causada por la aspergilosis invasora entre los receptores de trasplante de médula ósea se debe al retraso en el diagnóstico porque disminuye la respuesta inflamatoria por la inmunosupresión.

Aunque el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) no se considera por sí un factor de riesgo para la aspergilosis pulmonar invasora, los factores de riesgo de base, como la neutropenia, el uso de corticosteroides y el abuso de drogas intravenosas, expone a estos pacientes a un riesgo particular. En una revisión de una serie de pacientes de SIDA con aspergilosis realizada por Singh y cols.,²⁵⁹ se encontró que el 79% presentaba uno o más de estos factores de riesgo predisponentes conocidos. La aspergilosis invasora es más frecuente en las fases más tardías del SIDA, cuando el recuento de linfocitos CD4+ es bajo y cuando se lo diagnostica tiene un pronóstico desfavorable. Sólo el diagnóstico temprano puede mejorar el pronóstico.¹³⁸

Otra enfermedad asociada con las infecciones por *Aspergillus* es la otitis externa ("oído del nadador", una inflamación local crónica del conducto auditivo caracterizada por prurito, dolor y descamación) que en su mayoría puede estar causada por *A. niger*. Casi todos los pacientes pueden curarse con el tratamiento con antimicóticos tópicos y evitando la exposición al agua. La sinusitis por *Aspergillus*, a menudo indistinguible por la clínica de la sinusitis viral, bacteriana o alérgica y que aparece en huéspedes inmunocompetentes, ha sucedido al menos en 29 casos informados desde 1987.⁴⁶ Se han informado varios casos aislados de aspergilosis que afectan casi cualquier órgano, con enfermedades predisponentes en estos estudios relacionados a menudo con neutropenia prolongada, procesos malignos hemáticos, traumatismo o cirugía de la columna vertebral y uso prolongado de corticosteroides.

ESPECIES DE *PENICILLIUM*

Las colonias de las especies de *Penicillium* son granulares, de bordes lisos, por lo general con varias tonalidades de verde, aunque a veces se encuentran variantes amarillas y amarillo castañas (lámina en color 21-2A). Una especie implicada recientemente en infecciones sistémicas es *Penicillium marneffei* y puede sospecharse si se observa un pigmento rojo vino que se difunde en el agar (véase lámina en color 21-2B).

Como se observa con el microscopio, el “**penicilio**” (cepillo) se produce por la bifurcación del conidióforo en la métula primaria y las **fiálides** secundarias, a partir de cuyos extremos se originan cadenas de conidios (fig. 21-31). Es importante observar que los extremos de las fiálides son **romos**, es decir, como si el corte fuera transversal con un elemento cortante, en lugar de largos y adelgazados. Los conidios son **esféricos**, de tamaño **regular** y con una **tinción uniforme**, lo que representa un tipo de conidiación **acrópeta** en la cual se forman conidios idénticos en secuencia desde los extremos de los conidios ya formados (véase recuadro 21-1).

ESPECIES DE *PAECILOMYCES*

Las colonias de las especies de *Paecilomyces* pueden parecer similares a las de las especies de *Penicillium*, aunque suelen tener un color pastel más claro y se encuentran con mayor frecuencia las variantes amarillo castañas o castañas. La superficie tiende a ser bastante granular debido a la producción de enorme cantidad de conidios (véase lámina en color 21-2C).

Dos observaciones microscópicas importantes conducen a la identificación de las especies de *Paecilomyces*. Las puntas de las **fiálides** son **largas y adelgazadas** y terminan en un “**punto**”, a diferencia de los extremos finos y romos de las fiálides

observadas en las especies de *Penicillium* (fig. 21-32). La segunda es que los conidios son **ovales a elípticos, de tamaño irregular y tinción no uniforme**, lo que representa la conidiación **basípeta** en la que cada conidio nuevo se forma directamente de la punta de la fiálide, lo cual empuja al conidio anterior delante de él. Los conidios “más viejos” en las puntas son más grandes y con una tinción más oscura que los producidos con anterioridad. Por lo tanto, incluso en ausencia de fiálides características, la morfología de los conidios descrita permite la identificación.

ESPECIES DE *SCOPULARIOPSIS*

Las colonias presentan de modo característico una coloración amarillo castaña a **beige**, son granulares y tienen pliegues radiales que surgen desde el centro a la periferia (véase lámina en color 21-2D).

La identificación de las especies de *Scopulariopsis* puede hacerse por la microscopia mediante la observación del tamaño y la morfología de los conidios. Éstos son **dos a tres veces más grandes** que los de las especies de *Penicillium* y de *Paecilomyces*, con **forma de “limón”** y tienen una **base truncada** y plana. Se disponen en cadenas, con la base truncada de cada conidio sucesivo adherida al extremo redondo del anterior (fig. 21-33). En un comienzo los conidios son lisos; sin embargo, cuando la colonia madura, la pared externa se torna áspera (**equinulada**). El ajuste del foco del objetivo del microscopio puede evidenciar una **conexión en forma de bastón** entre los conidios adyacentes. La producción de conidios en las especies de *Scopulariopsis* es **anelógena**; es decir, cada conidio nuevo se forma a partir de una extensión del anterior, seguido de una contracción, lo que deja la base truncada engrosada o cicatriz conocida como **anélido**.

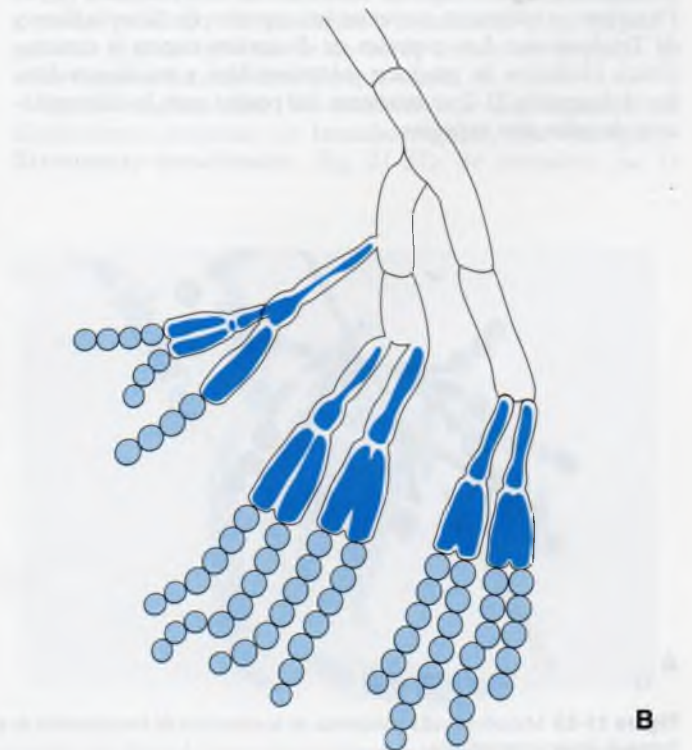
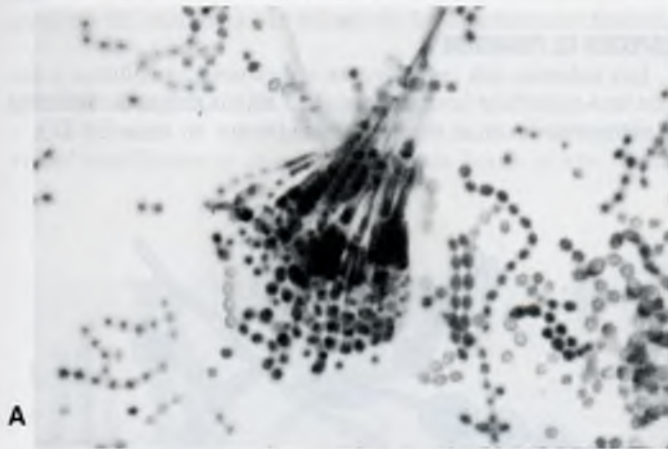


Figura 21-31 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Penicillium*, que muestran la ramificación de las fiálides a partir de las cuales se producen cadenas de conidios esféricos.

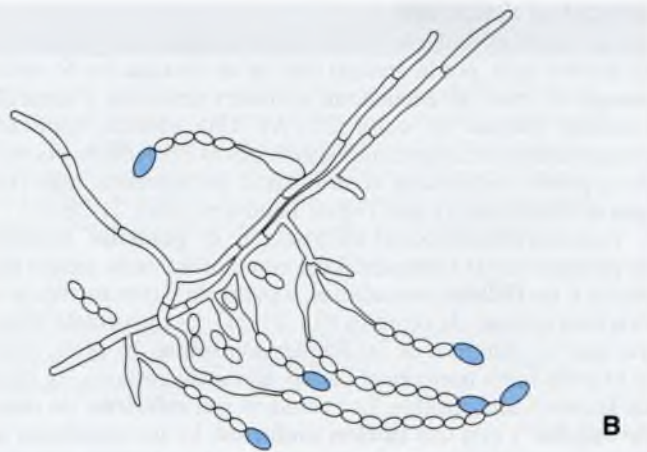


Figura 21-32 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Paecilomyces*, que muestran las fiálides largas, adelgazadas, de cuyas puntas se producen cadenas de conidios elípticos.

Identificación de hongos filamentosos hialinos productores de conidios en racimos

Especies de importancia en el laboratorio

Especies de *Acremonium*
Especies de *Fusarium*
Especies de *Gliocladium*
Especies de *Trichoderma*

Este grupo de hongos hialinos se caracteriza por la formación de conidios en racimos. Los conidios pueden ser alargados o elípticos, como en las especies de *Acremonium* y de *Fusarium*, o esféricos, como en las especies de *Gliocladium* y de *Trichoderma*. Las especies de *Fusarium* tienen la característica exclusiva de producir microconidios y macroconidios. En el diagrama 21-2 se muestran las pautas para la diferenciación de estas tres especies.

ESPECIES DE *ACREMONIUM*

Las colonias de las especies de *Acremonium* suelen aparecer menos vellosas o granulares que las de otros hongos filamentosos hialinos; más bien presentan un aspecto liso y sin vello debido a la producción de un micelio muy delicado. Las colonias pueden ser blancas o con varias tonalidades de verde pastel pálido y amarillo (véase lámina en color 21-2E).

Cuando se observan con el microscopio, los **conidios** de las especies de *Acremonium* son alargados y dispuestos en racimos laxos con **formación entrecruzada**, simulando las **letras chinas** o "**patrón difteroide**" (fig. 21-34). Cada racimo nace del extremo de un conidióforo delicado, largo y delgado, que termina en una punta roma. **No se observan macroconidios.**

ESPECIES DE *FUSARIUM*

Las colonias son casi siempre algodonosas o vellosas y tienen una superficie lavanda, rosada a roja o magenta distintiva y pigmentación en el reverso (véase lámina en color 21-2F).

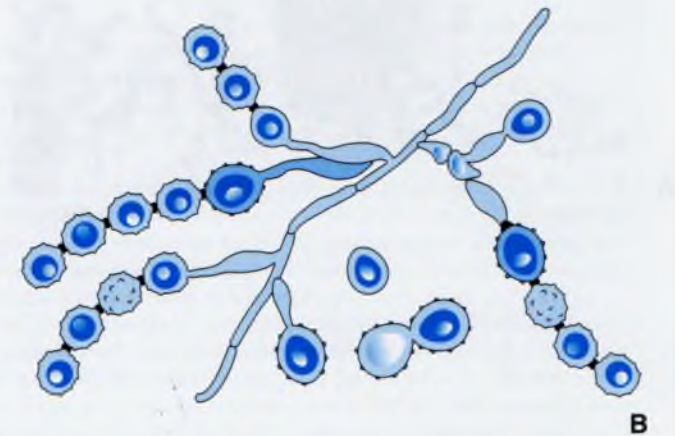
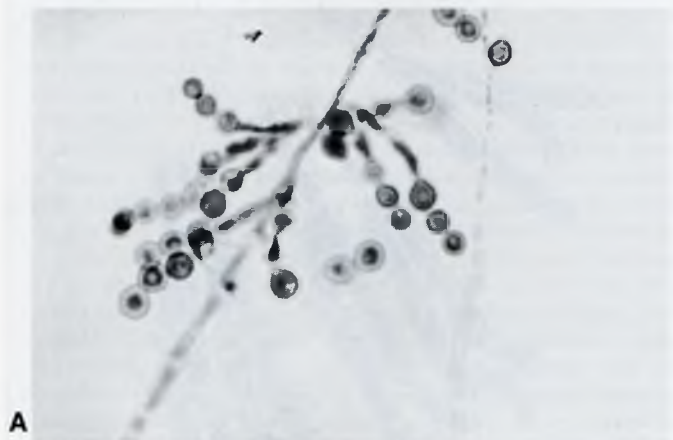


Figura 21-33 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Scopulariopsis*, que muestran las cadenas de aneloconidios grandes, con forma de limón característica.

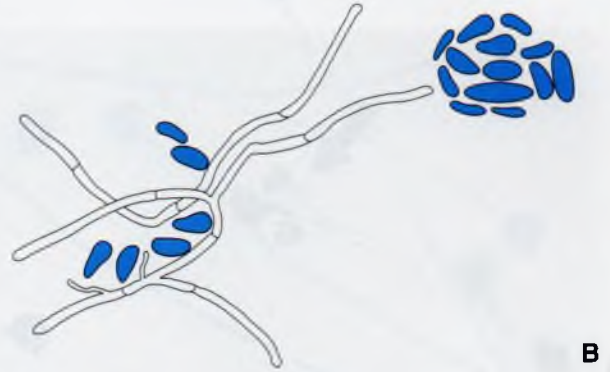
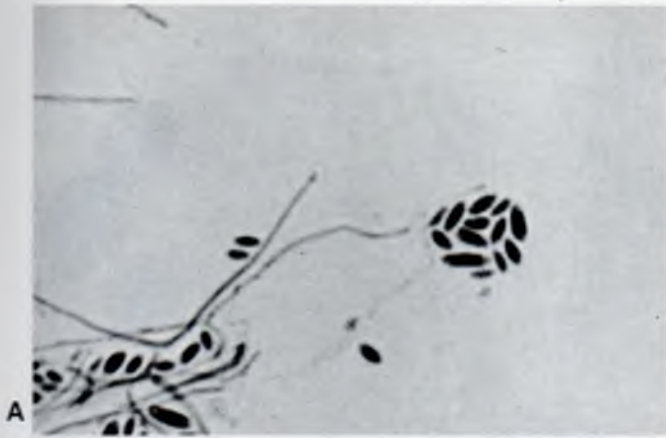


Figura 21-34 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Acremonium*, que muestran el conidióforo delicado que sostiene un racimo laxo de conidios elípticos dispuestos en un patrón "difteroide".

De los hongos filamentosos hialinos, las especies de *Fusarium* son las únicas que producen **microconidios** y **macroconidios**. Los microconidios son similares a los producidos por las especies de *Acremonium*; de hecho, algunos micólogos consideran que ambas especies están **genéticamente relacionadas** y es probable que sean especies **variantes dentro del mismo género**. La clave para la identificación de las especies de *Fusarium* es la observación de **macroconidios multicelulares largos, con forma de hoz**, cuyas células están separadas por tabiques transversales (fig. 21-35). Estos macroconidios a veces se describen como "canoas" o "barcos". El ajuste exacto del foco del microscopio sobre las células que forman filamentos revela una extensión similar a un pelo, denominada "**célula pie**". La formación de esta estructura es útil para la diferenciación de las especies de *Fusarium* (con célula pie) de las especies de *Cylindrocarpon* (sin célula pie), este último un microorganismo del suelo rara vez aislado en los laboratorios clínicos.

ESPECIES DE *GLIOCLADIUM*

Las colonias de las especies de *Gliocladium* son verdes o verde amarillentas y se extienden de un borde al otro de la

placa de agar como una "alfombra", sin un margen. La superficie suele ser pulverulenta (véase lámina en color 21-2H).

Los **conidios de tamaño regular y esféricos** de las especies de *Gliocladium*, cuando se observan con el microscopio, están **agrupados de modo compacto** y se asemejan a los producidos por las especies de *Trichoderma*. Sin embargo, a diferencia de estos últimos, en los cuales cada "ovillo" de conidios se origina en la punta de un solo conidióforo, cada racimo de las especies de *Gliocladium* está sostenido a las **puntas de tres o cuatro conidios adelgazados**, como si un racimo de moras estuviese sujeto en las puntas de tres dedos y el pulgar de la mano humana (fig. 21-36).

ESPECIES DE *TRICHODERMA*

Las colonias, similares a las de las especies de *Gliocladium*, también producen un crecimiento confluyente ("en césped") granular que se extiende de un borde al otro de la placa. El color tiende a ser más amarillo que verde.

En la microscopia, los conidios de las especies de *Trichoderma* presentan un **tamaño regular, son esféricos y firmemente arracimados** (fig. 21-37). Se considera que la



Figura 21-35 Microfotografía y esquema de los macroconidios largos, multicelulares, con forma de canoa, característicos de las especies de *Fusarium*.

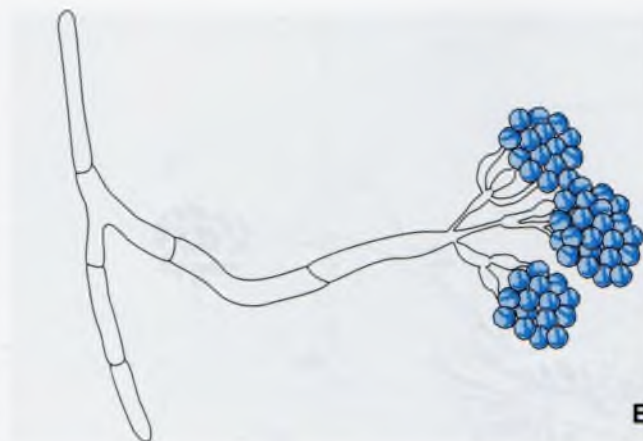


Figura 21-36 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Gliocladium*, que muestran las filoides digitiformes que sostienen grupos compactos de conidios esféricos.

adhesión de estos “**ovillos**” de conidios es secundaria a la producción simultánea de una **sustancia mucinosa** que los mantiene unidos. Los “ovillos” de conidios también son similares a los producidos por las especies de *Gliocladium*; sin embargo, en las especies de *Trichoderma* estos racimos están ubicados en las **puntas de filoides adelgazadas** (similares a los de las especies de *Paecilomyces*) que se originan lateralmente de las hifas.

Identificación de los géneros de hialohifomicetos productores de conidios aislados

Especies de importancia en el laboratorio

Especies de *Scedosporium*
Especies de *Chrysosporium*
Especies de *Sepedonium*
Especies de *Beauveria*

La morfología de las colonias de este grupo de hongos filamentosos hialinos no es característica, salvo por el color gris de las colonias maduras de *Scedosporium apiospermum*, semejan-

te al del ratón doméstico. Las colonias de las otras especies tienen bordes continuos, son blancas a grises, lisas a ligeramente granulares y a menudo rugosas. Para realizar la diferenciación del género se requiere el examen microscópico.

Vistos con el microscopio, este grupo de hongos hialinos se caracterizan por la formación de conidios individuales a partir de los extremos de conidióforos individuales, rectos o ramificados. A continuación se describen las características microscópicas particulares de cada una de estas especies, como se destaca en el diagrama 21-2.

ESPECIES DE *SCEDOSPORIUM*

Scedosporium apiospermum (**forma anamorfa**), también conocido como *Pseudallescheria boydii* (forma sexual o “**teleomorfa**”), es la especie de este grupo de hongos filamentosos hialinos que se encuentra con mayor frecuencia en la práctica clínica. *Scedosporium prolificans* (*inflatum*), una especie recientemente designada, también causa infecciones humanas. Ambos producen una superficie sedosa de la colonia, de un característico color gris como el del ratón doméstico, sobre la



Figura 21-37 Microfotografía y esquema de la estructura de fructificación de especies de *Trichoderma*, que muestran las filoides adelgazadas ubicadas lateralmente que sostienen grupos compactos de conidios esféricos.

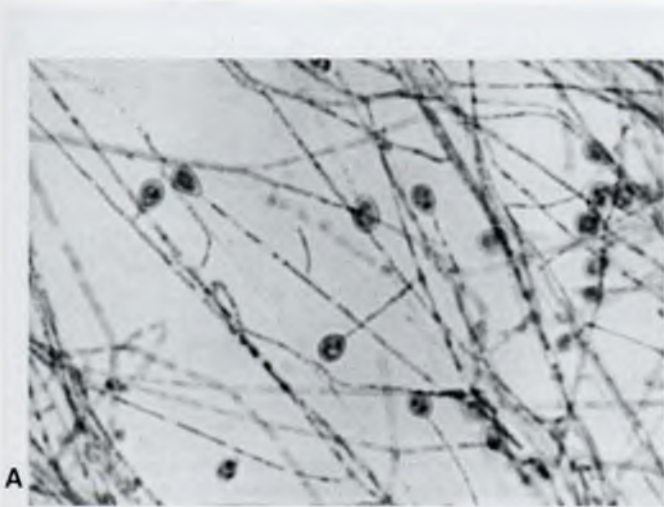
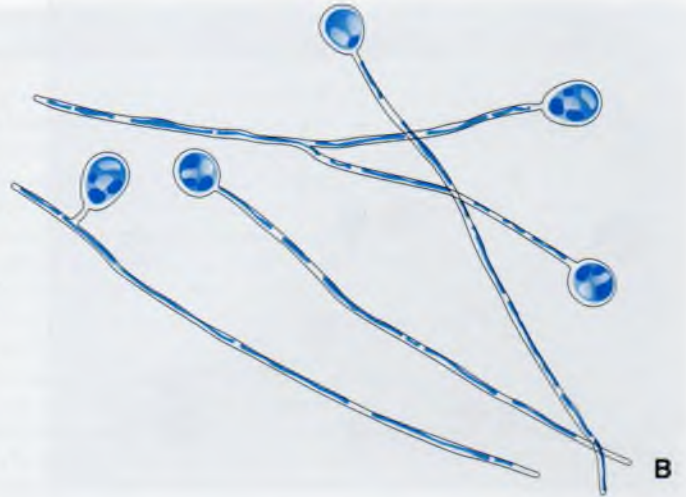


Figura 21-38 Microfotografía y esquema de los conidióforos largos, rectos, delicados, cada uno de los cuales sostiene un solo conidio ovalado, con tinción oscura, característicos de *Scedosporium apiospermum*.



cual tienden a agregarse gotas diminutas de agua (véase lámina en color 21-2G). El pigmento oscuro puede extenderse al reverso de la superficie, lo que sugiere un hongo dematiáceo.

En la microscopia, las hifas de ambas especies son hialinas y tabicadas. La característica es la producción de conidios de pared lisa y delgada, ovoides, de 3-5 μm de diámetro a partir de los extremos de conidióforos no ramificados, espaciados de modo irregular (similares a “chupachús”) (fig. 21-38). Los conidióforos de *S. apiospermum* son rectos y angostos, a diferencia de los de *S. prolificans*, en el cual la base está característicamente dilatada y da el aspecto de una urna (fig. 21-39). Los conidios maduros asumen una pigmentación oscura con el tiempo, por lo que producen el color gris de la colonia descrito antes. Las puntas de los conidióforos en realidad se extienden cuando se produce la espora, con la formación de anélicos que son difíciles de observar con el microscopio óptico, pero que se evidencian con facilidad en las microfotografías por barrido. En ciertas especies puede observarse el entrelazado paralelo de los conidióforos, el morfotipo *graphium* (fig. 21-

40). Los conidios aislados también pueden agregarse en racimos laxos.

ESPECIES DE *CHRYSOSPORIUM*

Las colonias de las especies de *Chrysosporium* no son distintivas. Después de 2 a 4 días de incubación se forma el micelio algodonoso o veloso, blanco o grisáceo. Con el microscopio se observan conidios subglobulosos o piriformes que nacen de modo individual a partir de las puntas de los conidióforos laterales largos (“chupachús”), que se asemejan mucho a los conidios de *Blastomyces dermatitidis* (fig. 21-41). Las bases de los conidios pueden parecer aplanadas y con cicatrices. Las colonias de las especies de *Chrysosporium* suelen crecer con más rapidez que las de *B. dermatitidis*, no crecen en medios de cultivo selectivos con cicloheximida y no pueden convertirse a una forma de levadura tras la incubación a 35-37 °C. En la

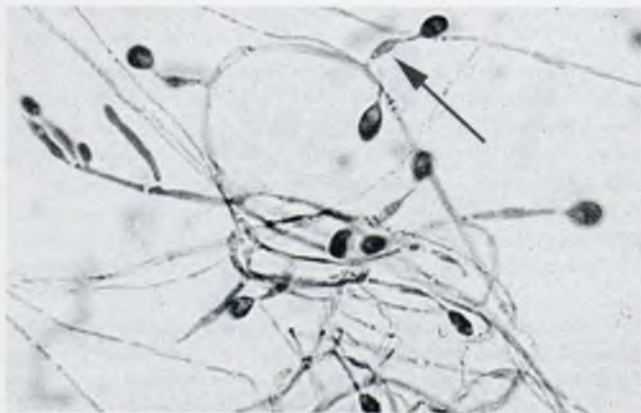


Figura 21-39 Microfotografía de conidios de *Scedosporium prolificans*, que muestra la característica dilatación de la base del conidióforo con forma de urna (véase la flecha).

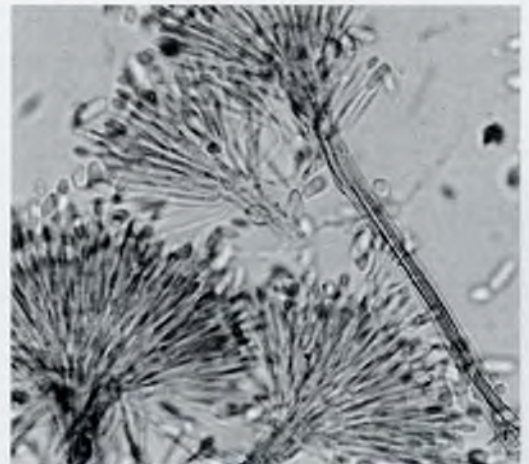


Figura 21-40 Microfotografía de especies de *Scedosporium*, que muestra la forma *graphium* en la que la cabeza de fructificación se dispone en haces como abanicos que simulan las espigas del trigo.

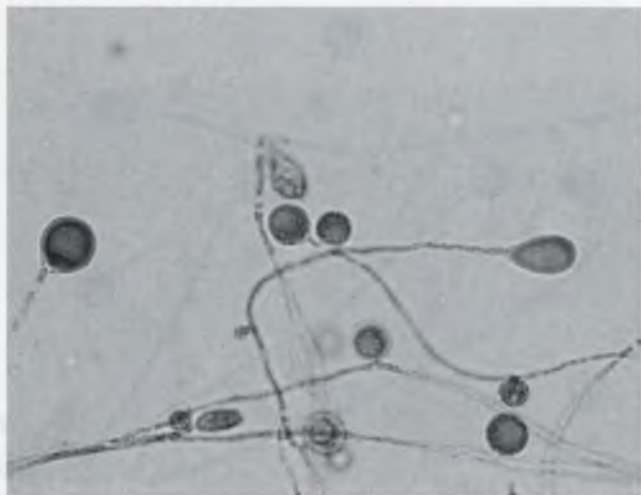


Figura 21-41 Microfotografía de especies de *Chrysosporium*, que ilustra los conidios esféricos u ovales, cada uno sostenido por un conidióforo corto y recto (“chupachús”).

práctica, pueden realizarse ensayos de exoantígeno o con sondas de ácidos nucleicos sobre los extractos de la colonia para establecer una identificación rápida y descartar blastomicosis.

ESPECIES DE *SEPEDONIUM*

Las colonias de las especies de *Sepedonium* son similares a las de las especies de *Chrysosporium* y no pueden distinguirse a simple vista. En la microscopía, es característica la observación de macroconidios grandes, esféricos, claramente espiculados, que simulan a los de *Histoplasma capsulatum* (fig. 21-42). Las colonias de las especies de *Sepedonium* crecen con más rapidez que las de *H. capsulatum*, se inhiben en medios selectivos que contienen cicloheximida y no puede convertirse a una forma de levadura con la incubación a 35-37 °C. En algunas cepas también pueden observarse conidios más pequeños, ovoides, que nacen individualmente de conidióforos cortos. En los casos de sospecha de histoplasmosis, pueden realizarse pruebas con sondas de ácidos nucleicos o ensayos de exoantígeno sobre extractos miceliales de colonias jóvenes para establecer una identificación rápida.

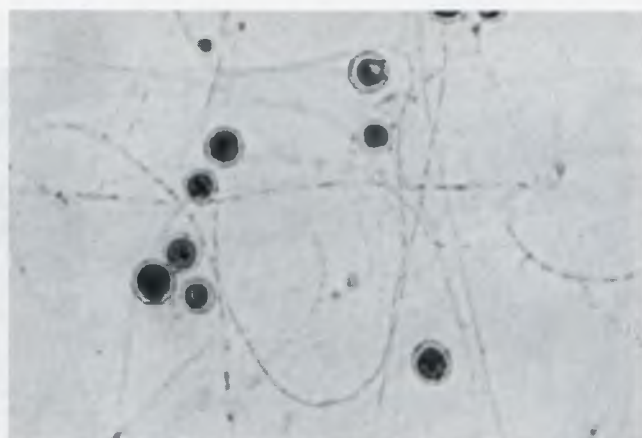


Figura 21-42 Microfotografía que ilustra los conidios grandes, esféricos, finamente espiculados de especies de *Sepedonium*.

ESPECIES DE *BEAVERIA*

Las colonias tienen una superficie blanca, algodonosa o vellosa. El reverso de la colonia es *beige* claro. La microscopía revela microconidios diminutos y globulosos que se agregan densamente alrededor de conidióforos ramificados, cortos y delicados que se incurvan de una manera singular con desvíos en zigzag (aspecto **geniculado** o en forma de rodillas) (fig. 21-43). Cada conidio se origina en un plano, después del cual el conidióforo gira antes de que se presente otro conidio en otro plano y así sucesivamente. Este tipo de conidiación se denomina **simpodial**.

En el recuadro de correlación clínica 21-3 se presentan diversas manifestaciones clínicas de las infecciones oportunistas por hongos filamentosos hialinos.

Identificación de los dermatófitos

Los dermatófitos son un grupo separado de hongos que infectan la piel, el pelo y las uñas de los seres humanos y los animales, y causan diversas infecciones cutáneas, familiarmente conocidas como “tiñas”. Cualquier hongo filamentoso aislado en cultivo de muestras de piel, uñas o pelos debe ser eva-

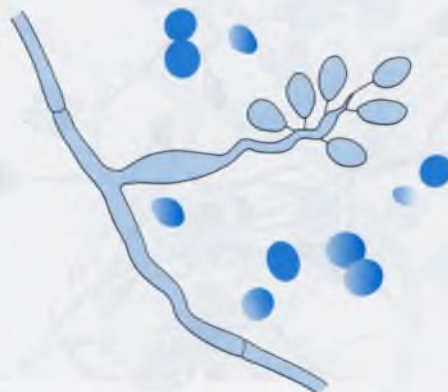
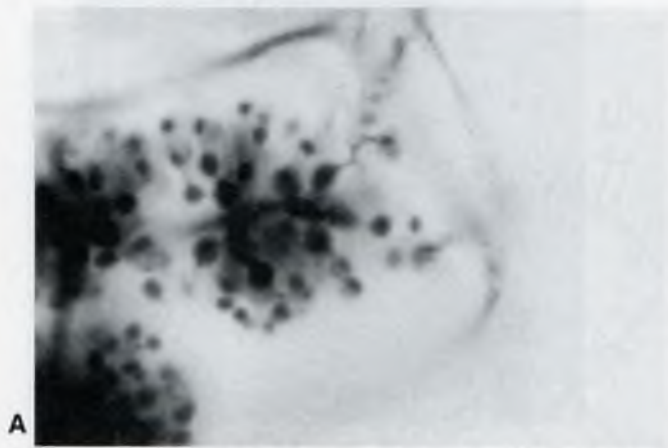


Figura 21-43 Microfotografía y esquema que ilustran los delicados conidióforos en zigzag de especies de *Beauveria*, cada uno de los cuales sostiene un solo conidio ovalado.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-3 Hialohifomicosis

Los micetomas, las onicomicosis¹⁰⁰ y las queratitis¹⁵³ micóticas suelen ser las infecciones más comunes causadas por este grupo de hongos filamentosos. Informes de otras infecciones, como sinusitis (incluso la formación de bola micótica), meningitis, osteomielitis, endocarditis y otomicosis son infrecuentes en la literatura médica. Rippon realizó un resumen de varios de los primeros informes.²³⁴

Quizás la notoriedad más reciente ha sido la emergencia de *Penicillium marneffei* como patógeno humano importante. Blum²⁴ revisó 155 casos informados y concluyó que *P. marneffei* es la tercera infección oportunista más común en los pacientes infectados por el HIV en ciertas partes del sudeste asiático, donde la infección es endémica. *P. marneffei* puede causar dos tipos de enfermedad: focal y una forma progresiva y diseminada mortal que simula por la clínica a la histoplasmosis.¹⁹⁷ La propensión de este hongo para invadir y diseminarse se basa en su propiedad "dimorfa" exclusiva de convertirse en una entidad levaduriforme cuando se encuentra en el tejido enfermo o se lo cultiva a 37 °C.⁵⁰ En un informe de cinco casos, Kurup y cols.¹⁵² encontraron que la fiebre, la pérdida de peso, la anemia y las lesiones cutáneas papulares eran las manifestaciones clínicas más frecuentes. La capacidad de aislar el microorganismo en cultivos de sangre fue un rasgo exclusivo adicional en los pacientes de esta serie.

La clave para establecer el diagnóstico de peniciliosis marneffei es el reconocimiento de cuerpos intracelulares pequeños que se asemejan a las formas de levadura de *Histoplasma capsulatum* en los cortes histológicos obtenidos de las lesiones focales típicas. Kaufman y cols., en los Centers for Disease Control and Prevention,¹³⁶ elaboraron anticuerpos monoclonales contra antígenos obtenidos por filtrado del cultivo levaduriforme de *P. marneffei*, después de la absorción con la forma de levadura de *H. capsulatum*, lo que produjo un reactivo sensible para la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Así, los autores pudieron detectar la forma levaduriforme de *P. marneffei* en 43 aislamientos y en los cortes de tejidos de seis seres humanos con peniciliosis marneffei. No se encontró ningún resultado falso positivo en el estudio de cortes de tejido que contenían levaduras de *H. capsulatum*. Cooper y McGinnis,⁵⁰ en una revisión global, mostraron la presentación clínica, el diagnóstico diferencial, la micología, la histopatología, la serología diagnóstica, las pruebas de sensibilidad in vitro (antifungigrama) y el tratamiento de las infecciones por *P. marneffei* en pacientes con SIDA.

Las especies de *Penicillium* distintas de *P. marneffei* sólo raras veces causan infecciones humanas oportunistas. Chan y cols.³⁹ informaron dos casos de peritonitis relacionada con diálisis peritoneal causados por *Paecilomyces variotii*. Cada uno de estos pacientes había recibido múltiples antibióticos como tratamiento para la peritonitis bacteriana, lo que tal vez contribuyó a la aparición de la infección oportunista por *Paecilomyces*.

Las infecciones relacionadas con especies de *Paecilomyces* también han sido informadas por Chan-Tack y cols.⁴⁰ (fungemia en un receptor adulto de trasplante de médula ósea), Gucalp y cols.⁹⁸ (sinusitis resistente a la anfotericina B en un adulto inmunodeprimido), Okhravi y cols.²⁰¹ (endoftalmitis secundaria a una queratoplastia penetrante) y Westenfeld y cols.²⁸⁶ (un caso de infección subcutánea con bursitis prerrotuliana). Castro y cols.³⁷ informaron un caso de infección subcutánea profunda del antebrazo izquierdo por *Paecilomyces lilacinus* en un receptor de trasplante renal que respondió al tratamiento oral con griseofulvina. Estos autores revisaron 42 casos de micosis humana debida a especies de *Paecilomyces*, por lo general junto con injertos protésicos o inmunosupresión. Casi todas las cepas de *P. lilacinus* son resistentes a la anfotericina B; la mayoría de las cepas *P. variotii* presentan sensibilidad.

Se informó que las especies de *Scopulariopsis* causan infecciones de uñas, tejido subcutáneo y pulmones.²⁷⁴ Phillips y cols.²²² informaron varios casos humanos de micosis por *S. brevicaulis* que afectan la uña del pie en receptores de alotrasplantes de médula ósea. Otras infecciones citadas fueron neumonitis por hipersensibilidad, formación de bola micótica en el pulmón e infecciones subcutáneas profundas en huéspedes inmunodeprimidos. Las infecciones por otras especies de *Scopulariopsis* incluyen casos aislados de sinusitis micótica invasora informados por Ellison y cols.⁷³ y por Jabor y cols.¹²⁸ en este último caso la invasión produjo la destrucción nasal en un huésped no inmunodeprimido; un caso mortal de endocarditis relacionada con valvuloplastia por *S. brevicaulis* informado por Migrino y cols.¹⁸¹; y un caso de infección subcutánea recurrente en un paciente de 6 años después del trasplante hepático, informado por Sellier y cols.²⁵⁰

Schell y Perfect²⁴⁶ publicaron un caso de infección diseminada por *Acremonium strictum* en un paciente con neutropenia. En este caso, el aislamiento del microorganismo en los cultivos de sangre tras la recuperación anterior de muestras de heces indica al tubo digestivo como la fuente primaria de infección. Vajpayee y cols.²⁷⁷ determinaron que las especies de *Fusarium* eran la causa más común de queratitis micótica en 156 pacientes con úlcera de córnea micótica, con más frecuencia como complicación de conjuntivitis alérgica y una combinación de antibiotocoterapia y corticoterapia. Una revisión global de la taxonomía, la micología, las características de laboratorio y los síndromes clínicos relacionados con las especies de *Fusarium* también fue publicada por Nielsen y cols.¹⁹⁴ Estos autores citan las especies de *Fusarium* como la causa más común de queratitis micótica en los Estados Unidos, por lo general tras el traumatismo de córnea secundario a la implantación ocular de fragmentos vegetales o materia del suelo durante las actividades al aire libre. La queratitis micótica se ha informado en 4-27% de usuarios de lentes de contacto, en los que las especies de *Fusarium* son las que se aíslan con mayor frecuencia.²⁹⁴ Low y cols.¹⁶⁶ informaron un caso de queratitis relacionado con *Beauveria* que se curó con la disección profunda. Las causas predisponentes incluyen el cuidado inadecuado de las lentes, la presencia de una infección de córnea subyacente como infección por herpes simple y el uso prolongado de medicación local con corticosteroides y antibióticos.

En un estudio retrospectivo de 10 años (1986-1995) de pacientes con procesos malignos hemáticos, Boutati y Anaissie²⁹ encontraron infección diseminada por especies de *Fusarium* en 43 pacientes, 40 con enfermedad diseminada y 3 con infección pulmonar invasora. Aunque la farmacoterapia resultó eficaz en 13 de estos pacientes, en uno la recuperación de la infección sólo ocurrió con la reversión de la mielosupresión y la neutropenia. Krcmery y cols.¹⁵⁰ informaron el aislamiento de especies de *Fusarium* en el torrente circulatorio de pacientes con diversos procesos malignos.

Las infecciones cutáneas pueden ser secundarias a la penetración directa de la piel por vegetales contaminados. El autor actuó como consultor de un caso no comunicado de micetoma postraumático por *Fusarium* en una mujer de 35 años. Inicialmente, se había recuperado de una biopsia superficial de la lesión una especie de *Alternaria*, sensible a la anfotericina B en los estudios in vitro. Como la paciente no mejoró con el tratamiento con anfotericina B, se realizó una biopsia más profunda de la que se aisló una cepa de especie de *Fusarium* resistente a la anfotericina. La enfermedad remitió con la administración de itraconazol.

Scedosporium apiospermum es una de las causas más comunes de micetomas subcutáneos en los Estados Unidos. Las infecciones pulmonares por este microorganismo suelen ser similares a las infecciones por especies de *Aspergillus* y las hifas tienen un aspecto semejante en los cortes teñidos de tejido. La presencia de granos esféricos, blandos a firmes, blancos a amarillos indica la infección por una especie de *Scedosporium*. Rippon²³⁴ realizó una revisión amplia de otras infecciones causadas por *Scedosporium*, como sinusitis, incluso las infecciones por granulomas micóticos, meningitis, osteomielitis, endocarditis, queratitis micótica, endoftalmitis y otomicosis. Pérez y cols.²¹⁴ informaron un caso de absceso cerebral por *Pseudallescheria boydii* asociado con un catéter venoso central infectado.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-3 Hialohifomicosis (cont.)

Tamm y cols.²⁷¹ informaron infecciones por *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) en siete receptores de trasplantes pulmonares en quienes se manifestaron infecciones pulmonares. En todos los pacientes se confirmó la presencia de *Scedosporium apiospermum* en las muestras de lavado broncoalveolar. Todos los pacientes manifestaron problemas de las vías aéreas, como estenosis isquémica temprana de la vía aérea en uno y síndrome de bronquiolititis obliterante en los otros seis. El tratamiento combinado con itraconazol y fluconazol no erradicó a *Scedosporium*. Cuatro de los siete pacientes fallecieron por la bronquiolititis obliterante avanzada 3-35 meses después del diagnóstico de infección pulmonar por *Scedosporium*.

Salkin y cols.²⁴⁰ citan a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) como patógeno emergente e informaron 15 casos de infección en seres humanos. Wilson y cols.²⁹⁸ agregaron otros 11 casos de infección por el mismo hongo, casi siempre en pacientes que habían sufrido traumatismo penetrante o cirugía. Las especies de *Scedosporium*, en particular *S. prolificans*, resultan resistentes a la anfotericina B, el miconazol, el ketoconazol y otros antimicóticos, una razón importante para diferenciarlos de las especies de *Aspergillus*. Sin embargo, Pickles y cols.²²³ comunicaron el tratamiento exitoso con curaciones mediante el empleo de fluconazol.

Alvarez y cols.¹⁰ informaron un brote intrahospitalario de cuatro casos mortales por *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) en pacientes con neutropenia intensa secundaria a la quimioterapia contra la leucemia. Las infecciones sucedieron de modo secuencial dentro de un período de un mes en dos habitaciones durante una fase de reconstrucción del hospital cuando los pacientes se alojaban en una unidad provisoria de hematología. Los autores concluyeron que, a pesar de la incapacidad para aislar *S. proliferans* en las habitaciones de los pacientes o en los corredores adyacentes, la evidencia circunstancial indicó un brote intrahospitalario. Los antifungigramas realizados de los aislamientos revelaron resistencia a anfotericina B, ketoconazol y miconazol, lo que confirma el perfil de resistencia observado por otros autores.

Simarro y cols.²⁵⁷ comunicaron dos casos relacionados similares. Ambos pacientes se internaron en la guardia hematológica en salas cercanas durante el trabajo de construcción en el hospital. Tras una sepsis bacteriana previa en la fase neutropénica, que mejoró con el tratamiento antibiótico, el estado respiratorio de los pacientes se deterioró y presentaron disnea aguda, con infiltrado pulmonar en uno de ellos. Después de algunas horas ambos pacientes fallecieron. Los cultivos de sangre resultaron positivos para *S. prolificans*.

De Battle y cols.⁵⁹ describieron un caso de infección diseminada por *S. prolificans* en un paciente con leucemia durante el período de neutropenia inducido por la quimioterapia. El hongo se aisló en los cultivos de cuatro muestras de sangre. En la necropsia, se halló infección micótica generalizada, con trombosis intravascular múltiple micótica en pulmones, hígado, bazo y otros órganos. Los autores insisten en que se realicen todos los intentos posibles para proteger a los pacientes con leucemia de la invasión de hongos saprófitos durante los períodos de neutropenia inducida por el tratamiento.

Un cuadro reconocido en los últimos tiempos que implica a los hongos filamentosos hialinos se ha designado "síndrome del edificio enfermo".¹⁷¹ Se les está solicitando a los médicos que evalúen en los pacientes las enfermedades relacionadas con el medioambiente, que suelen manifestarse como estomatitis, rinitis, conjuntivitis, pancitopenia y trastornos neurológicos, tanto aisladas como combinadas. También se informó la muerte de caballos y de otros animales. *Stachybotrys chartarum* se ha implicado como un hongo filamentosos hialino asociado con este síndrome. Este hongo es importante porque produce micotoxinas (tricotecenos), que son biológicamente activas y pueden causar la diversidad de cuadros patológicos citados tanto en los seres humanos como en los animales. Pueden aislarse en cereales contaminados, tabaco, espuma aislante y paredes de edificios dañadas por el agua con gran humedad.

Pieckova y Jesenska²²⁴ publicaron una revisión de la incidencia cuantitativa y cualitativa de hongos filamentosos en las moradas, los problemas de salud de los ocupantes de estas "casas húmedas" y los enfoques para la detección y el aislamiento de estos hongos como agentes etiológicos. Perfect y Schell²¹⁵ abordaron varios problemas relacionados con la patogenia, la epidemiología, el diagnóstico y el tratamiento de la exposición frecuente y prolongada de pacientes inmunodeprimidos a estos hongos filamentosos en diversas condiciones medioambientales.

luado para determinar la presencia de un dermatófito. Sin embargo, es necesario estar alerta, ya que otros hongos patógenos, incluso los hongos filamentosos dimorfos, también pueden afectar la piel y tener características microscópicas similares a los dermatófitos. Además, pueden aislarse muchos hongos filamentosos medioambientales saprófitos, sobre todo en las uñas. Los errores diagnósticos podrían tener consecuencias importantes. La observación de segmentos típicos de hifas en las preparaciones en fresco directas de las escamas de piel tratadas con KOH (fig. 21-44) o la invasión ectotrix o endotrix de pelos infectados son hallazgos preliminares útiles (fig. 21-45). Como las colonias de las diversas cepas de dermatófitos varían considerablemente en la velocidad de crecimiento, la morfología y la producción de pigmento, incluso dentro de las mismas especies, las designaciones del género y de la especie dependen de la observación de las características microscópicas. Sin embargo, algunas características de las colonias, cuando están presentes, pueden ser útiles para identificar una especie dada. Las colonias representativas de los dermatófitos se ilustran en la lámina en color 21-4. Las especies de importancia médica que se aíslan con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos son:

Microsporum canis
Microsporum gypseum
Trichophyton mentagrophytes
Trichophyton rubrum
Trichophyton tonsurans
Trichophyton verrucosum
Epidermophyton floccosum

En un estudio de infecciones por dermatófitos realizado en los Estados Unidos entre 1993 y 1995 por Weitzman,²⁸⁵ *Trichophyton tonsurans* fue la especie de dermatófito aislado con mayor frecuencia (44,5% de casos) seguido de *Trichophyton rubrum* (41,3%) y, en menor proporción, por *Trichophyton mentagrophytes* (8,5%), *Microsporum canis* (3,5%) y *Epidermophyton floccosum* (1,1%).

Los dermatófitos se dividen en tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, sobre la base de las diferencias en la morfología microscópica y los modos de esporulación. Un enfoque para la identificación de géneros y especies de dermatófitos se presenta en el diagrama 21-3.

El género *Microsporum* se caracteriza por la producción de muchos macroconidios y escasos o ningún microconidio. Los

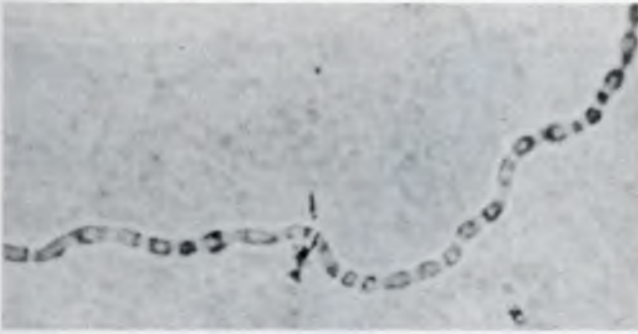


Figura 21-44 Microfotografía de una preparación en fresco con KOH de raspado de piel que ilustra un segmento de la hifa de uno de los hongos dermatófitos. Nótese que el fragmento de la hifa está rompiéndose en artroconidios diminutos (objetivo de inmersión).

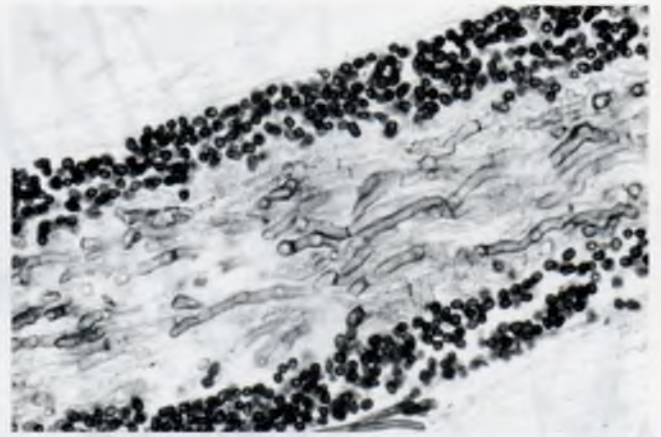


Figura 21-45 Microfotografía tomada a través de un corte longitudinal del tallo del pelo en un caso de dermatofitosis. Nótese la invasión del endotrix con hifas tabicadas en el centro y conidios en la periferia. (Objetivo de inmersión, tinción de metenamina argéntica de Gomori, 400×).

macroconidios son multicelulares, de pared gruesa, equinulada o verrucosa. La identificación de especie se basa en las diferencias de la morfología de los macroconidios. Los microconidios son pequeños, hialinos y con forma de lágrima o elípticos y adheridos directamente a los lados de las hifas.

El género *Trichophyton* se caracteriza por la producción de muchos microconidios y alguno o ningún macroconidio. Los macroconidios, cuando se forman, al contrario de los de las especies de *Microsporum*, son de paredes delgadas y lisas. El tamaño y la disposición de los microconidios son importantes para la identificación de la especie. La producción de pigmento, la actividad de la ureasa, el modo de afección al pelo y los patrones de crecimiento diferencial en los medios de cultivo con tiamina y niacina, y sin estos componentes (agares diferenciales para *Trichophyton*) también son útiles para la identificación de la especie.

El género *Epidermophyton* se caracteriza por la producción de macroconidios constituidos por dos a cuatro células, con forma de clava y paredes lisas que nacen, ya sea de modo aislado de las hifas, o más característicamente, en grupos de dos

o tres. De fundamental importancia en la identificación de *Epidermophyton* es la ausencia de microconidios.

Identificación de especies de *Microsporum*

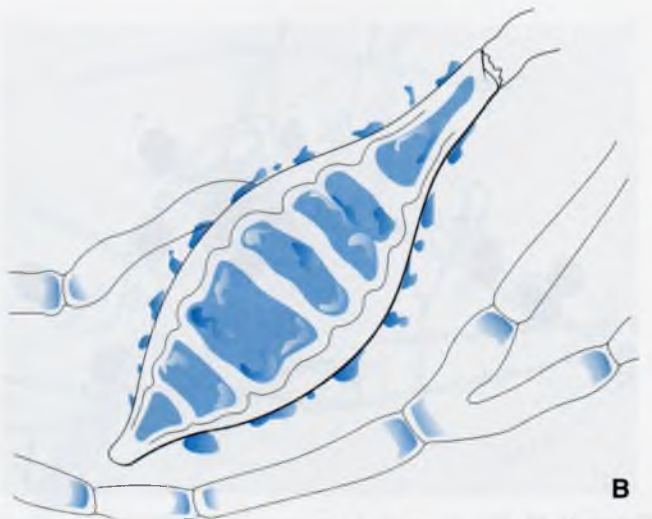
MICROSPORUM CANIS

El crecimiento es rápido, en 3 a 5 días. Al comienzo las colonias son blancas y sedosas; más tarde desarrollan una pigmentación amarilla limón en la periferia (lámina en color 21-4A). El reverso de la colonia se torna amarillo castaño cuando la colonia madura.

Microscópicamente, pueden observarse macroconidios y microconidios, con predominio de los primeros. La producción de macroconidios multicelulares, fusiformes, puntiagudos y con el extremo algo doblado sobre un lado, es característica de *Microsporum canis* (fig. 21-46). Los microconidios pueden estar esparcidos y nacer directamente del lado de las hifas. En las infecciones del pelo, se disponen en grupos, con forma de mosaico por fuera del tallo (*ectotrix*).



Figura 21-46 Microfotografía y esquema de un macroconidio multicelular de *Microsporum canis*, que muestran el aspecto fusiforme, con pared equinulada gruesa, tabiques transversales y extremos afinados.



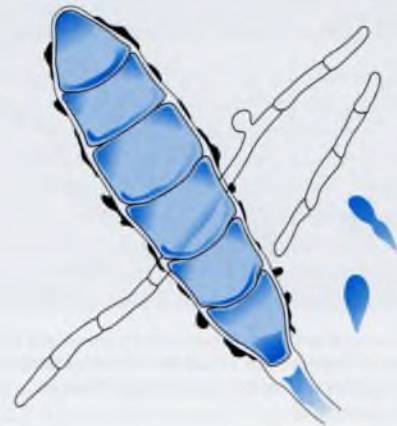
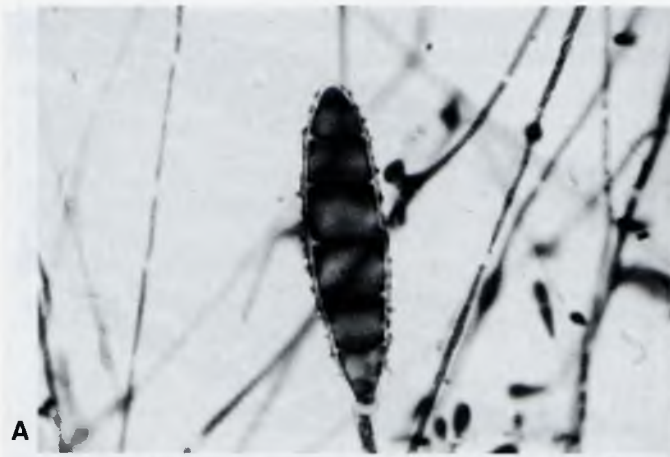


Figura 21-47 Microfotografía y esquema de un macroconidio multicelular de *Microsporium gypseum*, que revelan la pared gruesa, equinulada, los tabiques transversales y una célula terminal redondeada.

MICROSPORIUM GYPSEUM

El crecimiento es rápido, en 3 a 5 días. Las colonias son planas, al comienzo blancas pero toman un color *beige* a castaño o rojizo ocre a medida que maduran (lámina en color 21-4B). La superficie se torna azucarada o granular cuando se producen los conidios.

Los macroconidios de *M. gypseum* suelen ser más numerosos que los de *M. canis*, pero la forma de barril es menos notoria y presentan las puntas redondeadas (fig. 21-47). Estos rasgos no siempre son bien definidos y otros criterios, como el sitio y la naturaleza de la infección, el antecedente de exposición a los animales y la morfología de la colonia, pueden ser útiles para la identificación diferencial.

MICROSPORIUM NANUM

Los macroconidios de *Microsporium nanum* pueden parecerse a los de *Epidermophyton floccosum*. Las colonias de *M. nanum* crecen con rapidez en 3 a 5 días; al comienzo son blan-

cas, con la superficie algodonosa y más tarde de color *beige* que se tornan rojo parduscas en el reverso. Con la madurez pueden aparecer penachos en la superficie.

La microscopía revela la presencia característica de macroconidios de tres células, ovalados con forma de clavos. Las paredes celulares son finamente verrucosas (fig. 21-48), a diferencia de los conidios de *E. floccosum* que tienen paredes lisas. De los lados de las hifas se originan microconidios pequeños de 3-5 μm , cilíndricos con forma de clavos, una observación adicional importante para la diferenciación entre *M. nanum* y *E. floccosum*. Sólo se han informado casos ocasionales de infecciones humanas por *M. nanum*, sobre todo en los criadores de cerdos.²³⁵

Identificación de especies de *Trichophyton*

TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES

El crecimiento es relativamente rápido y llegan a la maduración en 3 a 5 días. Pueden observarse dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. Las variantes algodonosas son inicialmente blancas, pero pueden tornarse de color crema a ocre con la madurez. A menudo se desarrollan hifas estériles que forman telarañas con una zona central umbilicada. La periferia y el reverso de la colonia pueden ser rosados a ocre (lámina en color 21-4D). Las variantes granulares producen colonias planas que se diseminan con una superficie granular gruesa. Al comienzo las colonias son blancas o amarillo intensas, pero después se tornan de color ocre a castaño. También puede haber un pigmento rojo similar al observado en *T. rubrum*; sin embargo, la pigmentación nunca es tan intensa en *T. mentagrophytes*, en especial cuando las colonias se desarrollan en paralelo en agar harina de maíz o agar patata dextrosa (lámina en color 21-4F).

Los microconidios tienden a formar grupos laxos, similares a racimos de uvas (fig. 21-49). Es característica la ausencia de macroconidios o se presentan en escaso número; éstos son más comunes en cultivos granulares y son largos, multicelulares, con forma de lápiz, y paredes delgadas y lisas. A menudo se observan hifas espiraladas y clamidosporas en las hifas vegetativas. La mayoría de las cepas presentan gran actividad de ureasa y en las infecciones de los pelos las hifas invaden los tallos (*endotrix*). El crecimiento es igual en los agares diferenciales para *Trichophyton*.



Figura 21-48 Microfotografía de los macroconidios de *Microsporium nanum*, los cuales difieren de los de *E. floccosum* porque están formados por dos células, con pared gruesa y equinulada.

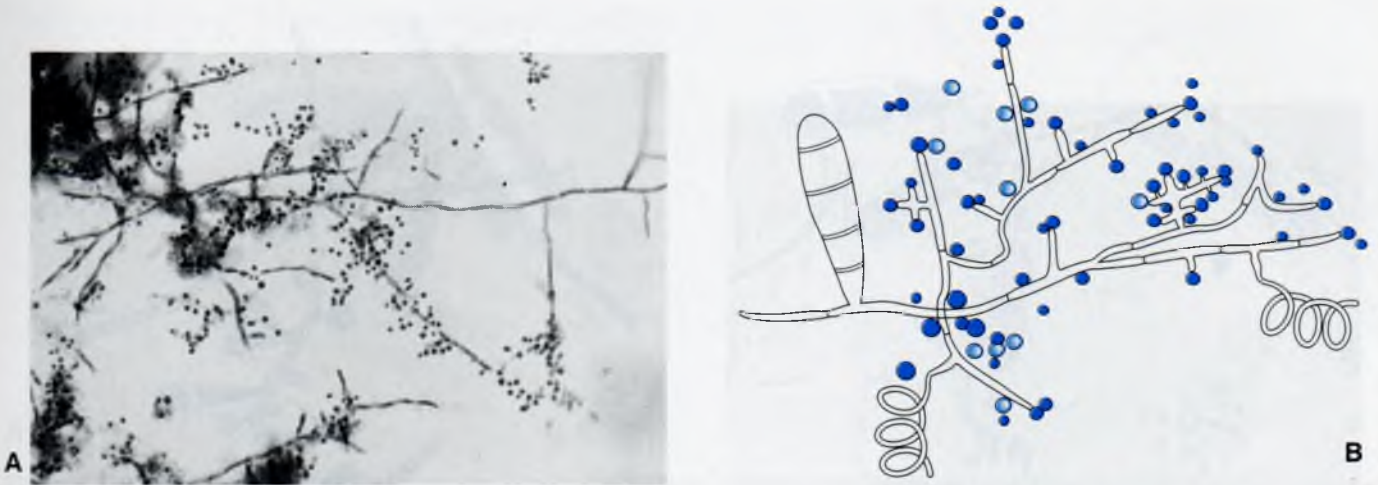


Figura 21-49 Microfotografía y esquema de las formas microscópicas de *Trichophyton mentagrophytes*, que muestran conidios diminutos, esféricos dispuestos en grupos (“racimos”) laxos.

TRICHOPHYTON RUBRUM

El crecimiento en el agar dextrosa de Sabouraud es relativamente lento y requiere 4 a 7 días hasta la madurez. Al comienzo, la superficie de la colonia es blanca y la consistencia puede ser algodonosa, aterciopelada o granular, lo cual depende de la cepa, el medio de cultivo que se emplea y la magnitud de la esporulación. Como indica el nombre de la especie, una observación importante es la producción de un pigmento hidrosoluble, de color rojo vino en el reverso de la colonia que se difunde al agar (lámina en color 21-4E y F). La producción de pigmento es más intensa en las colonias que crecen en agar harina de maíz o agar patata dextrosa que en el agar dextrosa de Sabouraud.

Vistos con el microscopio, los microconidios de *T. rubrum* tienden a presentar formas de lágrimas y suelen distribuirse a cada lado de las hebras de las hifas, lo que origina un aspecto de “pájaros en un cerco”, en lugar de la agrupación laxa observada con *M. mentagrophytes* (fig. 21-50). Raras veces se obser-

van macroconidios multicelulares; cuando están presentes son largos y con forma de lápiz, con paredes lisas, delgadas, similares a los generados por *T. mentagrophytes*. No producen ureasa, el tallo del pelo no está invadido en la prueba de la perforación del pelo in vitro y el crecimiento es igual en los agares diferenciales para *Trichophyton*.

TRICHOPHYTON TONSURANS

De crecimiento lento, requieren de 7 a 10 días para alcanzar la madurez. Las colonias presentan una superficie granular característica, de color *beige*, con la formación de pliegues radiales profundos cuando están maduras (lámina en color 21-4G). Casi nunca se observan macroconidios en los aislamientos de laboratorio.

La observación microscópica revela microconidios distintivos. Presentan variaciones considerables en el tamaño y son alargados, en forma de maza, o grandes con forma de globos y

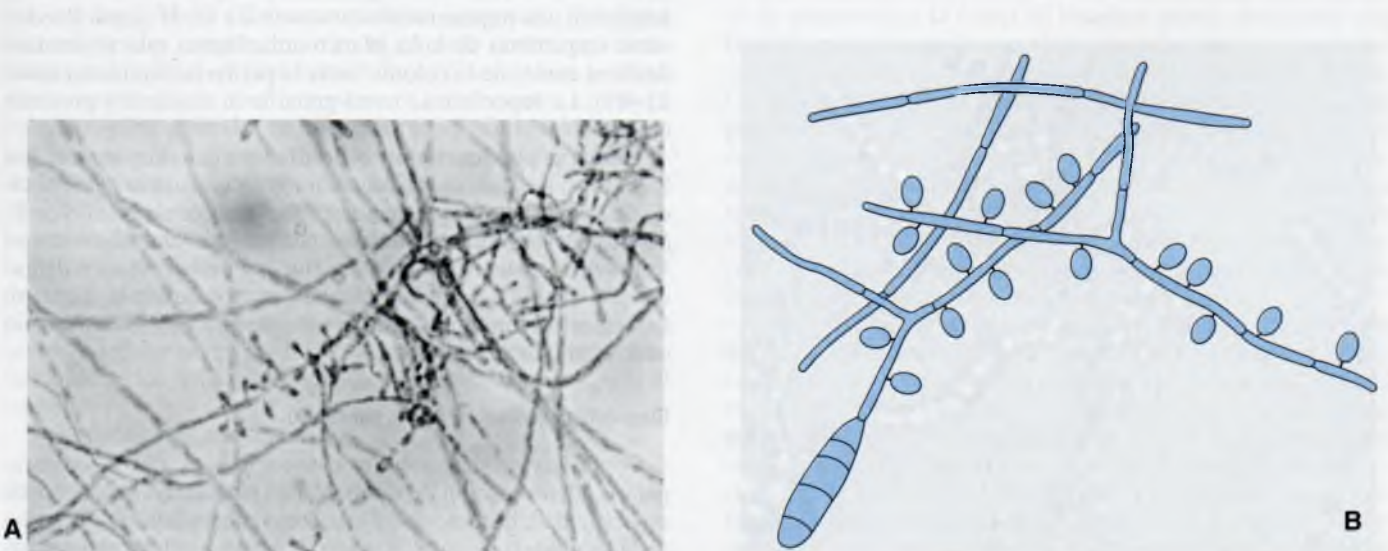


Figura 21-50 Microfotografía y esquema de las formas microscópicas de *Trichophyton rubrum*, que muestran la producción de conidios diminutos desde los lados de las hifas en una disposición como “pájaros en un cerco”.

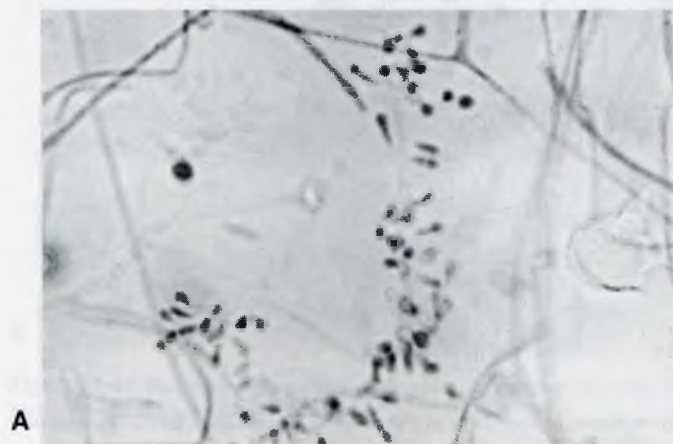


Figura 21-51 Microfotografía y esquema de conidios con formas de maza y esféricos de *Trichophyton tonsurans* que nacen lateralmente de hifas delicadas y hialinas.



pueden mezclarse con microconidios ovalados más pequeños o con forma de lágrima (fig. 21-51). La identificación puede confirmarse por el crecimiento deficiente en agar *Trichophyton* 1 (deficiente en tiamina, lo cual es un requisito de crecimiento absoluto para *T. tonsurans*) y buen crecimiento en agar *Trichophyton* 4 (con alto contenido en tiamina).

TRICHOPHYTON VERRUCOSUM

El crecimiento es lento, requiere de 7 a 14 días para alcanzar la madurez. Presenta escaso desarrollo en agar *Trichophyton* 1, que es deficiente en tiamina e inositol. Se observará crecimiento en agares *Trichophyton* 2, 3 y 4, todos los cuales contienen cualquier tiamina, inositol o ambos. Las colonias son peque-



Figura 21-52 Microfotografía del aspecto microscópico de cadenas de clamidosporas, característico de *Trichophyton verrucosum*.

ñas, redondas, aplanadas, sin vello al comienzo o vellosas después, y blancas a amarillo intenso. El reverso de la colonia sigue sin mostrar pigmento.

Observada con el microscopio, la esporulación suele ser escasa. Pueden verse hifas tipo astas y también es característica la producción de numerosas clamidosporas dispuestas en cadenas (fig. 21-52). Los macroconidios son raros, pero cuando se presentan son distintivos; son multicelulares, con paredes finas, lisas y delgadas con una configuración en paleta, “palillo” o “cola de rata”. Los microconidios, cuando están presentes, son pequeños, piriformes y nacen directamente de los lados de las hifas.

EPIDERMOPHYTON FLOCCOSUM

Las colonias crecen con rapidez, en el término de 3 a 5 días; en un comienzo son blanco grisáceas y luego, cuando maduran, adquieren una pigmentación característica verde caqui. Pueden verse serpentinantes de hifas blanco amarillentas que se irradian desde el centro de la colonia hacia la periferia (lámina en color 21-4H). La superficie se torna granular al madurar y producir conidios.

Nunca se producen microconidios, un dato importante. Por lo tanto, si se observan microconidios en un cultivo desconocido de un dermatófito, puede descartarse la consideración de *E. floccosum*. Los **macroconidios** suelen ser abundantes, con forma de maza, de tres a cinco células y paredes lisas y delgadas (fig. 21-53). A menudo forman grupos de a tres o cuatro. Los clamidioconidios están típicamente presentes, en especial en los cultivos más viejos.

Diagnóstico mediante técnicas sin cultivo

Como los procedimientos convencionales del laboratorio para la identificación de dermatófitos son lentos o carecen de especificidad, hacemos aquí una breve mención a la aplicación de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos que posibilitó la identificación rápida y precisa de los dermatófitos. Estudios recientes publicados por Liu y cols.¹⁶² mostraron que



Figura 21-53 Microfotografía y esquema de un racimo de macroconidios largos y cilíndricos de *Epidermophyton floccosum* con paredes lisas y tabiques transversales. No se observan microconidios.

cuando se utilizó uno de los cuatro cebadores aleatorios (OPAA11, OPD18, OPAA17 y OPU15) en la reacción en cadena de la polimerasa con cebado aleatorio (AP-PCR), podrían distinguirse hasta 20 de las 25 especies o subespecies de dermatófitos en investigación sobre la base de sus patrones de bandas característicos detectados por electroforesis en gel de agarosa. Aunque raras veces puede requerirse el uso de esta técnica, aquí se proporcionan las citas bibliográficas para aquellos casos en que se necesita una definición más precisa.

En el recuadro de correlación clínica 21-4 figuran las manifestaciones clínicas de las diversas infecciones por dermatófitos.

Hongos dimorfos

Un subconjunto de hongos filamentosos hialinos, los hongos dimorfos, suelen considerarse por separado porque presentan características singulares. En primer lugar, son dimorfos; es decir, existen en la forma filamentosa en el ambiente (incubación a temperatura ambiente), pero como levaduras cuando se los incuba a 35-37 °C (la temperatura corporal). El hábitat natural para los hongos dimorfos es el suelo donde, en condiciones ambientales, existen como hongos filamentosos y sufren esporulación. La forma filamentosa es la infectante. Los seres humanos y los animales se infectan a través de la inhalación o por la implantación traumática directa de material contaminado con conidios o elementos de las hifas. Cuando se incuban a 35-37 °C o acceden a la temperatura corporal de los tejidos humanos, los conidios se transforman en una forma de levadura (o forma de esférula para *Coccidioides immitis*). En segundo lugar, los hongos dimorfos son patógenos y causan "infecciones profundas" en los seres humanos. Como grupo, pueden ser muy virulentos en los huéspedes susceptibles, invadir profundamente los tejidos y los órganos, y diseminarse por todo el cuerpo.

Las especies de importancia médica son:

Blastomyces dermatitidis
Coccidioides immitis
Histoplasma capsulatum
Sporothrix schenckii
Paracoccidioides brasiliensis

Es característico el crecimiento lento de las colonias (10 a 30 días) cuando se aíslan en cultivo primario a partir de muestras clínicas. En los casos en que la concentración de esporas en la muestra clínica es alta, en especial en el esputo, el crecimiento puede observarse en el transcurso de 4 a 7 días. Raras veces se observa un crecimiento fino y delicado a las 24-72 horas en placas de agar sangre incubadas a 35 °C. A 30 °C, la temperatura usual de incubación del laboratorio, las colonias aparecen como filamentosas con un micelio delicado, sedoso, veloso o en telaraña. En algunos casos pueden aparecer áreas focales levaduriformes (lámina en color 21-5A). Las colonias típicas son blanco grisáceas o beige, aunque algunas cepas pueden mostrar un tinte amarillo pastel claro dentro de una pigmentación rosa. Los hongos dimorfos como grupo también crecen en medios de cultivo que contienen cicloheximida, una valiosa propiedad para diferenciarlos de los hongos filamentosos saprófitos, en especial en su forma ambiental similar, que presentan un desarrollo deficiente o nulo.

Si la temperatura de incubación aumenta, como en el proceso de conversión a la forma de levadura, puede observarse una fase de transformación espinosa antes de que aparezcan las colonias levaduriformes típicas (lámina en color 21-5C). Cuando se completa la conversión a levadura, las colonias son pastosas, lisas, de bordes continuos y tienen una pigmentación de blanca intensa a amarilla (lámina en color 21-5E). En la mayoría de los laboratorios rara vez se intenta la conversión a levadura de los cultivos filamentosos; en cambio, se realizan identificaciones rápidas poco después de que las colonias sospechosas aparecen en el cultivo, mediante sondas de ácidos nucleicos o ensayos del exoantígeno.

Puede sospecharse alguno de los hongos filamentosos dimorfos si en la microscopía se observan hifas hialinas delicadas, tabicadas, con paredes paralelas. Por lo general, las hifas se alinean en haces paralelos. Las identificaciones de especie suelen realizarse mediante el examen de las colonias aisladas en el cultivo, sobre la base del tamaño, la forma, la posición y el origen de los conidios. También es posible hacer una identificación basada en la morfología de la levadura, como se observa en los cortes teñidos de tejidos. Los criterios para la identificación de los hongos filamentosos dimorfos individuales se presentan en los párrafos siguientes.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-4 Dermatofitos

Las formas de infecciones por dermatofitos recibieron diversos nombres, como tiña del cuero cabelludo (*tinea capitis*), tiña del cuerpo (*tinea corporis*), tiña del pie (*tinea pedis*) y tiña inguinal (*tinea cruris*). Onicomycosis se refiere a las infecciones de las uñas. Con el advenimiento de la griseofulvina y los compuestos antimicóticos tópicos, la identificación por el laboratorio de los dermatofitos se requiere en la actualidad con menor frecuencia. En la mayoría de las prácticas clínicas, se realizan preparaciones en fresco con KOH de escamas de piel, raspados de uña o pelos en el consultorio del médico y se observan con el microscopio para la detección de hifas típicas que tienden a romperse en artroconidios. El tratamiento suele instituirse sin la realización de cultivos. Sin embargo, esto puede cambiar, ya que se han informado casos de infecciones subcutáneas locales pero invasoras por *T. rubrum* y otras especies de dermatofitos en casos ocasionales de infecciones diseminadas por tiña.²⁴⁹

El término "tiña" proviene de la Edad Media y se refiere a los agujeros redondos en vestidos causados por la polilla de la ropa, un aspecto similar a las lesiones anulares de la piel provocadas por los hongos dermatofitos. En la actualidad, el término se utiliza para describir los diversos síndromes clínicos causados por dermatofitos. Las tiñas también son comunes en perros, gatos, caballos, ganado bovino y otros animales, los que mantienen la fuente de infecciones zoonóticas humanas. El siguiente es un resumen de los diversos tipos clínicos de infecciones por tiñas.

Tiña del cuero cabelludo

Pueden observarse varios tipos de infección:

- 1) tiña con placas grises, una infección extótrix transmisible de los niños causada por *Microsporum audouinii* o *M. canis*
- 2) infección extótrix inflamatoria producida por *T. mentagrophytes*, de origen animal
- 3) tiña con puntos negros, una infección endótrix en la que los pelos infectados se rompen en la superficie de la piel y producen lo que se asemeja a un punto negro, causada por *T. tonsurans*
- 4) masa exofítica fungoide (kerión) producida por *T. tonsurans* o infecciones fúngicas causadas por *T. schoenleinii* (en Escandinavia y norte de Europa) y por *T. violaceum* (en las regiones del sur de Europa mediterránea)

Durante los últimos 50 años, *T. tonsurans* ha reemplazado a *T. audouinii* como el agente etiológico predominante de la tiña del cuero cabelludo en los Estados Unidos y Europa Occidental.^{70,101,297} Las infecciones por *T. tonsurans* son contagiosas, como se evidencia por un brote de infecciones de tiña del cuerpo entre cuatro miembros del personal sanitario en una guardia de pacientes internados en rehabilitación que contrajeron la enfermedad de un paciente infectado.¹⁶⁰ De reciente interés, la diseminación contagiosa de *T. tonsurans* se ha convertido en una molestia entre los jóvenes que participan en competencias de lucha. Dado que las lesiones parecen algo diferentes en el subconjunto de estos jóvenes cuando se las compara con la población pediátrica en conjunto, a esta forma de infección se le aplicó el término "tiña del gladiador" (*tinea gladiatorum*).¹⁴⁶ Lo más frecuente es que la tiña del cuero cabelludo se adquiera por el contacto directo con un niño infectado o a través de diversos fómites; un estado de portador adulto asintomático puede contribuir a la persistencia de la infección en un ámbito dado.¹⁹ En un estudio de infección por dermatofitos en 202 niños que residen en Kuwait, al-Fouzan y cols.⁷ encontraron que la tiña del cuero cabelludo era la infección más frecuente y que *M. canis* era la especie con mayor prevalencia (96% de los casos en esta serie). Aunque en la gran mayoría de los casos la infección permanece limitada a la superficie de la piel, los informes han indicado que el hongo puede invadir tejidos más profundos en huéspedes inmunodeprimidos. King y cols.¹⁴² informaron el caso de infección papular subcutánea en un receptor de trasplante renal, con elementos micóticos invasores observados en una biopsia profunda de la piel. El segundo caso fue en un paciente con SIDA y un recuento de linfocitos CD4 de 81, en el que se observó la penetración subcutánea profunda de los nódulos eritematosos del cuero cabelludo y la cara.

Tiña del cuerpo

Las lesiones anulares típicas sobre la piel de las partes lisas del cuerpo con un borde de crecimiento hemorrágico que se disemina suelen estar producidas por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*. Este último hongo se está aislando cada vez con mayor frecuencia como causa de tiña del cuerpo en los Estados Unidos. *T. rubrum* en particular está bien adaptado para sobrevivir en la superficie de la piel, lo que lleva a la infección crónica que suele perdurar durante toda la vida del paciente.⁵³ Los mananos de *T. rubrum* parecen ser más capaces de suprimir las reacciones inmunitarias mediadas por células que los mananos de otros hongos, por lo que evaden la respuesta del huésped y permiten la supervivencia. *T. rubrum* también puede sobrevivir fuera del cuerpo humano cuando las esporas se descaman junto con las escamas, lo cual estimula el contacto interhumano en diversos hábitats. En ocasiones, *T. canis*, un hongo zoofílico y *T. gypsum*, geofílico, también se encuentran como productores de infecciones en la práctica clínica.

Tiña de la barba

Esta infección zoofílica se observa con mayor frecuencia en las personas que trabajan en granjas y con productos de la leche. *T. mentagrophytes* es el agente más común aislado en las infecciones humanas y las lesiones tienden a ser inflamatorias. *Trichophyton verrucosum* también se asocia con la tiña de la barba, adquirida de la piel del ganado vacuno. Sabota y cols.²³⁸ han informado la infección por *T. verrucosum* en cinco pacientes, tres de los cuales presentaban tiña de la barba pustulosa grave y dos de ellos, erupciones en los antebrazos. Los cinco pacientes eran ganaderos. La preparación en fresco con KOH mostró hifas y los cultivos revelaron la presencia de *T. verrucosum* en los tres casos. *T. verrucosum* puede causar la tiña de la barba pustular en granjeros que los médicos, incluso los especialistas en enfermedades infecciosas, pueden confundir con una infección por *Staphylococcus aureus*. La respuesta a la pregunta simple: ¿Usted es ganadero? puede sugerir el diagnóstico de *T. verrucosum* en el contexto clínico apropiado.

Tiña inguinal

Las lesiones tienden a ser circinadas y serpiginosas, con bordes inflamatorios, vesiculares, que se agrandan, la mayoría de las veces causada por *Epidermophyton floccosum*. Esta infección puede alcanzar proporciones epidémicas en atletas, soldados y tripulantes de embarcaciones que comparten toallas, ropa de cama y ropa de vestir.

Tiña del pie (pie de atleta)

Esta es la infección micótica más común en los seres humanos, que de modo típico se manifiesta como lesiones cutáneas con prurito, descamación o humedad de las plantas de los pies, entre los dedos o en ambas localizaciones. Las infecciones son más frecuentes durante los meses cálidos y húmedos. *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum* suelen ser las especies de dermatofitos más aisladas. La gran cantidad de queratina en las plantas de los pies y las palmas de las manos hace a estos dos sitios selectivamente vulnerables a la infección por *T. mentagrophytes* y otros dermatofitos. Debido a la capacidad de *T. rubrum* para sobrevivir como esporas en las escamas de piel descamadas, estas áreas hiperqueratósicas son muy propensas a contraer las infecciones a través de toallas de baño contaminadas, pisos de vestuarios y otros hábitats humanos.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-4 Dermatofitos (cont.)
Tiña de las uñas

Tiña de las uñas es el término para describir el compromiso de las uñas por hongos dermatofitos que debe diferenciarse de la onicomicosis, la cual se refiere a las infecciones causadas por una amplia variedad de hongos que no pertenecen a los dermatofitos, como las especies de *Aspergillus*, *Candida albicans*, especies de *Geotrichum* y varias especies de feohifomicetos dematiáceos hialinos. Las tiñas de las uñas comienzan en el borde lateral o distal de la placa ungular y producen inflamación paroniquial. A medida que la lesión progresa, la uña se engrosa y se torna quebradiza, con acumulación subungular de detritos queratinizados. Los dermatofitos implicados con mayor frecuencia son *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Lugo-Somolinos y Sanchez,¹⁶⁸ en un estudio de 100 pacientes consecutivos con diabetes no hallaron incidencia mayor de infecciones por dermatofitos en relación con una población control. Se encontraron infecciones por algún tipo de dermatofitos en el 31% de los pacientes diabéticos y en el 33% de los del grupo control. Así, contrariamente a la creencia popular, la diabetes mellitus no parece predisponer a las dermatofitosis.

Blastomyces dermatitidis y blastomicosis

Blastomyces dermatitidis es un hongo filamentoso del suelo que es endémico en los estados adyacentes a los valles de los ríos Mississippi y Ohio (Kentucky, Arkansas, Mississippi, Carolina del Norte, Tennessee, Louisiana, Illinois y Wisconsin). Al contrario de lo que sucede con la histoplasmosis, en la que la magnitud de la zona endémica se ha trazado con claridad sobre la base de las pruebas cutáneas positivas, las regiones de infección por blastomicosis sólo se han determinado de acuerdo con los resultados de casos individuales debido a la falta de una prueba cutánea sensible.⁵⁷ Se presume que los seres humanos se infectan por la inhalación de polvo contaminado por esporas; sin embargo, la forma filamentosa del hongo sólo se ha aislado recientemente del suelo y de madera en descomposición a lo largo del trayecto de los ríos en Wisconsin.^{21,144} En los perros existe una incidencia alta de infección.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

De modo característico las colonias presentan un crecimiento lento en los cultivos primarios (10 a 30 días), salvo en los casos de infecciones con gran cantidad de hongos en que el crecimiento puede verse en el transcurso de una semana. A 30 °C, las colonias aparecen como un micelio filamentoso veloso o sedoso, blanco grisáceo a beige pálido (lámina en color 21-5B).

Cuando se convierte a la forma de levadura, puede verse una fase espinosa durante la transformación antes de que aparezcan las colonias levaduriformes típicas. Las colonias se tornan lisas y más levaduriformes, salvo la protuberancia de espículas delicadas, que aparecen como pelos en el extremo (lámina en color 21-5C).

La microscopía de la forma filamentosa del hongo revela hifas delicadas (1-2 µm de diámetro), hialinas y tabicadas. Los conidios ovalados o piriformes, que miden 1-4 µm de diámetro, nacen de modo individual en los extremos de los conidióforos largos o cortos (en forma de "chupachús") (fig. 21-54). Los conidios de las especies saprófitas del suelo de *Chrysosporium* presentan un aspecto similar en la microscopía.

Cuando las colonias se convierten a las formas de levaduras a 35 °C en agar enriquecido son pequeñas, de bordes continuos, algo convexas, lisas y pueden tener una pigmentación amarillo intenso o beige. Con el microscopio se observan levaduras grandes (10-15 µm) y de modo característico presentan un solo brote adherido por una base ancha (fig. 21-55). Estas formas de levadura con brote de base ancha también pueden observarse en los cortes de tejidos contra un fondo celular purulento o granulomatoso (fig. 21-56, izquierda). Estas formas pueden confundirse en los cortes de tejidos con las esférulas de *Coccidioides immitis* que pueden estar una al lado de la otra. Sin embargo, el desarrollo de endosporas dentro de las esférulas proporciona la identificación de certeza de *C. immitis* (fig. 21-56, derecha).

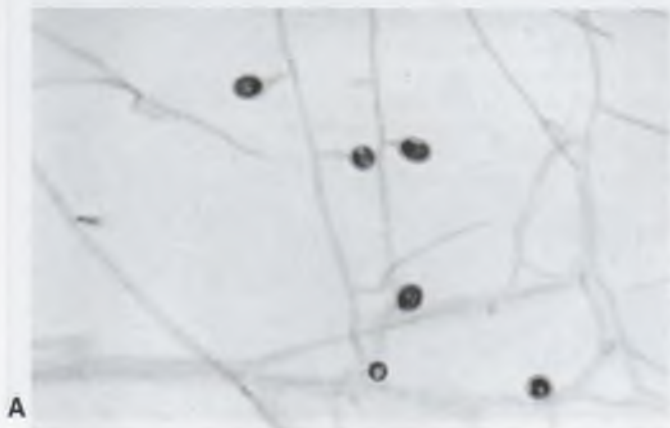


Figura 21-54 Microfotografía y esquema de conidios pequeños y aislados de *Blastomyces dermatitidis* adheridos a las hifas por conidióforos delicados y cortos.

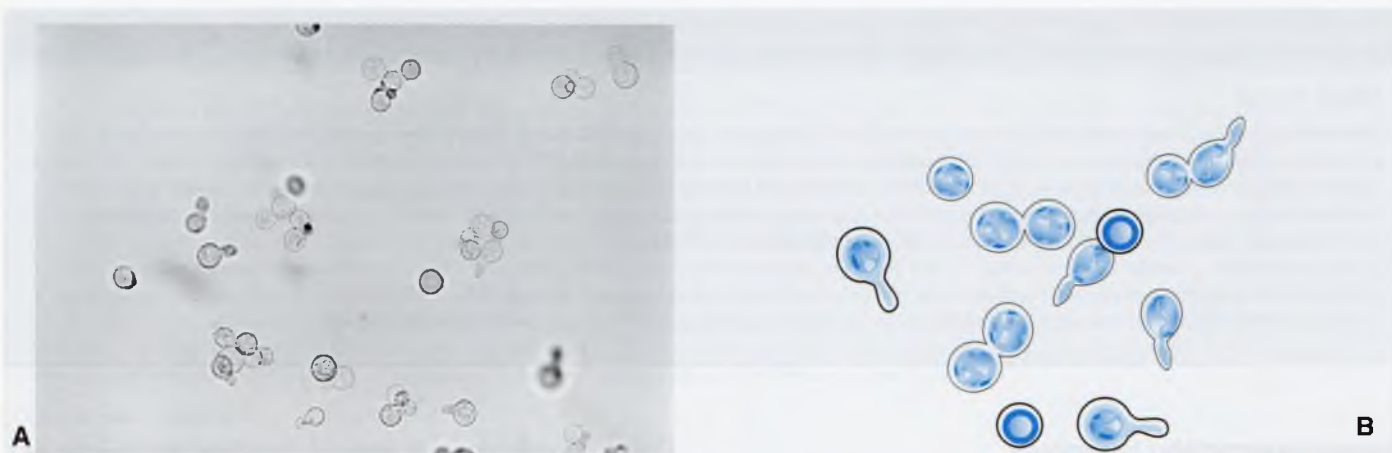


Figura 21-55 Microfotografía y esquema de levaduras grandes de *Blastomyces dermatitidis*, muchas de las cuales producen un brote con base ancha.

Las manifestaciones clínicas de las blastomicosis se encuentran en el recuadro de correlación clínica 21-5.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos suelen considerarse inadecuadas para el diagnóstico de la blastomicosis. Sólo en alrededor del 25% de los casos conocidos son positivas las técnicas de inmunodifusión y fijación del complemento. Los enzimoimmunoanálisis (EIA) son más sensibles que la inmunodifusión (ID), pero menos específicos. Se cita un brote con una fuente común en el que la sensibilidad del EIA (77%) fue más alta que la de la ID (28%) o la fijación del complemento (FC) (9%), pero su especificidad fue más baja: 92%, en comparación con el 100% para la ID y la FC.⁶⁷

Una prueba recientemente desarrollada para el antígeno de *Blastomyces* detectó antigenuria en el 92,9% de los casos de blastomicosis, que incluye 89,3% de formas diseminadas y 100% de formas pulmonares de la enfermedad.⁶⁸ Otros líquidos corporales también pueden ser convenientes para la comprobación

del antígeno; se lo detectó en suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido de lavado broncoalveolar (LBA). La detección de antígeno en LBA puede mejorar la sensibilidad para el diagnóstico en los pacientes con enfermedad pulmonar, en especial en los casos más leves. La detección del antígeno en el LCR puede ser útil para establecer el diagnóstico de meningitis por *Blastomyces*, cuando no se observan las formas de levaduras en los exámenes directos y los cultivos son negativos en cerca del 50% de los casos. La falta de eliminación del antígeno tras un ciclo de tratamiento puede anunciar el fracaso de éste; una recurrencia de la enfermedad puede detectarse si las concentraciones de antígeno se elevan dos o tres veces.⁶⁸

Las manifestaciones clínicas de blastomicosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 21-5.

Coccidioides immitis y coccidioidomicosis

Coccidioides immitis es un hongo dimorfo del suelo, originario del valle de San Joaquín en California, las regiones del sur de Arizona y las del norte de México. Las regiones locales

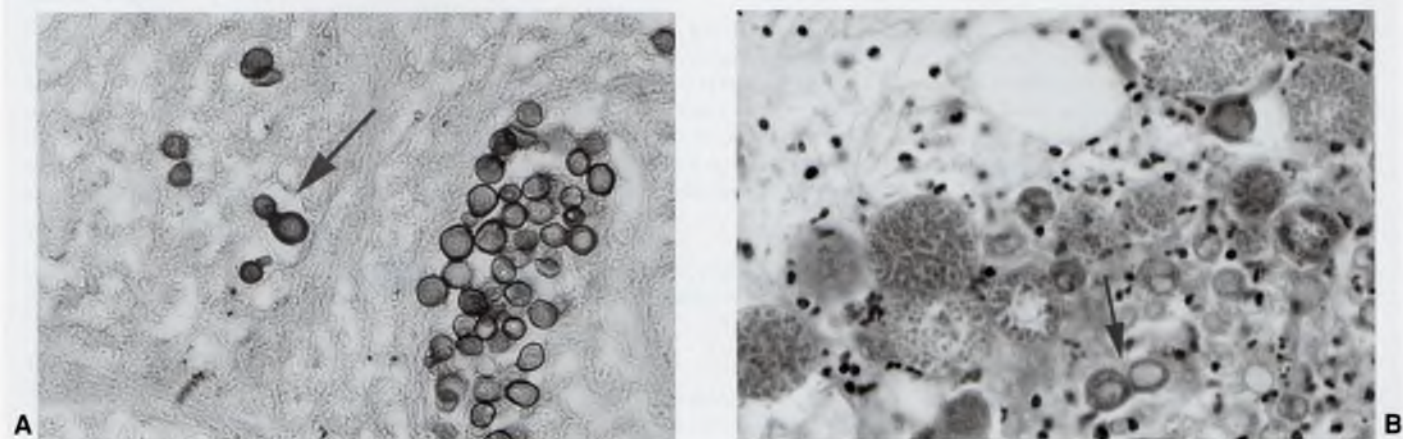


Figura 21-56 Izquierda, microfotografía de un corte de tejido teñido con metenamina argéntica de Gomori, que ilustra grupos laxos de levaduras teñidas de negro de *Blastomyces dermatitidis*, algunas con un brote de base ancha característico. Derecha, microfotografía de un corte de tejido teñido con H-E que ilustra esférulas inmaduras, vacías y pequeñas de *Coccidioides immitis*, junto con formas maduras y grandes que contienen endosporas. Las esférulas vacías que quedan una al lado de la otra pueden simular las formas que emiten brotes con base ancha de *B. dermatitidis* (flecha).

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-5 Blastomycosis

Las presentaciones clínicas de la blastomycosis fueron clasificadas por Davies y Sarosi^{57,58} como sigue:

1. asintomática, en la actualidad sólo descubierta en situaciones de un brote
2. enfermedad de tipo gripal, de duración breve, que se asemeja a otras infecciones respiratorias altas
3. enfermedad que se asemeja a la neumonía bacteriana, con comienzo agudo de fiebre de alta intensidad, infiltrado lobular y tos productiva
4. enfermedad respiratoria subaguda o crónica con un complejo de síntomas que se asemejan a la tuberculosis o al cáncer del pulmón, con hallazgos radiológicos de infiltrado fibronodular o lesiones en masa
5. síndrome de dificultad respiratoria del adulto fulminante con fiebre elevada, infiltrado difuso e insuficiencia respiratoria progresiva

En el ámbito clínico, la blastomycosis comienza casi siempre en los pulmones como la forma pulmonar primaria de la enfermedad cuya manifestación clínica inicial más común es la neumonía.³⁰ Esta puede ser aguda e imitar la neumonía bacteriana, o puede tornarse menos activa; de vez en cuando, puede ser progresiva y grave. En la mayoría de los casos los síntomas se resuelven de modo espontáneo después de un síndrome gripal breve. En las infecciones agudas, la tos seca, la fiebre de baja intensidad, la pérdida de peso, los sudores nocturnos, el dolor torácico pleurítico y las mialgias pueden ser los primeros síntomas de presentación. El dolor torácico localizado persistente, la pérdida de peso, los sudores nocturnos y el malestar general pueden indicar la progresión a la forma crónica.

Mississippi tiene la prevalencia más alta de blastomycosis en América del Norte.¹⁵⁸ Incluso en esta región endémica reconocida por los médicos, el diagnóstico es difícil de establecer. La blastomycosis fue correctamente sospechada en el examen inicial en sólo el 18% de 123 pacientes evaluados en el University of Mississippi Medical Center en Jackson.¹⁵⁷ Los diagnósticos erróneos más frecuentes fueron la neumonía inespecífica (40%), los tumores malignos (16%) y la tuberculosis (14%). Sólo en presencia de compromiso cutáneo la sospecha inicial se elevaba al 64%. Estos diagnósticos erróneos llevaron a menudo a cirugías innecesarias, retrasos en el tratamiento o administración de antibióticoterapia ineficaz durante meses. La inmunosupresión (25% de los casos) y la diabetes mellitus (22%) fueron las causas predisponentes más comunes.

Durante las dos décadas previas al 2000, sólo tres embarazos estuvieron complicados por la blastomycosis en el University of Mississippi Medical Center (un total de 120 pacientes con blastomycosis se trataron durante este período).¹⁵⁹ El riesgo fetal excedió el riesgo materno. De los 20 recién nacidos de madres con blastomycosis, sólo dos (10%) tuvieron infección transplacentaria y fallecieron. No sólo ninguna de las 18 madres afectadas murió a causa de la enfermedad, sino que además no hubo progresión, con 14 curaciones completas y regresiones considerables de las lesiones en el posparto en las otras cuatro mujeres.

El hueso es un sitio común para la infección extrapulmonar. De la bibliografía más antigua, Farr y cols.⁷⁹ informaron un caso de osteomielitis del hueso temporal secundario a *B. dermatitidis* que se manifestó como otitis media serosa. En un estudio de 17 pacientes realizado por MacDonald y cols.,¹⁷⁰ los más afectados fueron las metáfisis de los huesos largos y los huesos pequeños. Las lesiones de las metáfisis tienden a ser excéntricas, bien circunscriptas y líticas. Más recientemente, Hadjupavlou y cols.¹⁰³ informaron un caso de blastomycosis de la columna vertebral lumbar con deformidad incapacitante y grave. Los autores hacen hincapié en la importancia del tratamiento precoz y enérgico para evitar la deformidad y la invalidez.

Según los datos seleccionados por Kwon-Chung y Bennett¹⁵³ de la bibliografía más temprana, otros sitios extrapulmonares que se ven afectados son el aparato genitourinario, en especial la próstata, el epidídimo y el riñón; el cerebro, con la formación de absceso local; los ganglios linfáticos y la glándula suprarrenal. Las manifestaciones clínicas suelen ser las de epididimitis y prostatitis inespecíficas, y el diagnóstico debe hacerse mediante la demostración de los microorganismos en el material de biopsia y puede pasarse por alto en ausencia de un alto grado de sospecha.

Hanson y cols.¹¹⁵ informaron dos casos de blastomycosis laríngea que se diagnosticaron de modo erróneo por carcinoma epidermoide. En uno de los casos, este error diagnóstico fue tratado con radioterapia y laringectomía. En el segundo caso, en el que el diagnóstico clínico fue de carcinoma epidermoide de glotis, se identificaron levaduras con brotes de blastomycosis en la muestra de biopsia. La revisión de la literatura publicada en inglés durante los últimos 80 años reveló varios casos que fueron diagnosticados de modo erróneo por la clínica y la microscopia como carcinoma epidermoide.

Reder y cols.²²⁶ realizaron la revisión de una serie grande de blastomycosis diagnosticada en la Mayo Clinic entre 1960 y 1990. El compromiso de la piel y las mucosas (incluso la laringe) era bastante frecuente, a menudo con características clínicas e histológicas que se semejaban al carcinoma epidermoide bien diferenciado. La afectación de la piel o las mucosas suele indicar enfermedad sistémica y, en muchos casos, éstas pueden ser las lesiones iniciales. El diagnóstico de blastomycosis debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de todo paciente con lesiones cutáneas que no se curan asociadas con factores de riesgo, como vivir en un área endémica y tener una ocupación o vocación que implica el contacto frecuente con el suelo.¹⁶ Las pápulas o pústulas simples o múltiples de la piel que se ulceran, que afectan la cara, las manos o la parte inferior de las piernas, pueden progresar lentamente a un granuloma verrucoso ulcerado con un borde activo serpiginoso. Las lesiones cutáneas primarias que se producen en el sitio de lesiones penetrantes de la piel no se extienden de modo sistémico. También se publicaron casos de enfermedad intraocular.¹⁶⁵

La blastomycosis no se considera una de las infecciones que definen el SIDA; no obstante, en algunos ámbitos de la práctica se observó un aumento distintivo de la incidencia y la gravedad de la enfermedad que ocurre en huéspedes inmunodeprimidos.²⁸⁷ La enfermedad es particularmente progresiva en los pacientes con SIDA cuando los recuentos de linfocitos CD4 se encuentran por debajo de 200/mL.²⁰⁹ Fraser y cols.⁸⁶ estudiaron en paralelo dos amigos, uno de ellos con SIDA, que se infectaron con la misma cepa de *B. dermatitidis* (demostrado por el análisis de endonucleasa de restricción). En el paciente con SIDA se manifestó la blastomycosis pulmonar grave y progresiva que condujo a la muerte a pesar del tratamiento enérgico con fluconazol y anfotericina B; su amigo HIV negativo respondió por completo al mismo ciclo de tratamiento. Los autores concluyeron que la inmunidad celular desempeña un papel fundamental en la progresión de la enfermedad en los pacientes con blastomycosis. Resulta de gran interés la revisión de 123 historias clínicas de pacientes con diagnóstico de blastomycosis en el University of Mississippi Medical Center desde enero de 1980 a mayo de 2000 para determinar la importancia de las preparaciones en fresco, la citología, la histología y el cultivo en el diagnóstico de esta enfermedad micótica.¹⁵⁷ El agente etiológico se detectó por citología en el 56,1% de todos los pacientes y en el 71,8% de los casos pulmonares. La preparación en fresco fue la segunda en importancia para detectar el hongo (37,4%); la histología fue la tercera (32,5%). Los cultivos fueron positivos en el 64,2% de todos los casos, pero proporcionó el diagnóstico inicial en sólo el 3,2% de los pacientes. Se observó compromiso pulmonar en el 87% de los pacientes, cutáneo en el 20%, óseo en el 15% y del sistema nervioso central en el 3%.

del sur de Utah, Nevada, sur de Nueva México y la faja estrecha del territorio que llega hasta Texas actúan como áreas endémicas de infección. La forma filamentosa crece bajo las arenas calientes del desierto en las que las temperaturas elevadas de la subsuperficie son ideales para la propagación. Las hifas se ramifican y fragmentan en artroconidios individuales cuando la tierra se remueve. Estos artroconidios son diminutos, livianos y se transmiten con facilidad por el viento en las nubes de arena y polvo que vuelan. Con la inhalación, estos artroconidios escapan a las defensas mecánicas de las vías respiratorias altas y alcanzan las profundidades del árbol bronquial. Cuando llegan a los alvéolos, los artroconidios se transforman en esférulas de pared gruesa dentro de las cuales, en la madurez, se forman miles de endosporas. Las esférulas con las endosporas en su interior son las formas diagnósticas observadas en los cortes teñidos de tejido.

En los cortes de tejidos pueden encontrarse formas filamentosas, en particular si el sitio afectado ha estado expuesto al aire. Hagman y cols.¹⁰⁴ informaron cinco casos de coccidioidomicosis en los que se encontraron hifas en tejido cerebral o líquido cefalorraquídeo. Estos autores sugirieron que en estos casos la presencia de dispositivos plásticos en el sistema nervioso central parece asociarse con la reversión morfológica de la forma saprófita.

La incidencia de coccidioidomicosis en las áreas endémicas ha aumentado en los últimos años, con máximos en 1991 y 1992 durante los períodos de lluvia intensa seguidos de sequías.¹⁸⁵ Un aumento marcado en la incidencia también se produjo en la década siguiente al terremoto del Valle Simi.²⁰⁸ Kirkland y Fierer¹⁴³ estimaron que este brote costó más de 66 millones de dólares sólo en gastos médicos directos y en tiempo perdido de trabajo en el Condado de Kern, California.

Los informes recientes indican que la coccidioidomicosis continúa siendo un problema creciente en el sudoeste de los Estados Unidos.¹² Se relaciona con un aumento paralelo de la supresión de la inmunidad celular en los individuos, en especial en los que presentan infección por HIV, en los que han recibido un alotrasplante y en los que consumen medicaciones inmunosupresoras. Logan y cols.¹⁶³ informaron que la coccidioidomicosis sigue siendo la micosis endémica más común en América del Norte, sobre todo relacionada con el aumento de los trasplantes de órganos sólidos. Estos autores citan la enfermedad renal y hepática de base, la supresión de linfocitos T por la medicación contra el rechazo y la activación de virus inmunomoduladores, como el citomegalovirus, entre estos pacientes, como factores que aumentan el riesgo para la coccidioidomicosis. Es importante destacar que en más de la mitad de todos los casos se notó la reactivación de la infección por coccidioides adquirida previamente durante el primer año después del trasplante.

Feldman y Snyder⁸⁰ también citan el incremento de los viajes a regiones endémicas del sudoeste de los Estados Unidos como factor que contribuye a la persistencia de la coccidioidomicosis. Por consiguiente, es probable que estos pacientes presenten manifestaciones pulmonares, como neumonía, cavidades y nódulos, cuando regresan a sus hogares en regiones no endémicas del país. Así, la coccidioidomicosis es de importancia nacional. Los médicos de todas partes deben conocer y mantenerse actualizados sobre esta enfermedad y obtener una anamnesis cuidadosa acerca de los viajes de pacientes que presentan signos y síntomas pulmonares a fin de evitar retrasos en el diagnóstico y el tratamiento.

En las áreas endémicas, debe prestarse atención particular a rancheros, granjeros, operarios de la construcción y otros que

realizan actividades al aire libre que requieren una exposición íntima con el polvo y el suelo. Los arqueólogos que participan en excavaciones en áreas endémicas presentan un riesgo elevado especial para la infección. Los estadounidenses de origen africano y filipino, y las mujeres embarazadas están expuestas al mayor riesgo para la enfermedad diseminada.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

Las colonias de *C. immitis* varían en la morfología, pero por lo general aparecen como una telaraña delicada, con un micelio blanco grisáceo. Debe tenerse cuidado extremo cuando se examinan cultivos sospechosos de este hongo. Cuando crece en agar sangre, las colonias pueden parecer verde oscuro o negras en áreas donde se absorben los pigmentos de hemoglobina (lámina en color 21-5F).

En la microscopia, la forma filamentosa que se desarrolla a 30 °C presenta hifas delicadas que cuando se rompen forman artroconidios con forma de barril separados por espacios vacíos (tinción alterante) (fig. 21-57). Las especies de *Malbranchia* y de *Gymnoascus* pueden parecer similares.

C. immitis no presenta forma de levadura. Como se expresó antes, las formas diagnósticas observadas en cortes de tejidos son las esférulas que varían de 20 a 200 µm de diámetro, repletas de endosporas de 2-4 µm cuando están maduras (fig. 21-58).

Las manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 21-6.

Histoplasma capsulatum e histoplasmosis

La histoplasmosis, causada por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum*, es una enfermedad micótica sistémica frecuente en los Estados Unidos. También es la infección micótica más común en los pacientes con SIDA.¹⁸³ Las principales áreas endémicas de histoplasmosis en América del Norte son las cuencas vertientes fluviales de los valles de St. Lawrence, Ohio, Mississippi y Missouri, donde un porcentaje alto de la población nativa presenta pruebas cutáneas positivas, lo que indica infección pasada. La histoplasmosis también se encuentra en América Central; se han informado sólo casos autóctonos ocasionales en otras partes del mundo.

Se han informado casos autóctonos aislados en Europa: Alemania, Bélgica, Holanda y Dinamarca. La histoplasmosis se conoce como una "enfermedad exoeuropea", aunque en Italia se han comunicado algunos casos. Confalonieri y cols.⁴⁰ informaron dos casos nuevos de enfermedad, confirmados por histología, en pacientes italianos que nunca habían estado en el extranjero. Una incidencia relativamente elevada de prueba cutánea positiva a la histoplasmina en un estudio llevado a cabo en la Provincia de Cremona, Italia, confirmó la posibilidad de infecciones endógenas. Calza y cols.³⁴ informaron un caso reciente de histoplasmosis diseminada con lesiones cutáneas atípicas, papulares y ulceradas, en un paciente italiano con HIV sin antecedentes de viaje fuera de su región nativa. Los autores citan este caso como el quinto autóctono de histoplasmosis asociado con SIDA descrito en Italia. O'Sullivan y cols.²⁰⁴ informan un caso de histoplasmosis oral en Brisbane, Queensland, lo que indica que esta enfermedad está reconociéndose cada vez más en Australia, aunque la fuente local permanece sin aclararse. La realidad de que esta infección puede ser subdiagnosticada sugiere una distribución geográfica más extendida.

La forma filamentosa de *Histoplasma capsulatum* está presente en los suelos templados y húmedos con alto contenido de compuestos orgánicos, como los producidos por la acumula-

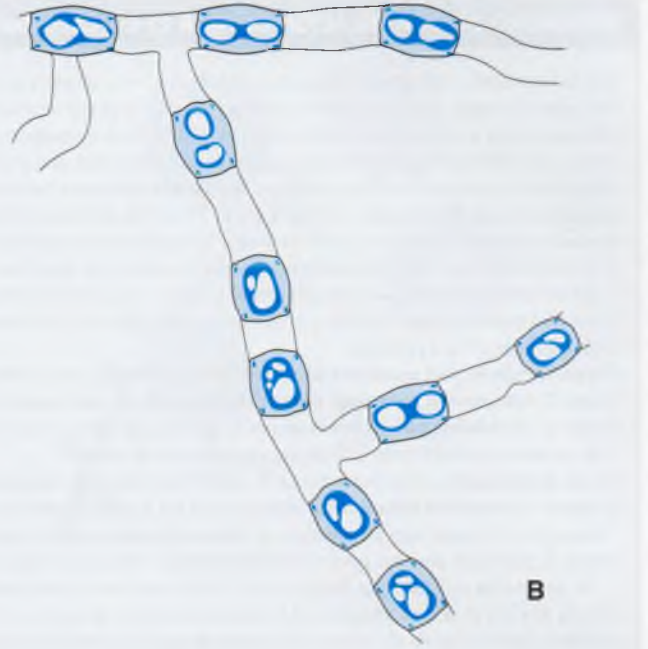
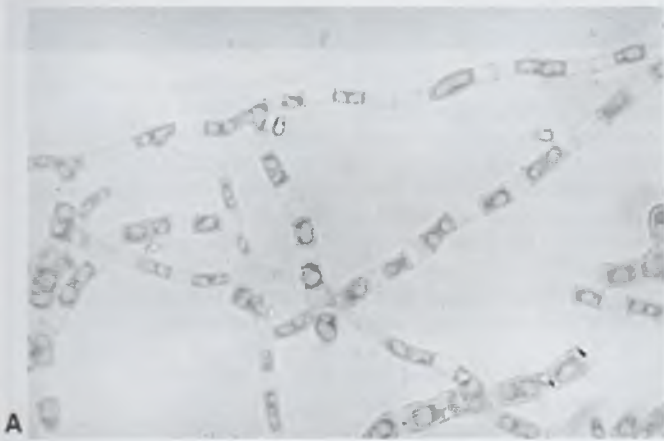


Figura 21-57 Microfotografía y esquema de las hifas de *Coccidioides immitis*, que muestran los arthroconidios con formas de barril característicos, con células individuales separadas por espacios vacíos teñidos de modo pálido.

ción densa de deyecciones de aves o murciélagos. Las perchas para aves, las granjas avícolas, las cuevas o los edificios viejos frecuentados por murciélagos son posibles sitios contaminados. Se aconseja que los pacientes con SIDA o quienes presentan inmunodepresión grave de otra causa eviten trabajar en estas áreas. Las excavaciones de estas zonas o las tareas de limpieza pueden exponer a los seres humanos a enormes cantidades de esporas transportadas por el aire. Se han citado tres brotes grandes de histoplasmosis en el área metropolitana de Indianápolis, Indiana: en 1978 junto con la demolición de un parque de entretenimientos, en 1980 relacionado con la construcción de una piscina y en 1988-1993 durante el tiempo de construcción de un complejo grande de tenis.²⁹⁶

Durante este brote, Williams y cols.²⁹⁶ detectaron antígeno en el 92%, 21% y 39% de los pacientes con formas diseminadas, pulmonares y autolimitadas crónicas, respectivamente. Los autores concluyen que las pruebas séricas de detección del antígeno son muy útiles en los pacientes con hallazgos clínicos de infección diseminada o durante el primer mes de la enfermedad en los casos de compromiso pulmonar grave cuando las pruebas serológicas para anticuerpos pueden ser negativas.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

La forma filamentosa de *Histoplasma capsulatum* crece lentamente (10-30 días), aunque en las muestras con una concentración densa de microorganismos el crecimiento puede observarse ya a los 5 días. Es típica la observación de un micelio aéreo delicado como telaraña o pulverulento, en un comienzo blanco, pero que se torna blanco grisáceo o gris castaño con el tiempo (lámina en color 21-5D).

En la microscopia, las estructuras diagnósticas observadas en la forma filamentosa son los macroconidios grandes, rugosos o espiculados que miden de 10 a 20 μm de diámetro (fig. 21-59). En los cultivos más tempranos, pueden verse microconidios ovales y pequeños que se originan de los lados de hifas delicadas, que se disponen como si fuera un mangoito simu-

lando los microconidios observados en los cultivos filamentosos de *T. rubrum*, *B. dermatitidis* y *S. schenckii*. Las características microscópicas de las especies de *Sepedonium* presentan un aspecto similar.

Las colonias de levaduras que se desarrollan en cultivos primarios incubados a 37 °C o después de la conversión de la forma filamentosa, son típicamente lisas, blanco amarillentas y algo brillantes, de consistencia pastosa (lámina en color 21-5E).

La microscopia de las levaduras revela células pequeñas, de 2-4 μm de diámetro y pueden mostrar un solo brote conectado por un filamento delicado. En los cortes de tejidos, las levaduras se presentan en racimos dentro de los macrófagos y están

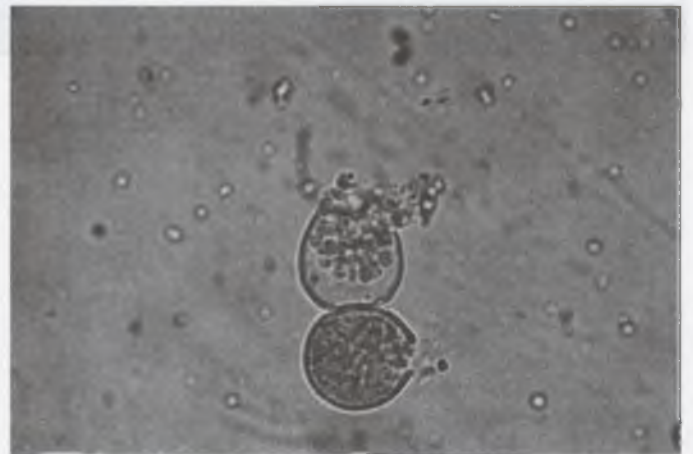


Figura 21-58 Microfotografía de dos esférulas de *Coccidioides immitis* adyacentes entre sí, que simulan las levaduras con brotes de base ancha de *Blastomyces dermatitidis*. Nótese la formación de endosporas, muy bien ilustrada en la esférula superior que sale a través de una fractura de la pared.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-6 Coccidioidomicosis

Tras la exposición a los artroconidios del coccidioides, en la mayoría de los individuos se presenta un síndrome gripal conocido como "fiebre del valle"; en casi todos los casos, se circunscribe al pulmón y es autolimitado: se resuelve en un período de semanas o meses sin tratamiento.⁹⁰ El 60% de las personas infectadas están asintomáticas; muchos individuos con pruebas cutáneas positivas no recuerdan haber tenido síntomas. Los que son sintomáticos experimentan una infección respiratoria baja aguda, de corta duración, con grados variables de tos, producción de esputo, dolor torácico, fiebre y artralgias. Es infrecuente la presentación de un síndrome similar a la neumonía bacteriana, aunque se han informado dos casos.¹⁶⁷ Por último, se desarrolla la enfermedad pulmonar crónica con secuelas en sólo el 2% al 5% de los individuos infectados. Las lesiones numulares⁹¹ solitarias o los granulomas, sólidos o cavitarios, normalmente localizados en la periferia dentro del parénquima pulmonar, son hallazgos residuales frecuentes, sobre todo en los individuos que no residen de modo permanente en el área endémica en que se contrajo la infección.

En las áreas endémicas, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) también es un factor de riesgo para coccidioidomicosis.¹² Sobre la base del trabajo original de Fish y cols.,⁸³ más tarde mejorado por Minamoto y Rosenberg,¹⁸³ se proponen seis categorías de enfermedad de acuerdo con la presentación clínica primaria:

Grupo 1, enfermedad pulmonar focal: infiltrados alveolares localizados; nódulos pulmonares separados, sólidos y cavitarios; adenopatía hilar.

Grupo 2, enfermedad pulmonar difusa: síndrome clínico que simula la infección por *Pneumocystis carinii*.

Grupo 3, coccidioidomicosis cutánea: por lo general simultánea con la enfermedad pulmonar, con pápulas, pústulas, nódulos, abscesos subcutáneos, úlceras, granulomas verrucosos o cualquier combinación de ellos.

Grupo 4, meningitis: pleocitosis del LCR, sobre todo linfocitos, hipoglucorraquia y aumento de las concentraciones de proteínas.

Grupo 5, enfermedad diseminada: afectación de los ganglios linfáticos extratorácicos (con mayor frecuencia inguinales) o compromiso hepático; la diseminación a distancia más informada es a riñones, tiroides, corazón, hipófisis, esófago y páncreas.

Grupo 6, serología positiva para coccidioidomicosis: sin un foco clínico de infección.

En un estudio realizado por Singh y cols.²⁶⁰ de 91 pacientes coinfectados por SIDA y *C. immitis*, los síntomas más comunes fueron fiebre, escalofríos, pérdida de peso y sudores nocturnos. La mortalidad en este grupo fue del 60%, y la presencia de enfermedad pulmonar difusa y recuento de linfocitos CD4 < 510/μL fueron factores de predicción independientes de muerte. La serología para coccidioides reveló títulos positivos en las dos terceras partes (68%) de estos pacientes, con resultados negativos encontrados en el 23%. El porcentaje más alto de reacciones serológicas falsas negativas se observó en el grupo de pacientes con enfermedad pulmonar invasora y progresiva. La anfotericina B sigue siendo el tratamiento de elección, aunque los azoles, en especial el ketoconazol, son menos tóxicos e igual de eficaces.

En su estudio de coccidioidomicosis e infección por HIV, Antoniskis y cols.¹⁵ encontraron que dos de ocho pacientes fueron repetidamente seronegativos y concluyeron que la histopatología y el cultivo siguen siendo los métodos más confiables para establecer el diagnóstico en los pacientes con SIDA. Por el contrario, Arguinchona y cols.¹⁷ hallaron que individuos asintomáticos con títulos serológicos por FC positivos cursaban una coccidioidomicosis activa. En referencia a la exactitud de las biopsias de tejido, de 54 pacientes con coccidioidomicosis informada por diTomasso y cols.⁶² la biopsia transbronquial mostró una sensibilidad del 100% en brindar un diagnóstico rápido, a diferencia del examen citológico del líquido bronquial o del lavado broncoalveolar, que proporcionaron un diagnóstico en sólo el 34% de los casos.

Aún no se ha dilucidado la asociación con un riesgo mayor de coccidioidomicosis diseminada durante el embarazo. Wack y cols.²⁸¹ refutan muchos de los estudios anteriores en los que se considera la coccidioidomicosis durante el embarazo una enfermedad devastadora con elevada mortalidad y hallaron sólo 10 casos entre 47 120 embarazos de mujeres que viven en Tucson, Arizona. La infección se resolvió en siete de las mujeres en quienes la coccidioidomicosis se diagnosticó durante el primero o el segundo trimestre; la enfermedad progresiva se manifestó en dos de tres mujeres que fueron diagnosticadas en el tercer trimestre. Las mejoras en la atención médica y la iniciación de tratamiento antimicótico relativamente temprano en el curso de la coccidioidomicosis pueden explicar las tasas de mortalidad actuales más bajas en las mujeres embarazadas.

Aunque la coccidioidomicosis es sobre todo una afección pulmonar, Arnold y cols.¹⁸ establecieron que la enfermedad diseminada que afecta la piel, el tejido subcutáneo, los huesos, las articulaciones y las meninges aparece en cerca del 0,5-1% de los individuos infectados. En una revisión de 47 casos de la literatura médica, estos autores encontraron que casi todas las manifestaciones en la cabeza y el cuello de los pacientes con coccidioidomicosis diseminada afectaban la piel, con una predilección por la parte central de la cara. A menudo, las lesiones tienden a ser múltiples e incluyen aquellas de las vías aéreas potencialmente mortales. Un informe de prostatitis por coccidioides realizado por Truett y Crum²⁷⁵ sirve como recordatorio de que los agentes micóticos deben ser incluidos en el diagnóstico diferencial de enfermedades en los que podrían ser menos esperados. Las piurias estériles persistentes, la prostatitis y la enfermedad granulomatosa de la próstata fueron signos y síntomas de presentación en los casos informados.

rodeadas por un espacio claro que da el aspecto de pseudoencapsuladas (fig. 21-60). Se observa una reacción inflamatoria granulomatosa de fondo. La cavitación y la necrosis caseosa en las lesiones más antiguas pueden simular la tuberculosis.

A menudo resulta difícil que aparezca en cultivo la conversión de la forma filamentosa de *H. capsulatum* a la forma de levadura. Por esta razón, se recomienda la realización de la prueba de exoantígenos o las sondas de ácidos nucleicos para confirmar la identificación definitiva, que puede hacerse con precisión un día después de la aparición del crecimiento inicial en el cultivo. Los cultivos no necesitan estar maduros o que hayan desarrollado conidios para la realización de la prueba con sondas. Huffnagle y Gander¹²⁶ demostraron el 100% de especificidad y de sensibilidad en la comprobación de 95 hongos en la fase filamentosa: se incluyeron 41 aislamientos de *H.*

capsulatum y una variedad de otros hongos filamentosos. Mediante el empleo de una sonda quimioluminiscente de DNA de una sola cadena marcada con éster de acridina complementaria del rRNA de la forma filamentosa de *H. capsulatum* (AccuProbe: Gen Probe, San Diego, CA), Padhye y cols.²⁰⁶ identificaron de modo correcto 103 de 105 cultivos de *H. capsulatum*. Asimismo, también mediante el empleo de ensayos AccuProbe, Hall y cols.¹⁰⁹ identificaron correctamente 53 de 54 aislamientos de *H. capsulatum* y Stockman y cols.²⁶⁴ demostraron 100% de sensibilidad y especificidad en el estudio de 86 cepas de *H. capsulatum* y 154 de otros hongos no especificados. La edad del cultivo, el medio para el aislamiento y el estado morfológico no afectaron los resultados, lo que indica que la identificación puede hacerse antes de que se produzcan las esporas características.

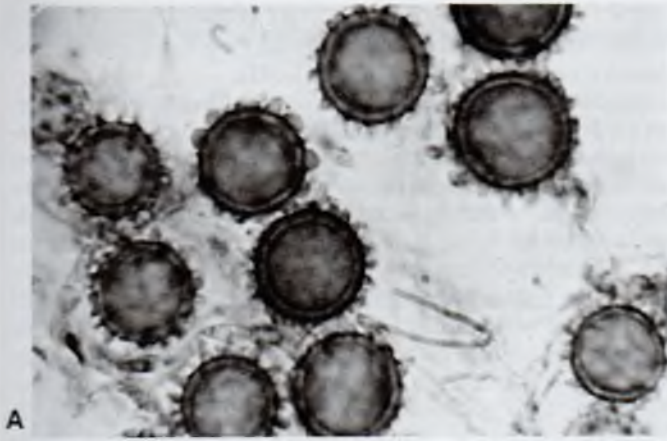
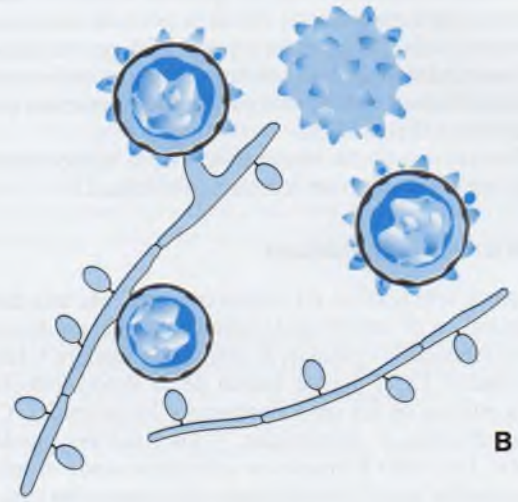


Figura 21-59 Microfotografía y esquema que ilustran la forma filamentosa de *Histoplasma capsulatum*, con macroconidios grandes, esféricos y espiculados.



El diagnóstico de histoplasmosis puede realizarse mediante la identificación de las pequeñas levaduras con brotes intracelulares en cortes de tejidos o en frotis teñidos, o mediante la detección de antígeno en los líquidos corporales. Blumenfeld y cols.²⁵ pudieron identificar los microorganismos intracitoplasmáticos en frotis teñidos con las técnicas de Diff-Quik y Papanicolaou de muestras de líquido de lavado broncoalveolar. Los estudios de seguimiento de cortes teñidos de tejido con metenamina argéntica revelaron levaduras con brotes intracelulares, lo que confirma que correspondían a *H. capsulatum*. El antígeno de *H. capsulatum* se detectó en el líquido de lavado broncoalveolar en 19 de los 27 casos (70,3%) de histoplasmosis pulmonar estudiados por Wheat y cols.²⁸⁹

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

Para el diagnóstico de histoplasmosis se han creado métodos moleculares, en especial las sondas de ácidos nucleicos que se consiguen en el comercio. Se ha logrado reducir el tiempo para la identificación definitiva de los cultivos positivos, ya que pueden realizarse en los elementos del micelio, en lugar de esperar el desarrollo de esporas para el diagnóstico. Hay investigaciones en curso para detectar DNA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* en líquidos corporales y cortes de tejido, en especial para establecer un diagnóstico definitivo de enfermedad granulomatosa cuando las tinciones para hongos no descubren las formas diagnósticas.²⁹²

Las pruebas serológicas para anticuerpos contra *Histoplasma* son positivas en más del 90% de los pacientes con las formas cavitarias o diseminadas de histoplasmosis. Sin embargo, estas pruebas son menos sensibles en los pacientes inmunodeprimidos (50-80%), muchos de los cuales no producen anticuerpos. Las pruebas para detectar anticuerpos también tienen la desventaja de una demora de 4 a 6 semanas antes de que pueda alcanzarse un título lo suficientemente elevado como para ser detectado. También pueden elevarse los anticuerpos contra *Histoplasma* en los pacientes con blastomycosis, coccidioidomycosis y paracoccidioidomycosis.²⁹¹

La prueba de fijación del complemento (FC) que utiliza antígenos de la forma de levadura y filamentosa es más sensible que la prueba de ID. En la histoplasmosis pulmonar aguda, la

prueba de FC es positiva en títulos de al menos 1:8 en el 90% de los pacientes, las bandas M están presentes en alrededor del 76% y las bandas H, en el 23%.⁶⁷ Los títulos en el rango de 1:8-1:16 pueden ser residuales de una infección pasada. Un único título de 1:32 o mayor, o un aumento de cuatro veces es diagnóstico de histoplasmosis activa. La inmunodifusión es lo suficientemente insensible, por lo que se recomiendan otras pruebas serológicas.

El radioinmunoanálisis y el enzoinmunoanálisis no se recomiendan, aunque pueden detectarse anticuerpos más pronto y en una proporción más alta de pacientes. Estos ensayos están mal estandarizados y resulta difícil cuantificarlos e interpretarlos. La especificidad también es baja, con tasas relativamente elevadas de falsos positivos en personas con otras infecciones micóticas o micobacterianas.²⁹¹

La detección del antígeno proporciona una prueba útil en el diagnóstico de histoplasmosis pulmonar en los pacientes con SIDA y en la valoración de la eficacia del tratamiento en los

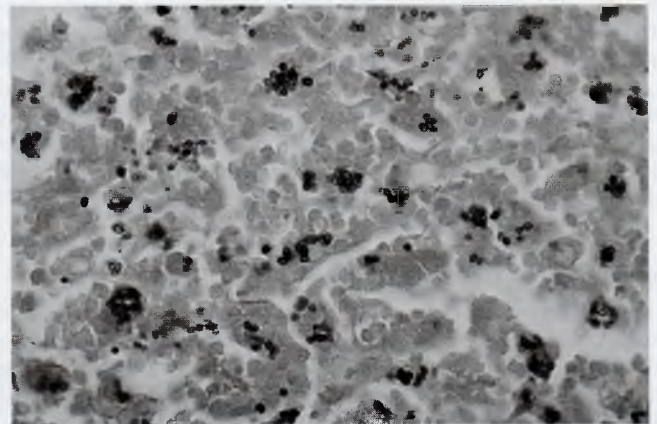


Figura 21-60 Microfotografía de un corte de tejido que revela macrófagos que contienen grupos laxos de levaduras pseudoencapsuladas, intracitoplasmáticas de 2-3 μ m de diámetro, teñidas de negro de *Histoplasma capsulatum* (H-E, 400X, tinción de metenamina argéntica de Gomori).

casos de enfermedad progresiva. En un estudio de 226 pacientes de 18 años de edad o menos en quienes se detectó antígeno de *H. capsulatum* en muestras de orina por radioinmunoanálisis, Fojtasek y cols.⁸⁴ encontraron que el 85% presentaba enfermedad diseminada y el 15%, enfermedad pulmonar autolimitada, cuando al menos una prueba estándar diferente era positiva para corroborar el resultado.

Las diversas manifestaciones clínicas de la histoplasmosis se presentan en la recuadro de correlación clínica 21-7.

Sporothrix schenckii y esporotricosis

Sporothrix schenckii es un hongo que presenta una distribución mundial en el suelo y en la materia vegetal en descomposición, en especial las plantas, la astillas de madera y las espinas de rosales. Es el agente causal de la esporotricosis, una infección crónica de los seres humanos y los animales. Ciertos animales silvestres y domésticos, y los roedores pueden ser portadores. Los seres humanos se infectan cuando el microorganismo penetra la piel de individuos que manipulan sustancias contaminadas. La infección se caracteriza por la formación de lesiones nodulares de los tejidos cutáneo y subcutáneo, a menudo con compromiso linfático (enfermedad linfocutánea). La diseminación sistémica puede afectar huesos, músculos, sistema nervioso central y pulmones.

Ciertas ocupaciones plantean un riesgo mayor de infección. Un brote de esporotricosis sucedió en un vivero de árboles en Florida, según informaron Hajjeh y cols.¹⁰⁸ La esporotricosis linfocutánea se desarrolló en 9 de 65 (14%) operarios encargados de la poda y la producción de musgo esfagno. El riesgo se relacionó directamente con el tiempo de trabajo con ese musgo, en particular con la tarea de llenado de almácigos y en los individuos con menos experiencia en jardinería. El uso de guantes protege de la infección.

Dooley y cols.⁶⁵ comunicaron un brote interesante. En un período de 5 semanas, cinco pacientes que viven en Oklahoma presentaron esporotricosis cutánea, cuatro de los cuales habían mantenido fardos de heno en una víspera de “noche de brujas” (Halloween). Al parecer, el quinto paciente contrajo la enfermedad mientras visitaba la casa. Así, el contacto con el heno, en especial cuando se cosecha de la región centroccidental de los Estados Unidos, puede representar aun otro factor de riesgo.

Pappas y cols.²¹⁰ informaron un área donde la esporotricosis es altamente endémica. En una región montañosa del sur y centro de Perú, se observaron 238 casos de esporotricosis comprobados por cultivo en un período de 3 años entre 1995 y 1997. La incidencia de la esporotricosis en esta región se calculó entre 48 a 60 casos por 100 000 personas, con la incidencia más alta entre los niños de 7-14 años. La piel de la cara fue el sitio más afectado. En todos los pacientes la enfermedad se limitó clínicamente a los tejidos cutáneo y subcutáneo.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

El crecimiento de *Sporothrix schenckii* en cultivo suele manifestarse en el transcurso de 3 a 5 días a 30 °C, aunque ya a las 36-48 horas pueden observarse colonias levaduriformes cuando las muestras se siembran en agar sangre de carnero al 5% y se incuban a 35 °C. Las colonias suelen ser lisas y pueden tornarse duras y rugosas o plegadas. Cuando las colonias maduran puede verse un micelio aéreo delicado, oscuro y rizado. El color es al comienzo blanco grisáceo pero puede tornarse beige, castaño o castaño negruzco (lámina en color 21-5G).

Cuando se incuban a 35-37 °C, las colonias adquieren las características levaduriformes y cuando maduran son castaño oscuro o negras (lámina en color 21-5H).

La identificación puede hacerse en la microscopia al observar en la forma filamentosas hifas delicadas, hialinas y tabicadas a partir de las cuales nacen conidios lisos, hialinos y ovales que miden de 2-4 µm de diámetro, sujetos por un conidióforo delicado, que se asemeja a un pelo, dispuesto en cualquiera de los lados de las hifas; o, más característicamente, en racimos que se asemejan a una margarita en el extremo de un conidióforo recto y delicado (fig. 21-61). Si se ajusta el foco del microscopio y se utiliza objetivo de inmersión, es posible observar las uniones características similares a pelos entre los conidios y el conidióforo (del cual deriva el nombre de la especie). *Sporothrix cyanescens* tiene un aspecto similar a *S. schenckii*, sólo que se forman conidios secundarios, que aparecen como levaduras con brotes nacidos de los extremos de los conidios primarios. La publicación de Sigler y cols.²⁵⁵ incluye excelentes microfotografías que ilustran esta característica microscópica.

Las levaduras miden de 2 a 4 µm de diámetro y tienden a ser ovales o elípticas, a menudo con un solo brote (fig. 21-62). Más útil para hacer la identificación microscópica de las formas de levaduras de *S. schenckii* es la observación de formas de cigarro que miden 3 × 10 µm, que pueden ser difíciles de ver en cortes de tejidos humanos teñidos y para demostrarlas puede ser necesaria la inoculación en animales. En la figura 21-63 se ilustra un corte de un granuloma subcutáneo teñido con metenamina argéntica que presenta las levaduras elípticas. Nótese los brotes con forma de cigarro de una de las células madre.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

Las técnicas serológicas mostraron un beneficio mínimo en el diagnóstico de la esporotricosis. En el pasado se utilizaron pruebas de aglutinación del látex con éxito limitado, en especial en el diagnóstico de infecciones primarias de la piel en que los resultados suelen ser negativos. Los títulos de aglutinación de 1:80 o superiores resultaron útiles en el diagnóstico de infecciones activas extracutáneas.⁵⁶

Las manifestaciones clínicas de esporotricosis figuran el recuadro de correlación clínica 21-8.

Paracoccidioides brasiliensis y paracoccidioidomicosis

La paracoccidioidomicosis es una infección micótica granulomatosa y sistémica que presenta una evolución progresiva subaguda a crónica, causada por el hongo térmicamente dimorfo *Paracoccidioides brasiliensis*. Las formas filamentosas de este hongo residen en el suelo y en los seres humanos se desarrolla la infección pulmonar por la inhalación de los conidios pequeños (4 µm de diámetro) o las infecciones de la piel por la inoculación directa de suciedad contaminada con esporas. En América del Sur, el 80% de los casos informados provienen de Brasil, seguidos en orden de incidencia de informes de casos en Colombia y Venezuela; en el sur de México y en todos los países de América Central, salvo Belice y Nicaragua, también existen áreas endémicas.³²

Es difícil obtener la tasa de prevalencia global de la paracoccidioidomicosis. Aunque se han hecho estimaciones de un millón o más de casos, muchos no se informan o siguen sin diagnosticarse. Botteon y cols.²⁸ han publicado el análisis de un estudio reciente de dos grupos de donantes de sangre. Un

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-7 Histoplasmosis

La mayoría de los casos de histoplasmosis se resuelven después de una enfermedad pulmonar aguda de gravedad variable, caracterizada por fiebre, cefalea, escalofríos, tos y dolor torácico. A menudo se observa neumonía de base y aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mediastínicos. En menos del 1% de los casos puede haber una forma pulmonar crónica, caracterizada por tos persistente, fiebre de baja intensidad y episodios ocasionales de hemoptisis. En los estudios radiográficos de adultos pueden observarse lesiones cavitarias, o uno o más "histoplasmosas" espesos, laminados y calcificados. La formación de granuloma mediastínico seguida de mediastinitis fibrosante y esofagitis son complicaciones raras, pero se han informado algunos casos.¹⁷⁵ Las complicaciones asociadas son disnea, hemoptisis, neumonía posobstruccionaria y obstrucción de la vena cava superior. La intensa fibrosis encontrada en estos casos dificulta la cirugía. Kilburn y McKinsey¹⁴¹ informaron una complicación rara de derrame pleural y fibrosis pericárdica. Con posterioridad en este paciente se observó pericarditis constrictiva confirmada por la necropsia. Como *H. capsulatum* es un microorganismo intracelular estricto que reside en los macrófagos del sistema reticuloendotelial, pueden observarse grados variables de hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía en los casos de enfermedad diseminada aguda y crónica que suelen ser más frecuentes en los huéspedes inmunosuprimidos.

Histoplasmosis diseminada progresiva

La histoplasmosis diseminada progresiva suele ser una enfermedad que define al SIDA y en el 50-75% de los pacientes con SIDA e histoplasmosis representa la primera manifestación.^{244,290} Las manifestaciones clínicas son fiebre, fatiga y pérdida de peso, esta última a menudo se presenta como una enfermedad devastadora.¹⁰⁷ Nightingale y cols.¹⁹⁶ encontraron una prevalencia del 4% de histoplasmosis en 980 pacientes con SIDA estudiados en Dallas, Texas; el examen del frotis de sangre periférica y médula ósea estableció el diagnóstico en el 88% de estos pacientes. Además, Huang y cols.¹²⁵ informaron cinco casos de histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA; todos tenían fungemia y tres fallecieron en el transcurso de las 4 semanas después de confirmar el diagnóstico.

La presencia de SIDA determina que la histoplasmosis sea resistente al tratamiento. Kurtin y cols.¹⁵¹ realizaron una revisión de muestras de médula ósea y de sangre periférica en 13 pacientes con SIDA e histoplasmosis diseminada. Encontraron anemia, leucopenia y trombocitopenia en 12, 10 y 7 pacientes, respectivamente. Se observaron microorganismos circulantes en los frotis de sangre o en las preparaciones enriquecidas en leucocitos en cinco pacientes, por lo general asociados con la presencia de normoblastos circulantes y monocitopenia absoluta intensa. Las muestras de médula revelaron uno de cuatro patrones morfológicos:

- ninguna evidencia morfológica de infección
- granulomas separados
- agregados linfohistiocíticos
- infiltrados difusos de macrófagos

El diagnóstico puede hacerse mediante lisis por centrifugación para aislar el microorganismo en cultivos de sangre y examen de médula ósea, frotis teñidos de sangre periférica y secreciones respiratorias.¹⁹⁰

Otros órganos afectados por histoplasmosis en los pacientes con SIDA, como se registra en la literatura médica reciente, son el sistema nervioso central, que puede tomar la forma de meningitis crónica, lesiones de masa cerebrales o medulares que simulan las neoplasias, o encefalitis y un caso raro de sinusitis publicado por Butt y Carreon.^{13,33,288}

Wheat y cols.²⁸⁸ encontraron manifestaciones del SNC en el 10-20% de los pacientes con histoplasmosis diseminada y el microorganismo puede ser la causa de meningitis crónica sin otra evidencia de diseminación en determinados pacientes. Las lesiones en masa cerebrales o de la médula espinal que se asemejan a neoplasias o abscesos y encefalitis fueron las formas más frecuentes de presentación en esta serie.

Aparato digestivo

La histoplasmosis del aparato digestivo, por lo general del intestino delgado, puede presentarse como úlceras o como una masa, imitando a menudo la enfermedad inflamatoria intestinal o el carcinoma.⁴¹ El aparato digestivo sufre afección secundaria en el 70-90% de los casos de histoplasmosis diseminada, aunque la enfermedad entérica primaria se encuentra con poca frecuencia.²⁶⁶ Jain y cols.¹²⁹ informaron un caso reciente de un hombre de 67 años que presentó diarrea crónica que no respondió al tratamiento convencional, incluso no reveló *Clostridium difficile*. Se le diagnosticó infección aislada del colon por histoplasmosis y se lo trató con itraconazol.

También se informaron casos de histoplasmosis de la orofaringe en que las lesiones pueden confundirse con carcinoma en la presentación inicial.¹²⁰ En especial cuando están afectadas las cuerdas vocales. En una revisión de la literatura desde el informe del primer caso en 1952, Sataloff y cols.²⁴⁵ encontraron menos de 100 casos de histoplasmosis que se presentaron como carcinoma laríngeo. Quizá de mayor importancia, Economopoulou y cols.⁶⁹ revisaron 20 informes de casos de la literatura de histoplasmosis bucal en pacientes infectados por HIV, en muchos de ellos las lesiones bucales parecen ser la manifestación primaria o única de la enfermedad.

Histoplasmosis cutánea

Las lesiones cutáneas pueden ser la presentación inicial de la histoplasmosis en alrededor del 10% de los casos y pueden servir como un marcador para el SIDA. Las manifestaciones cutáneas más frecuentes son las pápulas eritematosas o hiperpigmentadas, las pústulas, la foliculitis, las alteraciones eczematosas, el eritema multiforme y las erupciones del tipo rosácea.²⁸⁷ Chalub y cols.³⁸ informaron acerca de cuatro pacientes con histoplasmosis diseminada y SIDA. En ellos se observó la presencia de múltiples maculopápulas pequeñas (hasta 3 mm de diámetro) y eritematosas en los miembros, la cara y el tronco, a menudo centradas alrededor de los folículos pilosos. En la histología, el infiltrado perivascular con leucocitoclasia llamativa, la falta de una respuesta de macrófagos y la ausencia de granulomas y microorganismos que yacen libres en la dermis, intraneurales y en los anexos de la piel fueron las diferencias características de las presentaciones observadas en los pacientes que no tenían SIDA.

Histoplasmosis genitourinaria

Aunque las infecciones micóticas genitourinarias se ven más con mayor frecuencia en la blastomicosis, se han informado casos de histoplasmosis, en especial en los pacientes con SIDA. Kahn y Thommes¹³² comunicaron un caso de orquitis granulomatosa masiva y epididimitis con necrosis caseosa. Friskel y cols.⁸⁷ publicaron otros dos casos actuales.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-7 Histoplasmosis (copnt.)

Histoplasmosis ocular

Ciulla y cols.⁴⁵ realizaron una revisión del síndrome de histoplasmosis ocular. La tríada clínica clásica incluye cicatrices atróficas de la coroides en la mácula o en la periferia media conocidas como manchas "histo", atrofia peripapilar y neovascularización de la coroides. La pérdida de la visión central es una complicación importante.

Septicemia

Aunque la septicemia por agentes micóticos es rara, la oportunidad de establecer un diagnóstico precoz puede perderse si no se utilizan las técnicas adecuadas para el cultivo de sangre. Paya y cols.²¹² encontraron que la técnica de lisis-centrifugación en tubos para el cultivo era la óptima por aislar la forma de levadura de *H. capsulatum* en sangre en los casos sospechosos de enfermedad diseminada, porque aumenta de manera significativa el rendimiento de cultivos positivos y acorta el tiempo de recuperación. La superioridad de este sistema también está avalada por las observaciones de Murray,¹⁹⁰ quien en un estudio de 182 aislamientos de hongos de todos los tipos encontró que *H. capsulatum* sólo se aisló en el sistema de lisis-centrifugación. El diagnóstico temprano es importante, ya que la diseminación puede ser rápidamente progresiva y mortal en los pacientes con SIDA.

grupo consistió en donantes que viven en un área rural donde la paracoccidioidomicosis es endémica; el otro es un grupo de residentes urbanos de Sao Paulo. Los resultados mostraron que el 21% de 700 muestras obtenidas de los que viven en las áreas rurales endémicas y el 0,9% de 350 muestras de los de áreas urbanas eran positivas por serología. Así, con una población de alrededor de 150 millones, aun cuando se utilice la tasa de prevalencia urbana más baja de paracoccidioidomicosis, más de un millón de los residentes de Brasil sólo están infectados.

Los países de las islas del Caribe, Guyana y Chile han estado exentos de la enfermedad. En las áreas endémicas, la mayoría de los casos se producen en regiones arboladas húmedas y sus alrededores. La enfermedad afecta con mayor frecuencia a adultos mayores de 30 años, es rara en los niños y tiene una incidencia mayor en los varones, con una relación global de 15:1. Aunque casi todos los pacientes son agricultores, se han informado casos ocasionales en individuos con exposición directa al suelo y la vegetación, como lo indicó el informe citado. La raza blanca es más propensa a las infecciones que los indios estadounidenses; las infecciones más graves tienden a desarrollarse en inmigrantes que van a áreas endémicas.³²

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

Las colonias presentan un aspecto similar a las de *Blastomyces dermatitidis*, con un crecimiento lento a 30 °C, requieren de 10 a 20 días para madurar y tienen un micelio sedoso o veloso, blanco grisáceo.

Cuando se incuba a 25-30 °C, *P. brasiliensis* crece con más lentitud y forma filamentos en 10 a 30 días, sedosos, blancos a gris ocre. La identificación y la diferenciación de otros hongos filamentosos de aspecto similar pueden realizarse mediante la observación microscópica de las hifas delicadas, hialinas y tabicadas que constituyen el micelio de fondo. Los conidios característicos miden de 2-4 µm, son ovales, no pigmentados, nacen de modo individual a partir de conidióforos cortos y delgados directamente de las hifas, de manera de "chupachús", similares en aspecto a los producidos por *Blastomyces dermatitidis* (fig. 21-64).

La identificación puede confirmarse por la conversión de la forma filamentosa a la de levadura, que se logra mediante la inoculación de una porción pequeña de la colonia filamentosa al agar enriquecido con infusión de cerebro y corazón. Esta conversión es lenta. Las levaduras madre de *P. brasiliensis* observadas en cultivos miden 6-15 µm y parecen similares a las de



Figura 21-61 Microfotografía y esquema de la forma filamentosa de *Sporothrix schenckii*, que muestran hifas delicadas y con forma de "margarita" que forman racimos de conidios pequeños, ovales de los lados o las puntas de conidióforos rectos.



B

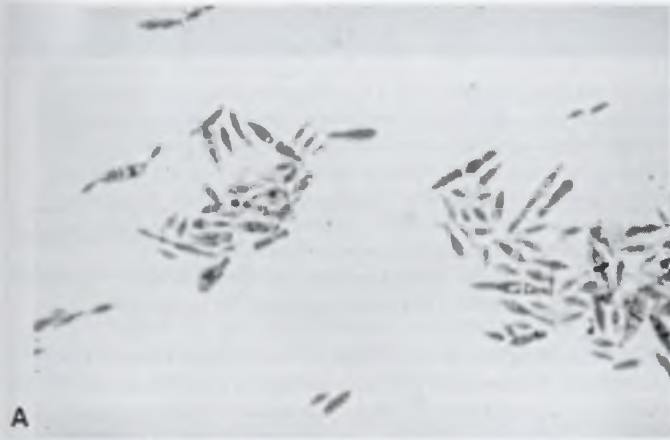


Figura 21-62 Microfotografía y esquema de la forma de levadura de *Sporothrix schenckii*, que revelan levaduras bicelulares, alargadas, muchas de las cuales con cuerpos que se asemejan a un “cigarro”.



B. dermatitidis, salvo que en el primero se observan múltiples brotes de base estrecha, a diferencia del brote único de base ancha de *Blastomyces*.

En la forma infectante a 37 °C (“temperatura corporal”), *Paracoccidioides brasiliensis* existe como levadura. Por consiguiente, el diagnóstico de paracoccidioidomicosis puede establecerse con más rapidez mediante la demostración directa en las muestras clínicas de las levaduras esféricas de 10–30 µm características, de paredes gruesas, con múltiples brotes unidos cada uno por un cuello estrecho que da el aspecto de “rueda de timón” (fig. 21-65). Estas levaduras se observan mejor en preparaciones en fresco con KOH, ya sea directamente o con blanco de calcoflúor o reactivos de inmunofluorescencia. En algunos casos, cuando las células hijas brotan forman cadenas cortas. En los cortes de tejidos, la inflamación de fondo suele ser granulomatosa, mezclada con concentraciones variables de leucocitos polimorfonucleares. El diagnóstico se establece por el hallazgo de levaduras con múltiples brotes como se descri-

bió antes, que se observan mejor en cortes teñidos con PAS o metenamina argéntica de Gomori.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

La prueba de exoantígeno, recientemente perfeccionada por Camargo y cols.,³⁵ es un modo de confirmar la identificación del cultivo de aislamientos desconocidos. Las técnicas de inmunofluorescencia indirectas, enzimoimmunoanálisis y, las más recientes pruebas de amplificación por PCR, fueron utilizadas por muchos investigadores para confirmar el diagnóstico. Brummer y cols.³² realizaron una revisión de los procedimientos inmunodiagnósticos actuales para la paracoccidioidomicosis. Las concentraciones elevadas de anticuerpos séricos específicos del tipo IgG pueden detectarse durante al menos un año después de la infección. Por lo general, no se observan concentraciones elevadas de anticuerpos IgM salvo en los casos de compromiso amplio de los ganglios linfáticos.

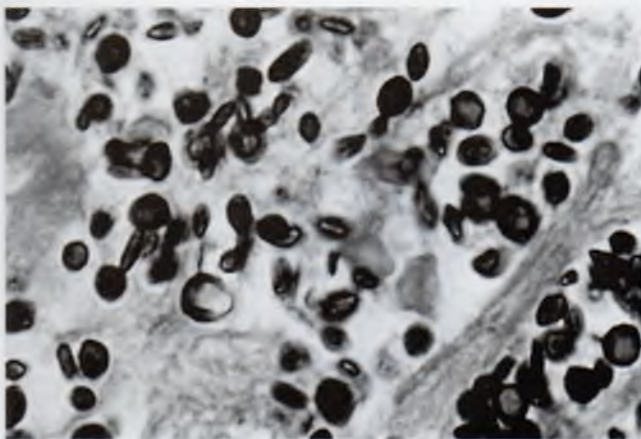


Figura 21-63 Microfotografía de una biopsia de piel de un caso de esporotricosis que revela numerosas levaduras esféricas u ovales de *Sporothrix schenckii*, algunas de las cuales muestran brotes bicelulares, alargados, con forma de “cigarro” (tinción de metenamina argéntica con gran aumento).

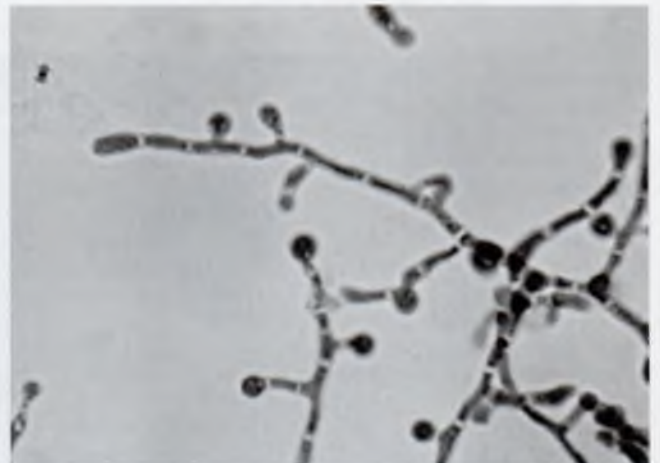


Figura 21-64 Microfotografía de la forma filamentosa de *Paracoccidioides brasiliensis*, que muestra conidios pequeños, lisos y esféricos que nacen de los lados y del extremo de conidióforos cortos originados a partir de hifas tabicadas.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-8 Esporotricosis

En los Estados Unidos, las infecciones micóticas subcutáneas son causadas en su mayoría por *Sporothrix schenckii*.¹¹ La forma más común de esporotricosis es la linfocutánea. La aparición de una pústula pequeña, roja e indolora en una extremidad, junto con lesiones postulares o ulcerativas secundarias múltiples, dispuestas linealmente a lo largo de los linfáticos proximales es suficiente para sospechar el diagnóstico. La pústula primaria puede agrandarse con lentitud, ulcerarse y segregar una cantidad pequeña de exudado serosanguinolento. Pueden observarse grados variables de celulitis con edema y eritema del tejido subcutáneo circundante. Las lesiones satélites secundarias se presentan al comienzo como placas verrucosas, eritematosas o escamosas, que a menudo evolucionan a úlceras que también segregan material purulento. Con frecuencia, el diagnóstico se retrasa porque la colonización bacteriana secundaria asociada puede confundirse con el agente infeccioso primario. Las sobreinfecciones bacterianas pueden confundir el aspecto macroscópico.

En los casos de enfermedad progresiva, la infección puede extenderse a articulaciones, vainas tendinosas, bolsas sinoviales, huesos y músculos.³⁰⁰ Purvis y cols.²²⁷ informaron un caso de artritis poliarticular bilateral de las muñecas y los codos. Aunque la artritis es una manifestación rara de la esporotricosis, este caso señala el amplio espectro de enfermedad que puede estar causado por este hongo.⁴²

La artritis esporotricótica es una enfermedad rara, con sólo 51 casos informados en la literatura inglesa. Howell y Toohey¹²³ comunicaron los resultados de 13 pacientes con artritis esporotricótica que habían sido tratados en hospitales de la región de Wichita desde 1979. La presentación típica era la de un paciente afebril con una articulación que mostraba calor y cierto edema sin eritema. Se observó el compromiso de 17 articulaciones, que abarcaban 10 de rodilla, 3 interfalángicas, 1 de codo, 1 mediotarsiana, 1 intercarpiana y 1 metatarsal. Casi todos los pacientes eran hombres de mediana edad y en el 77% de ellos se registró la ingestión de cantidades importantes de alcohol. Wang y cols.²⁸³ informaron el caso de un paciente con una bursitis prerrotuliana infectada por *Sporothrix schenckii*. La infección persistió a pesar del tratamiento con itraconazol y la curación sólo se logró después de la extirpación quirúrgica de la sinovial.

La esporotricosis pulmonar primaria es rara. Sin embargo, England y Hochholzer⁷⁵ informaron ocho casos de esporotricosis pulmonar primaria en pacientes tras la inhalación de conidios transportados por el aire, un hecho poco frecuente. Los síntomas de presentación usuales son tos, producción de esputo y fiebre de baja intensidad.

En los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, la esporotricosis puede tener presentaciones atípicas, en que la enfermedad tiende a extenderse y diseminarse. La enfermedad cutánea que comienza como lesiones localizadas puede diseminarse a otros sitios de la piel, con diseminación a las meninges en un informe de casos.⁶⁴ El diagnóstico puede ser difícil cuando la esporotricosis se presenta inicialmente como fungemia y enfermedad diseminada.⁹ Aunque la esporotricosis localizada es un trastorno inocuo que responde bien al tratamiento, estos autores encontraron que en los huéspedes inmunodeprimidos la enfermedad es potencialmente mortal y a menudo difícil de tratar, y requiere tratamiento prolongado con medicaciones que pueden ser tóxicas, como la anfotericina B. La infección progresiva fue más frecuente en los individuos con recuentos de linfocitos CD4 menores de 100 células/mm³.

Mendes-Giannini y cols.¹⁷⁹ demostraron anticuerpos específicos de los tipos IgG, IgA e IgM contra el antígeno de 43 kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* en los pacientes con paracoccidioidomicosis y además comprobaron que la disminución de los títulos durante un ciclo de tratamiento se relacionaba con la mejoría de los síntomas. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la forma de levadura de *Paracoccidioides brasiliensis*, Gómez y cols.⁹⁶ pudieron crear una prueba de inhibición del ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) capaz de detectar cantidades pequeñas de

antígeno circulante en el suero de pacientes con enfermedad activa. De 46 pacientes con paracoccidioidomicosis, 37 resultaron positivos (80,4%). Sandu y cols.²⁴¹ crearon una sonda de DNA de 14 bases específica para las secuencias 5' terminal del gen ribosómico 28S de *P. brasiliensis*. Al aplicar un protocolo de diagnóstico uniforme, que consistía en los procedimientos comunes de lisis celular y la purificación del DNA seguidos de la amplificación por PCR, estos autores demostraron la identificación selectiva de *P. brasiliensis* de otras 47 especies de hongos que representan 25 géneros.



Figura 21-65 Microfotografía y esquema de la forma de levadura de *Paracoccidioides brasiliensis*, que muestran el cuerpo central grande que da lugar a brotes múltiples, formando una “rueda de timón”.

Los resultados de estos estudios proporcionan varios enfoques alternativos que no utilizan cultivos para establecer el diagnóstico de paracoccidioidomicosis.

Las manifestaciones clínicas de la paracoccidioidomicosis se muestran en el recuadro de correlación clínica 21-9.

Hongos dematiáceos

Agentes de feohifomicosis

A diferencia del grupo de hongos hialinos, un segundo gran grupo de hongos filamentosos saprófitos de crecimiento rápido producen un pigmento similar a la melanina que da por resul-

tado hifas con pigmentación oscura, reconocidas a simple vista como colonias gris oscuro o negras, tanto en la superficie como en el reverso. A este grupo de hongos dematiáceos se le aplicó el término feohifomicetos (*phaeohyphomycetes*; del griego *phaeo* = oscuro, gris).

Ajello y cols.⁶ fueron los primeros en proponer en 1986 el concepto de "feohifomicosis" para "cubrir todas las infecciones de naturaleza cutánea, subcutánea y sistémica causadas por hongos hifomicetos que se desarrollan en los tejidos del huésped en la forma de elementos dematiáceos con hifas tabicadas de paredes oscuras". Estos elementos del micelio de los dematiáceos se acompañan de modo característico por una reacción inflamatoria granulomatosa cuando se observan en cortes de tejidos. Por lo tanto, como se explicó en un principio, la "feohi-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-9 Paracoccidioidomicosis

Tras la inhalación de polvo contaminado por esporas, los conidios pequeños (4 µm de diámetro) alcanzan la porción distal del parénquima pulmonar donde se desarrollan en levaduras que pueden quedar confinadas localmente o pueden propagarse y diseminarse a órganos distales en los casos de enfermedad diseminada progresiva. En un huésped competente, el crecimiento local se retrasa y la infección puede finalizar sin el desarrollo de lesión. Cuando es sintomática, Brummer y cols.³² dividieron la paracoccidioidomicosis en dos categorías generales: 1) la forma juvenil, aguda o subaguda y 2) la forma crónica, del adulto.

Forma juvenil, aguda o subaguda

La forma juvenil de la enfermedad incluye sólo del 3% al 5% de los casos, y comprende sobre todo a niños o adultos jóvenes inmunodeprimidos. La evolución de la enfermedad es relativamente rápida (semanas a meses), marcada por la afectación difusa del sistema reticuloendotelial. La hepatoesplenomegalia, las linfadenopatías y la hiperplasia de la médula ósea son presentaciones clínicas frecuentes. La disfunción de la médula ósea puede ser tan grave como para simular un trastorno linfoproliferativo.¹⁶⁴ Las biopsias de los órganos o tejidos afectados revelan gran cantidad de levaduras con proliferación activa, sin la formación de granuloma. En esta forma de la enfermedad, los pulmones raras veces están comprometidos, aunque los microorganismos pueden detectarse en las secreciones respiratorias. En ocasiones, los ganglios linfáticos mesentéricos aumentan tanto de tamaño que causan obstrucción intestinal. El pronóstico de la forma juvenil de la enfermedad es desfavorable.

Forma crónica, tipo adulto

Alrededor del 90% de los pacientes padecen esta forma de la enfermedad, que en su mayoría afecta a varones adultos. La enfermedad es lentamente progresiva, tiende a permanecer limitada sobre todo a los pulmones y puede tardar meses o años para establecerse en su totalidad. Los pulmones están afectados en más del 90% de los pacientes infectados y en muchos casos representan el único sitio de infección. Las lesiones pulmonares, como se observan en las radiografías, son nodulares, infiltrativas, fibrosas o cavitarias y se localizan de preferencia en los lóbulos inferiores de los pulmones.¹⁶⁴ Los síntomas frecuentes son tos, expectoración y disnea, a menudo acompañados por fiebre intermitente de baja intensidad, pérdida de peso y anorexia. El cuadro pulmonar imita a menudo a la tuberculosis. La enfermedad crónica puede ser leve, moderada o grave, de acuerdo con el estado general del paciente y el estado inmunario; la fibrosis intensa conduce a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y al cor pulmonar, que son secuelas mortales.

Brummer y cols.³² citan algunos informes de casos de compromiso extrapulmonar, como ojos, sistema nervioso central, huesos y aparato genital. Varios informes también aparecen en la literatura más reciente, por lo general de América del Sur. Sant' Anna y cols.²⁴² revisaron los casos de siete pacientes con enfermedad laríngea, todos varones de mediana edad, predominantemente granjeros. Los síntomas de presentación principales fueron disfonía, disfagia, disnea y tos. En cada uno de estos pacientes la primera impresión diagnóstica fue carcinoma.

De más reciente preocupación es el recrudecimiento del compromiso bucal y las micosis profundas de la boca.^{8,94} Almeida y cols.⁸ informaron que las infecciones micóticas (micosis) bucales adquirieron una importancia particular desde el advenimiento de las infecciones por el HIV, así como el aumento de viajes por el mundo, con mayor exposición a las infecciones endémicas de los trópicos. Almeida y cols. informan además acerca de 21 pacientes argentinos que viven en la provincia de Corrientes y presentaron manifestaciones bucales de *Paracoccidioides brasiliensis*. Todos los pacientes excepto uno tenían compromiso pulmonar detectable. La administración a largo plazo de itraconazol proporcionó la curación en estos casos. Los autores hacen hincapié en la necesidad de realizar el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado para evitar la destrucción extensa del tejido. También es obligatorio el seguimiento a largo plazo, ya que la tasa de recidiva es elevada.

La manifestación clínica encontrada entre los 27 pacientes con SIDA informados por Goldani y Sugar⁹⁵ recorrió el espectro desde la infección inactiva hasta la evolución rápidamente progresiva. La enfermedad diseminada fue la forma más frecuente, en que los sitios más comunes de infección fueron el pulmón, la piel y los ganglios linfáticos. En la mayoría de los casos se observó fiebre prolongada, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y lesiones cutáneas; de hecho, representan un cuadro de síntomas que puede servir como marcador para el SIDA. El diagnóstico se realiza mejor por el examen directo y el cultivo de muestras de esputo, biopsias de piel y aspiración de ganglios linfáticos. Como se mencionó, los ensayos por PCR de estas muestras promete aumentar en gran medida las posibilidades de realizar el diagnóstico. Más de la mitad de los pacientes en esta serie murieron a pesar del tratamiento energético con antimicóticos.

Severo y cols.²⁵² informaron un caso de compromiso del aparato genital masculino en un nativo de Brasil e incluyeron la revisión de otros 18 casos recogidos de la literatura brasileña. Manns y cols.¹⁷² describieron el caso de un hombre de 59 años que presentó paracoccidioidomicosis más de 15 años después de dejar América del Sur. Los médicos de todo el mundo deben tener presente esta infección al evaluar a un paciente con antecedentes pertinentes de viajes que presenta manifestaciones pulmonares, de mucosas o cutáneas sugestivas de esta enfermedad, junto con pérdida de peso y otros síntomas generales.

fomicosis” fue el término usado para describir una entidad histopatológica en lugar de representar cualquier enfermedad clínica particular o especie de hongo como se identifica en los cultivos del laboratorio. No obstante, el término *feohifomicosis* se aplica en la actualidad a varias entidades clínicas: sinusitis, queratitis, endocarditis y neumonía, entre otras. De Hoog⁶⁰ aconseja que este término se considere estrictamente una palabra descriptiva artificial, sin importancia biológica. Todavía, muchos micólogos recomiendan que el término genérico se reemplace con informes como “queratomicosis causada por especies de *Bipolaris*” o “micetomas causado por *Phialophora richardiae*.”²³³ En esta presentación, los agentes de cromomicosis y micetomas se incluyen en la categoría general de feohifomicosis, haciendo referencia en términos más amplios a los hongos dematiáceos oscuros.

PRESENTACIÓN EN EL LABORATORIO

Este grupo de hongos dematiáceos puede sospecharse en el cultivo como agentes de feohifomicosis al observar la superficie vellosa, algodonosa o aterciopelada gris oscuro, castaño o negra, con una pigmentación gris humo a negro azabache en el reverso de la colonia (otros hongos pueden producir conidios negros en los que el pigmento sólo oscurece la superficie de la colonia). Como la morfología de la colonia no es distintiva entre este grupo de hongos, es necesario el examen microscópico para la identificación de género y de especie. Los agentes de cromomicosis y micetomas suelen ser de crecimiento lento y las colonias tienden a ser pequeñas. Las colonias representativas de los hongos filamentosos dematiáceos saprófitos de crecimiento más rápido se muestran en la lámina en color 21-3A-D.

En la microscopia, los hongos dematiáceos tienen un micelio amarillo oscuro a castaño compuesto por hifas uniformes con paredes paralelas y tabiques característicos. Los hongos incluidos en este grupo de hongos filamentosos de crecimiento

rápido están caracterizados por la formación de macroconidios con tinción oscura. Los géneros de importancia médica son:

Especies de *Alternaria*
Especies de *Ulocladium*
Especies de *Stemphylium*
Especies de *Epicoccum*
Especies de *Bipolaris*
Especies de *Drechslera*
Especies de *Curvularia*
Especies de *Exserohilum*
Especies de *Nigrospora*
Especies de *Phoma*
Especies de *Chaetomium*

La identificación de estos hongos puede simplificarse si se consideran los siguiente tres subgrupos sobre la base de la morfología de los macroconidios:

- Los en que los macroconidios son multicelulares y divididos por tabiques longitudinales y transversales, denominados “muriformes” (como una pared de albañilería).
- Los en que los macroconidios son multicelulares sólo divididos por tabiques transversales.
- Los que pertenecen a un grupo misceláneo en que los macroconidios son células individuales o que manifiestan otros modos específicos de conidiación.

Macroconidios con tabiques transversales y longitudinales (muriformes)

Los géneros de hongos de importancia médica incluidos en este grupo son:

Especies de *Alternaria*
Especies de *Ulocladium*
Especies de *Stemphylium*
Especies de *Epicoccum*

ESPECIES DE *ALTERNARIA*

La formación de cadenas cortas de macroconidios grandes, multicelulares, de paredes lisas, separados por tabiques transversales y longitudinales (**muriformes**) es característica de las especies de *Alternaria*. Los macroconidios tienen forma de palillos de tambor, con el palillo largo de un conidio que ensambla contra el extremo redondeado y romo del siguiente (fig. 21-66).

ESPECIES DE *ULOCLADIUM*

Las especies de *Ulocladium* también producen macroconidios muriformes; sin embargo, son más esféricos que los de las especies de *Alternaria*, no se disponen en cadenas y nacen de conidióforos cortos, curvos como si fuera una “rodilla” o geniculados (fig. 21-67). Este **origen simpodial** de los macroconidios es una característica importante para la identificación.

ESPECIES DE *STEMPHYLIUM*

Se producen macroconidios muriformes que se asemejan a los de las especies de *Ulocladium*; sin embargo, nacen de modo individual en el ápice de un **conidióforo no geniculado** y recto. Los macroconidios están levemente dilatados y redonde-



Figura 21-66 Microfotografía de una cadena corta de macroconidios muriformes, oscuros, de especies de *Alternaria*.

ados en la punta que, junto con el conidióforo de apoyo, tiene el aspecto de una “bala de algodón sobre un palo” (fig. 21-68).

ESPECIES DE *EPICOCCUM*

De modo típico las hifas forman ramificaciones repetidas focales que a su vez se vuelven a ramificar de ciertas hebras y forman masas conocidas como el **esporodoquia**. De estas masas se forman conidióforos cortos que tienen macroconidios multicelulares, muriformes, esféricos o con forma de maza, que pueden presentar una superficie rugosa que da el aspecto de una verruga negruzca (fig. 21-69).

Macroconidios con tabiques transversales

ESPECIES DE *BIPOLARIS*

La característica distintiva de las especies de *Bipolaris* es la producción de macroconidios multicelulares, elípticos a ovalados, de pared gruesa con superficies lisas, nacidos de conidióforos que tienen curvaturas similares a rodillas (**geniculados**) en una disposición **simpodial** (fig. 21-70). La designación *Bipolaris* surge de la propiedad de formar tubos germinales que se originan **desde ambos extremos de los macroconidios** en paralelo con el eje longitudinal de la célula (cuando se examinan en preparaciones directas en fresco con agua o solución fisiológica de los conidios y se incuban a 25 °C durante 8-24 horas).

ESPECIES DE *DRECHSLERA*

Las especies de *Drechslera* también producen macroconidios multicelulares y cilíndricos que nacen de conidióforos geniculados, indistinguibles de los de las especies de *Bipolaris*. Los conidios presentan contornos redondeados que no sobresalen de la célula basal. En preparaciones en fresco con solución fisiológica, **un solo tubo germinal** surgido en la mitad del camino entre la base del conidio y el tabique, y que **se extiende en ángulo recto al eje longitudinal**, es una característica de identificación importante. En la práctica, la mayoría de los aislamientos clínicos que presentan conidios como los descritos pertenecerán al género *Bipolaris*.

ESPECIES DE *CURVULARIA*

Los macroconidios de las especies de *Curvularia* son fáciles de reconocer, ya que tienen cuatro a cinco células separadas por tabiques transversales, nacidos de modo **simpodial** de dos

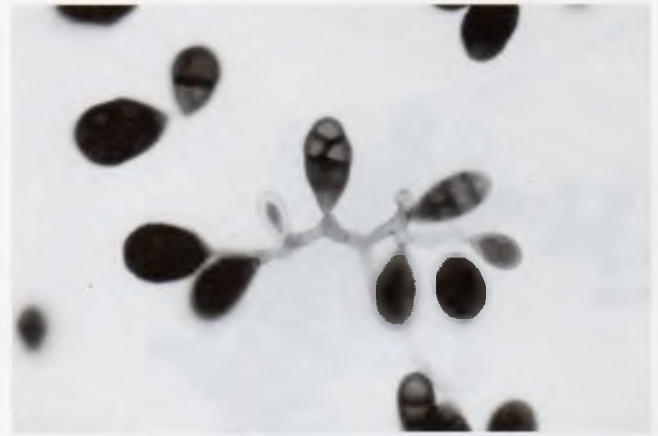


Figura 21-67 Microfotografía de macroconidios muriformes, oscuros, nacidos de conidióforos geniculados, característicos de las especies de *Ulocladium*.

conidióforos curvos. Las **células centrales crecen más rápidamente** y son más grandes que las de los extremos, lo que da por resultado el aspecto característico curvo o de “búmeran” (fig. 21-71).

ESPECIES DE *EXSEROHILUM*

Los conidios de las especies de *Exserohilum* son similares a los de las especies de *Bipolaris*, sólo que son más largos, con forma de lápiz, formados por más células y de modo característico presentan un **nudo protuberante, prominente y extenso** desde la célula hilar (fig. 21-72).

Macroconidios que nacen de modo individual o por conidiación especial

Los géneros de los hongos filamentosos dematiáceos incluidos en este grupo son:

Especies de *Nigrospora*
Especies de *Phoma*
Especies de *Chaetomium*

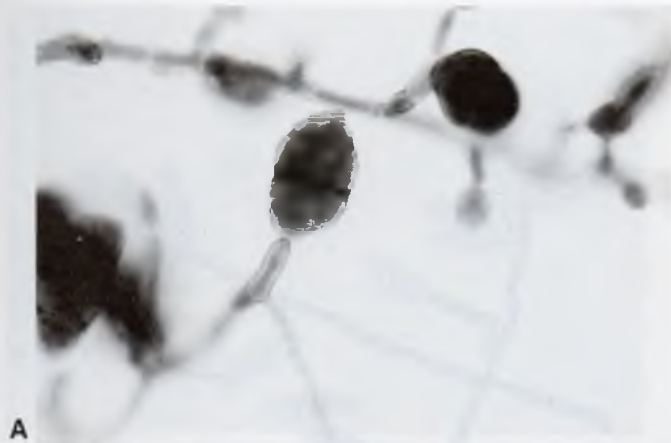
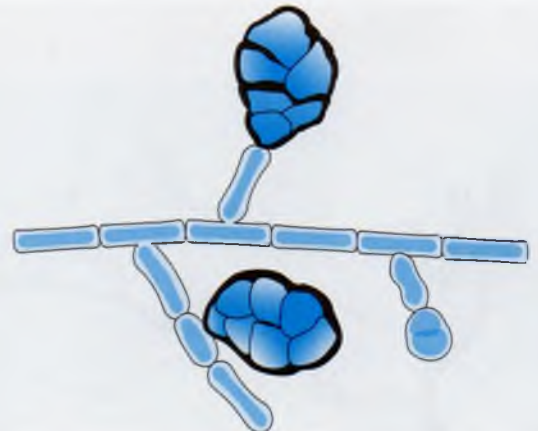


Figura 21-68 Microfotografía y esquema de macroconidios muriformes sostenidos de modo característico sobre el extremo de un conidióforo corto y recto, como una bala de algodón sobre un palo, característico de las especies de *Stemphylium*.



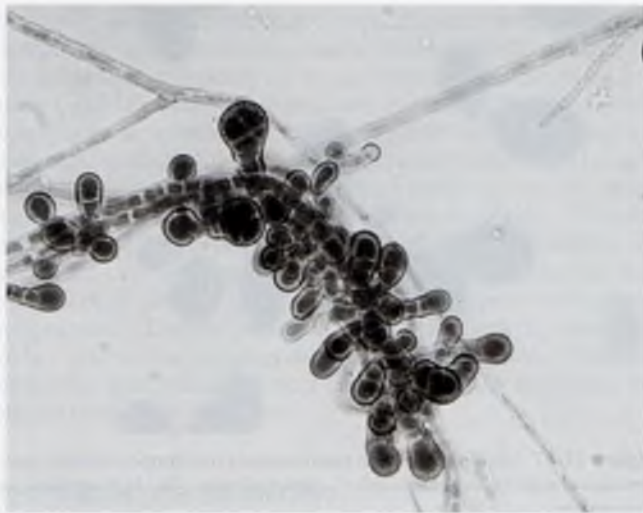


Figura 21-69 Microfotografía de macroconidios muriformes inmaduros y maduros de especies de *Epicoccum*, nacidos de modo característico en racimos laxos.

ESPECIES DE *NIGROSPORA*

Las colonias de las especies de *Nigrospora* presentan un crecimiento rápido y algodonoso; al principio de color blanco sucio, que vira al gris con la madurez cuando las hifas vegetativas se pigmentan. El reverso de la colonia también tiene pigmentación oscura. La microscopia revela conidios solitarios, grandes, subglobulosos, lisos y de color azabache y nacen de los extremos dilatados de conidióforos con forma de urna (fig. 21-73).

ESPECIES DE *PHOMA*

Las colonias de las especies de *Phoma* son beige a castaño oscuro, y se diseminan sobre la superficie con un margen externo indiferenciado. La consistencia es más lisa que algodonosa porque las hifas aéreas se desarrollan de modo deficiente. En la microscopia se observan estructuras saculares grandes y características, castaño oscuro a negras, de paredes lisas, coriáceas, denominadas **picnidios** (fig. 21-74). Dentro de los picnidios se originan gran cantidad de conidios unicelulares, cilíndricos,

fusiformes o esféricos, hialinos que se liberan a partir de una fractura de la pared celular. Como los picnidios pueden parecer similares a los cleistotecios producidos por las especies de *Aspergillus* y otros hongos teleomorfos, es necesario determinar si las esporas contenidas son conidios (como es el caso en las especies de *Phoma*) o son las ascosporas más grandes y con tinción más oscura características de los hongos ascosporógenos. Esta diferenciación puede hacerse en las preparaciones con cinta transparente mediante la presión suave de la cinta con la punta de un lápiz sobre las estructuras saculares desconocidas (visualizadas con el objetivo de campo de un microscopio) hasta que se rompa. La liberación de conidios hialinos unicelulares como se describió antes confirma la identificación de especies de *Phoma*.

ESPECIES DE *CHAETOMIUM*

Las colonias de las especies de *Chaetomium* al comienzo son blancas, pero pueden tornarse amarillas, amarillo verdosas o cobre en la madurez. En la microscopia pueden observarse **hifas especuladas** y grandes que se extienden a través de la pared de las estructuras saculares que constituyen los cleistotecios, dando el aspecto de patas de una araña que se extienden (fig. 21-75).

Agentes de cromomicosis y micetomas

La cromomicosis es el término original utilizado para describir una infección cutánea y subcutánea caracterizada por la formación de vegetaciones verrugosas, multicolores, elevadas, rugosas, que con más frecuencia se extienden sobre las superficies dorsales de los pies y de la parte inferior de la pierna, causada por un grupo de hongos dematiáceos de crecimiento lento que pertenecen a los géneros *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Cladosporium* y *Fonseceae*.⁷¹

El término **micetomas** se refiere a un cuadro en el que la infección se localiza principalmente en el tejido subcutáneo, donde forma un absceso o masa granulomatosa con la formación de trayectos fistulosos que alcanzan la superficie de la piel. A menudo, de estos trayectos se libera material purulento que contiene granos o gránulos de elementos micóticos y también se observa en cortes histológicos de la masa.

Estos agentes ingresan en la piel a través de heridas traumáticas y lesiones penetrantes. En los tejidos pueden observarse



Figura 21-70 Microfotografía y esquema de los macroconidios multicelulares, cilíndricos, de paredes lisas, característicos de las especies de *Bipolaris*.

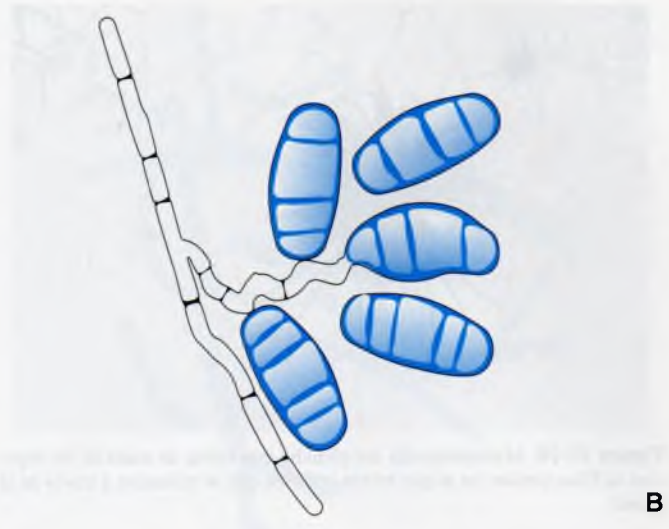


Figura 21-71 Microfotografía y esquema de macroconidios oscuros, multicelulares, divididos por tabiques transversales e inclinados debido al sobrecrecimiento de la célula central, característicos de las especies de *Curvularia*.

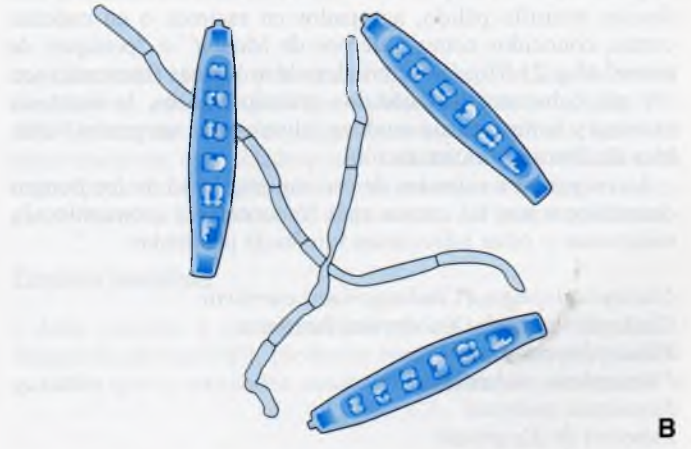
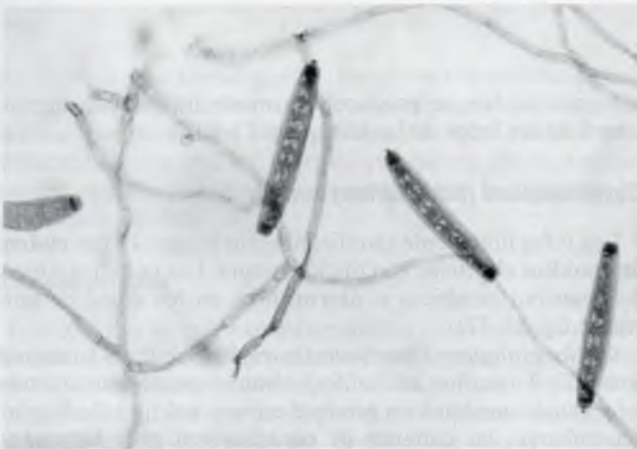


Figura 21-72 Microfotografía y esquema de macroconidios largos, con forma de lápiz de las especies de *Exserohilum*, caracterizados por una protuberancia similar a una tetina desde la célula hilar.

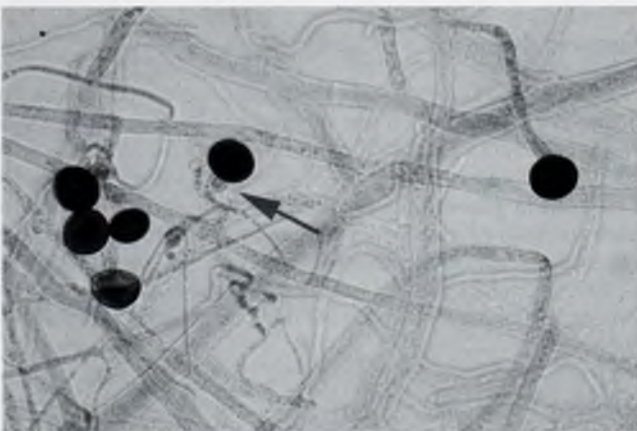


Figura 21-73 Microfotografía de la forma filamentosas de las especies de *Nigrospora*, que revela un fondo de hifas dematiáceas y conidios esféricos, negro azabache, cada uno sostenido por un conidióforo bulboso (flecha).

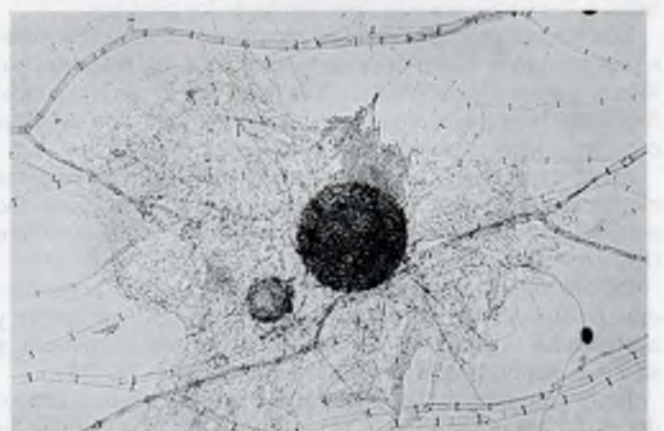


Figura 21-74 Microfotografía de un picnidio sacular grande de las especies de *Phoma*, con conidios hialinos diminutos dispersos observados sobre el fondo.



Figura 21-75 Microfotografía del picnidio con forma de araña de las especies de *Chaetomium*, en el que brotan conidios que se extienden a través de la pared.

las hifas dematiáceas. Más característica para el diagnóstico es la presencia de cuerpos levaduriformes muriformes, con una tinción amarillo pálido, agrupados en racimos o en cadenas cortas, conocidos como “cuerpos de Medlar” o “peniques de cobre” (fig. 21-76). Características histológicas frecuentes son los microabscesos, los nódulos granulomatosos, la acantosis extrema y la hiperplasia pseudoepiteliomatosa con grados variables de fibrosis y cicatrización.

Las siguientes especies de crecimiento lento de los hongos dematiáceos son las causas más frecuentes de cromomycosis, micetomas y otras infecciones micóticas profundas:

Cladophialophora (*Cladosporium*) *carrionii*

Cladophialophora (*Xylomyces*) *bantiana*

Phialophora *verrucosa*

Phialophora *richardsiae*

Fonsecaea *pedrosoi*

Especies de *Exophiala*

Especies de *Wangiella*

La distinción entre cada una de las especies enumeradas depende de la observación de diferencias importantes en el modo de conidiación, la estructura de los conidióforos y las fiálides, y la morfología y la disposición de los conidios.

Los hongos de este grupo que causan cromomycosis y micetomas producen cuatro tipos de esporulación: cladosporio, fiálófora, acroteca y rinocladiela. Las hifas que se observan en el fondo de la preparación microscópica en cada una de estas especies micóticas son oscuras y tabicadas.

En la esporulación tipo **cladosporio** se producen conidios elípticos y oscuros en cadenas largas y ramificadas, cada uno separado por una cicatriz delicada conocida como disyuntor (fig. 21-77).

La esporulación tipo **fiálófora** se caracteriza por la producción de fiálides que presentan forma de urna o son largas y adelgazadas. Dentro de las fiálides se producen conidios y salen en racimos pequeños de los extremos (fig. 21-78).

En la esporulación tipo **acroteca** se producen ramas simpodiales de conidióforos de los lados de las hifas, que simulan las puntas de una percha de chaquetas. De estos racimos nacen cadenas cortas de conidios (fig. 21-79). La esporulación tipo **rinocladiela** es una variante de la esporulación tipo acroteca en

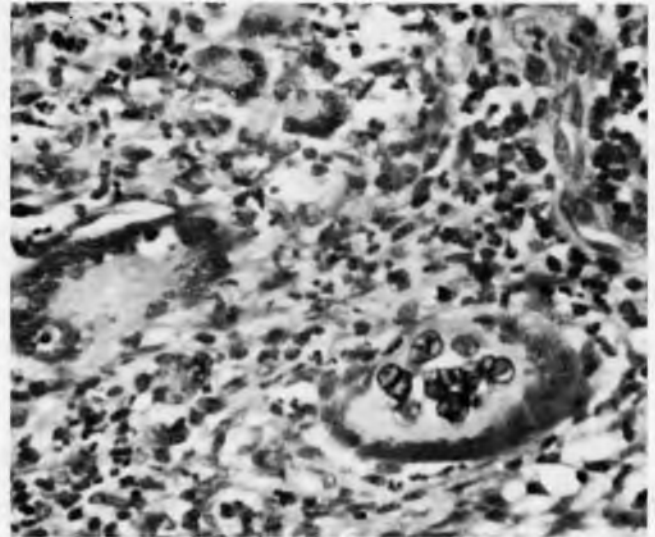


Figura 21-76 Microfotografía de un corte de tejido en un caso de cromomycosis subcutánea. Nótese la inclusión de diversos cuerpos escleróticos esféricos dentro de la célula gigante ubicada en el cuadrante inferior derecho en este campo (objetivo de inmersión, H-E).

que los conidios se producen de modo individual, directo y lateral de los lados de las hifas (fig. 21-80).

Cladophialophora (*Cladosporium*) *carrionii*

Las hifas libremente ramificadas dan lugar a largas **cadena de conidios elípticos**, con tinción oscura. Los conidios a menudo muestran cicatrices o **disyuntores** en los sitios de unión (véase fig. 21-77).

Cladophialophora bantiana (antes *Phialophora bantianum*, antes *Cladosporium trichoides*) es una especie estrechamente relacionada que también produce esporas del tipo cladosporio; sin embargo, las **cadena de conidios son muy largas**, con cerca de 30 células cada una y dan origen a conidios no pigmentados sin disyuntores. *Cladophialophora bantiana* **crece a 43 °C** y **no produce la licuefacción de la gelatina**, dos características adicionales por las que puede diferenciarse de *Cladophialophora carrionii* que carece de estas propiedades.

Phialophora *verrucosum*

Las fiálides con forma de botella o **urna**, que varían de 4 µm a 7 µm de longitud, nacen directamente de los lados de las hifas (véase fig. 21-78). La porción terminal de la fiálide es característicamente larga, lo que simula la parte superior de una **botella de bebida gaseosa**. Desde el interior de cada fiálide se producen conidios esféricos u ovales, con pigmentación amarilla y se agrega en racimos similares a balones en la apertura terminal. Estos conidios pueden soltarse y agregarse a lo largo de los lados de las fiálides y junto a las hifas adyacentes que los sostienen.

Phialophora *richardsiae*

A diferencia de las fiálides similares a botellas estrechas de *Phialophora verrucosum*, las de *Phialophora richardsiae* son planas y con **forma de plato** (fig. 21-81). *Phialophora richard-*

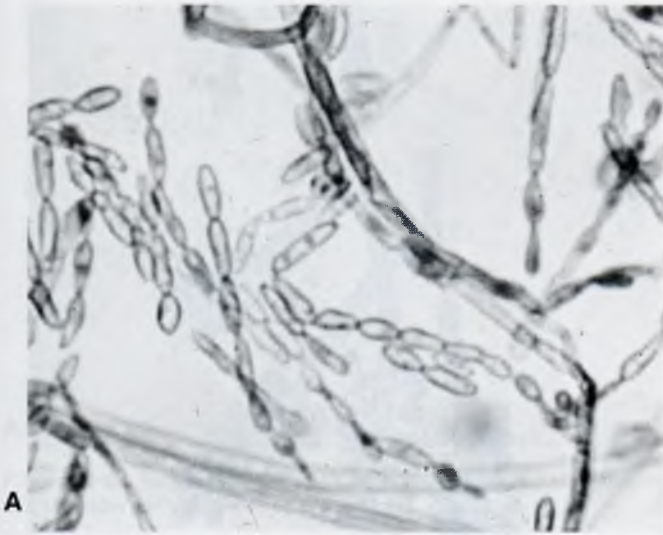
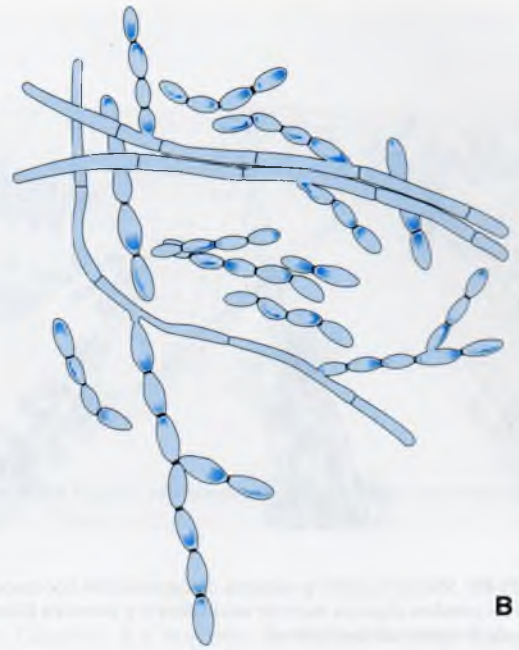


Figura 21-77 Microfotografía y esquema que ilustran la esporulación tipo cladosporio en que cadenas de conidios elípticos están conectadas por disyuntores con tinción oscura.



siae se aísla con frecuencia en los quistes feohifomicóticos. Forman conidios hialinos, esféricos o elípticos que nacen en **racimos compactos en los extremos de estas fiálides** y se mantienen unidos por un material mucinoso. Estos conidios también pueden desprenderse y agregarse a lo largo de los lados de las fiálides.

Fonsecaea pedrosoi

Los conidios se originan en denticulos cortos adheridos lateralmente a los lados de las células conidiógenas que de modo periódico se dilatan, se convierten en simpodiales y producen conidios adicionales que se disponen en cadenas cortas en los puntos de tabicación (véase fig. 21-79). Este tipo de esporulación se conoce como “**acroteca**”. Algunas cepas producen

conidios individuales y laterales a lo largo de los lados del conidióforo, en una disposición de **rinocladiela** (véase fig. 21-80). En ciertas cepas de *F. pedrosoi*, pueden mezclarse las esporulaciones tipos cladosporio y fialófora. Los conidios en una especie relacionada que se encuentra con menor frecuencia, *Fonsecaea compacta*, se disponen en racimos compactos.

Exophiala jeanselmei

Esta especie y la estrechamente relacionada “similar”, *Wangiella dermatitidis*, producen **conidióforos largos y adelgazados** que se extienden desde las hifas en ángulos rectos u

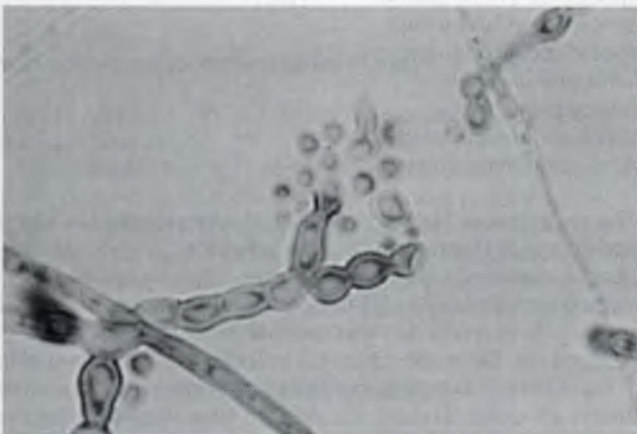


Figura 21-78 Microfotografía de la esporulación tipo fialófora, que muestra conidióforos cortos, con forma de urna, cada uno con un cuello estrecho similar a una botella de bebida gaseosa a partir del cual se producen conidios esféricos, dispuestos en racimos laxos en la punta.



Figura 21-79 Microfotografía de la esporulación tipo acroteca, en la cual se producen de modo simpodial cadenas cortas de conidios elípticos de los extremos de los conidióforos, una imagen que se asemeja a un perchero.

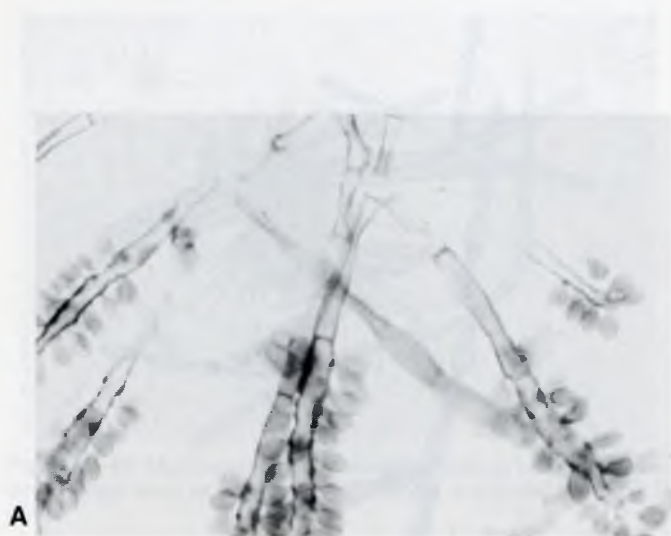
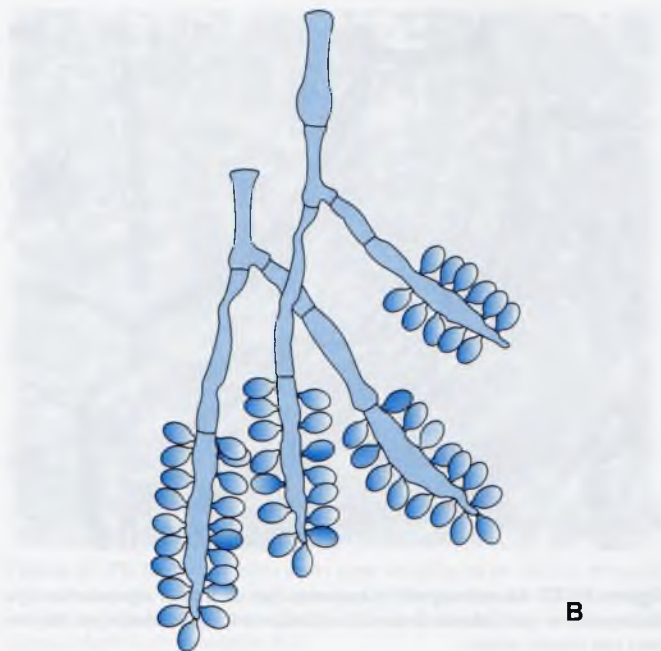


Figura 21-80 Microfotografía y esquema de esporulación tipo rinocladiela, en la cual los conidios elípticos nacen de modo directo y lateral en hileras compactas desde los lados del conidióforo.

obtusos. Las puntas de los conidióforos de *E. jeanselmei* pueden ser **filosas**, como resultado de una extensión implicada en la formación del anélido (fig. 21-82). Los **anillos o anélidos** pueden observarse debajo de la punta adelgazada de la fiálide cuando se ajusta el foco del microscopio y se disminuye la luz del condensador. Se observan cicatrices delicadas o anélidos en *E. jeanselmei* que están ausentes en *W. dermatitidis*. Kwon-Chung y Bennett han encontrado anélidos producidos por ambas especies y consideran que la especie *Wangiella* es una variante de las especies de *Exophiala*.¹⁵³ En los extremos de las fiálides pueden observarse racimos de conidios elípticos que se sueltan y se alinean hacia abajo a lo largo del curso de sus tallos largos. Las levaduras negras de las especies de *Phaeoannellomyces*, consideradas como sinanamorfa de las especies de *Exophiala*, se describirán más adelante en la sección de levaduras de esta presentación.



Figura 21-81 Microfotografía de conidióforos largos de *Phialophora richardsiae*, que muestran el extremo en forma de plato aplanado característico.



Las manifestaciones clínicas de feohifomicosis, incluso cromomicosis y micetomas, se presentan en el recuadro de correlación clínica 21-10.

Identificación por el laboratorio de las levaduras

Las especies de levadura monomórficas de importancia médica que suelen aislarse con mayor frecuencia en los laboratorios de microbiología clínica son:

Candida albicans
Especies de *Candida*
Cryptococcus neoformans
Especies de *Cryptococcus*
Candida (Torulopsis) glabrata
Especies de *Geotrichum*
Especies de *Trichosporon*
Especies de *Rhodotorula*
Especies de *Saccharomyces*
Hansenula anomala
Malassezia furfur
Aureobasidium pullulans
Phaeoannellomyces werneckii

En el diagrama 21-7 se proporciona una guía para la identificación por el laboratorio de estas levaduras.

Los aislamientos de levaduras más importantes en clínica crecen dentro de las 36 a 72 horas en cultivos en agar sangre de carnero y la mayoría de otros medios de aislamiento primario no selectivos. De modo típico las colonias son blancas o blanco amarillentas con una consistencia homogénea o pastosa (lámina en color 21-6A). Cuando en el cultivo se observan colonias sospechosas de ser una de las levaduras monomórficas, el primer paso es determinar si se producen pseudohifas y en ese caso efectuar una preparación para establecer el tubo germinal. Si el aislamiento produce tubos germinales con las

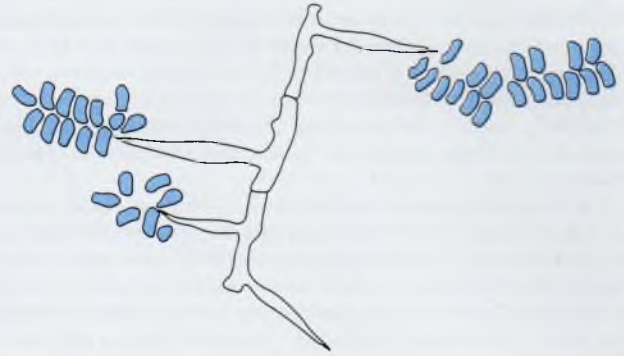


Figura 21-82 Microfotografía y esquema de especies de *Exophiala*, que muestran los conidióforos largos y adelgazados de cuyos extremos se liberan aneloconidios alargados que se disponen en racimos laxos.

condiciones de la prueba, puede informarse como identificación presuntiva de *Candida albicans* y no es necesario realizar otros estudios.

Tubo germinal

El tubo germinal se define como una extensión filamentososa de una levadura que tiene casi la mitad del ancho y tres a cuatro veces la longitud de la célula madre (fig. 21-83). El verdadero tubo germinal producido por *Candida albicans* no tiene estrechamientos en el cuello. En su estructura, el tubo germinal es una hifa verdadera y por consiguiente no tiene la característica de los estrechamientos de las pseudohifas. Una descripción del procedimiento para determinar la formación del tubo germinal se incluye en el recuadro 21-6. Como ya se mencionó, si hay presencia de tubos germinales puede hacerse la identificación presuntiva de *C. albicans*. Como no todas las cepas de *C. albicans* producen tubos germinales, deben realizarse cultivos en placa con agar harina de maíz. Al final del período de incubación, se realizan preparaciones en fresco para observar por microscopia la presencia de clamidosporas que, si están presentes, también permiten la identificación presuntiva de *Candida albicans* (fig. 21-84).

Preparaciones a partir del agar harina de maíz

En el recuadro 21-7 se describe la preparación a partir del agar harina de maíz.

Nuevamente, hay que seguir el diagrama 21-7. Si hay presencia de pseudohifas y blastoconidios puede hacerse la identificación presuntiva de especies de *Candida*. Los diferentes patrones de crecimiento en las preparaciones a partir del agar harina de maíz a menudo son lo suficientemente distintivos como para establecer una identificación presuntiva de la especie.

PATRONES DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS EN AGAR HARINA DE MAÍZ

Al observar el crecimiento de una preparación en agar harina de maíz se debe determinar al comienzo si hay presencia de pseudohifas. La observación de pseudohifas y blastoconidios permite ubicar el aislamiento desconocido como perteneciente al

género *Candida*. La mayoría de las infecciones humanas se deben a *Candida albicans*. Sin embargo, con el aumento de la inmunosupresión vinculada al trasplante de órganos y otras enfermedades relacionadas y la emergencia de patógenos micóticos oportunistas, no puede ignorarse el aislamiento de especies de *Candida* no *albicans* en cultivos puros o predominantes de sangre u otros sitios corporales estériles. Es necesario realizar una correlación clínica cuidadosa para determinar si se requieren otros estudios. Los patrones de crecimiento en el agar harina de maíz son útiles para hacer la identificación presuntiva y sirven como verificación del control de calidad en las identificaciones de especie proporcionadas por los biocódigos indicados por los sistemas automatizados y los equipos comerciales. Como ninguno de los patrones en agar harina de maíz es diagnóstico (con la excepción de la producción de clamidosporas por *Candida albicans*), es necesario realizar estudios de asimilación de hidratos de carbono u obtener los resultados provenientes de algunos de los sistemas comerciales de identificación de levaduras antes de informar una identificación definitiva.

Si no puede hacerse una identificación presuntiva por la observación de la preparación a partir del agar harina de maíz, resulta útil la realización de pruebas para la reducción de nitrato, la actividad de ureasa, la asimilación de inositol y la producción de ácido cafeico (mediante el empleo de placas con agar semillas de níger o negrilla, o la realización de la prueba con tiras de papel de filtro), además de los estudios de asimilación de hidratos de carbono, para diferenciar estas varias especies. Aunque estos estudios pueden lograrse por técnicas convencionales, en la actualidad se utilizan en la mayoría de los laboratorios equipos o sistemas comerciales para la identificación de levaduras. En los casos poco habituales en los que se requiera la referencia a los perfiles de asimilación de hidratos de carbono, el lector podrá consultar los cuadros 19-8, 19-9 y 19-10 de la quinta edición de este texto.

CHROMAGAR

El CHROMagar, un medio de cultivo cromogénico diferencial, se está utilizando en muchos laboratorios para facilitar el aislamiento y la identificación presuntiva de ciertas especies de levaduras importantes en la clínica, en especial *Candida albi-*

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-10 Feohifomicosis

Como se mencionó en el texto, las manifestaciones clínicas de la cromomicosis y los micetomas serán incluidas como subconjuntos bajo la categoría más amplia de feohifomicosis. Brandt y Warnock,³¹ de los Centers for Disease Control and Prevention, han publicado una revisión de la epidemiología, las manifestaciones clínicas y el tratamiento de las infecciones causadas por estos hongos dematiáceos. Estos autores mencionan especies de *Alternaria*, especies de *Bipolaris*, *Cladophialophora bantiana*, especies de *Curvularia*, especies de *Exophiala*, *Fonsecaea pedrosoi*, especies de *Madurella*, especies de *Phialophora*, *Scedosporium prolificans*, *Scytalidium dimidiatum* y *Wangiella dermatitidis* como los patógenos humanos más importantes dentro de este grupo. Describen estos hongos como ampliamente distribuidos en el ambiente y se los encuentra en el suelo, la madera y los detritos de los vegetales en descomposición.

Las infecciones cutáneas, subcutáneas y de la córnea asociadas con estos hongos dematiáceos aparecen en todo el mundo, pero son más frecuentes en los climas tropicales y subtropicales. La infección suele ser el resultado de la implantación traumática en la piel u otros tejidos. La mayoría de los casos progresivos suceden en individuos inmunocompetentes. Los autores también citan a los hongos dematiáceos como causas importantes de sinusitis invasora y sinusitis micótica alérgica, debidas por lo general a la inhalación de esporas infectantes. Aunque la infección cerebral es la forma más común de feohifomicosis sistémica, se informaron también otras formas profundas localizadas de la enfermedad, como artritis y endocarditis. La infección diseminada es rara, pero su incidencia está aumentando, en especial entre los individuos inmunodeprimidos. *Scedosporium prolificans* es el agente más frecuente implicado en la infección diseminada.

En la literatura médica reciente se han informado cientos de casos aislados de infecciones micóticas causadas por especies de hongos filamentosos dematiáceos saprófitos de crecimiento rápido. Aquí sólo se describen algunos ejemplos. Las tres manifestaciones clínicas más comunes de feohifomicosis causadas por hongos saprófitos son la queratitis, la sinusitis y la onicomycosis.

Como ejemplo reciente de queratitis, Wilhelmus y Jones²⁹⁵ informaron su experiencia del laboratorio con el aislamiento y la identificación de especies de *Curvularia* como causa de queratitis en un período de más de 30 años. Se analizaron las historias clínicas de 32 individuos y se determinó que el traumatismo, por lo general con plantas o suciedad, era el factor de riesgo en la mitad de los casos. La mayoría de las infecciones (69%) se produjeron durante los meses cálidos y húmedos del verano a lo largo de la Costa del Golfo estadounidense. Los signos de presentación variaron desde infiltrados leves y superficiales de la parte central de la córnea hasta la ulceración supurativa de la porción periférica de la córnea.

La sinusitis también es un sitio frecuente de infección por hongos dematiáceos. De la bibliografía más antigua, Adam y cols.² informaron nueve casos de sinusitis que se presentó como rinitis alérgica o poliposis nasal, causados por especies de *Bipolaris* y de *Exserohilum*. Más recientemente, Fernandez y cols.⁸² informaron los resultados derivados de una búsqueda de la literatura para las infecciones pediátricas por *Curvularia* entre los años 1968 y 1998. De 16 casos identificados, 13 presentaron sinusitis alérgica, una forma singular de sinusitis en la que el antecedente de asma o pólipos nasales es una causa predisponente. Los pacientes en esta revisión solían ser adolescentes inmunocompetentes que tenían una duración prolongada de síntomas, por lo general de más de 3 semanas. Para el tratamiento de la sinusitis invasora crónica se recomendaron los desbridamientos quirúrgicos extensos combinados con tratamiento con anfotericina B.

La onicomycosis causada por especies de *Alternaria* se está informando cada vez con mayor frecuencia, en especial en los pacientes con inmunodeficiencias. Romano y cols.²³⁶ informaron nueve casos de onicomycosis causados por *Alternaria alternata* observados en Toscana, Italia, en el período 1985-1999. El diagnóstico micológico se realizó sobre la base del examen microscópico directo repetido y los cultivos. En la mayoría de los casos las manifestaciones clínicas primarias fueron distrofia e hiperqueratosis subungular distal de una o dos uñas de los pies o las manos. Siete casos se trataron con itraconazol oral; este tratamiento tuvo éxito en seis casos.

Varios hongos dematiáceos son neurotrópicos, como *Cladophialophora bantiana*, *Ramichloridium mackenziei* y *Wangiella dermatitidis*. Aunque han aparecido casos en personas inmunodeprimidas, la feohifomicosis cerebral es más frecuente en los individuos inmunocompetentes que pueden tener o no factores de riesgo evidentes.⁶³ Revankar y cols.²²⁹ realizaron la revisión de 101 casos de feohifomicosis primaria del sistema nervioso central comprobados por cultivo publicados en la literatura inglesa entre 1966 y 2002. Estos autores encontraron que la especie aislada con frecuencia era *Cladophialophora bantiana*. Las tasas de mortalidad eran altas entre estos casos publicados, sin tener en cuenta el estado inmunitario. El tratamiento no se ha estandarizado, aunque la combinación de anfotericina B, flucitosina e itraconazol, junto con un enfoque médico y quirúrgico enérgico, puede mejorar las tasas de supervivencia.

Cromomicosis

Wortman³⁰² informó un caso de cromomicosis causado en forma simultánea por *Fonsecaea pedrosoi* y *Nocardia brasiliensis*, como complicación de una lesión traumática penetrante. La cromomicosis se extiende en las regiones tropicales de América del Sur y se observa con mayor frecuencia en varones dedicados a trabajos de granjas y plantaciones. Silva y cols.²⁵⁶ realizaron la revisión de 325 casos informados en la región de desagüe del río Amazonas de Brasil. Los datos obtenidos revelaron un espectro de la media de la edad de los individuos afectados entre 41 y 70 años, el 93.2% de los cuales eran varones. Los obreros agrícolas comprendieron el 86.1% del total. Se encontraron lesiones en los miembros inferiores (pies y piernas) en el 80.7%. En el 24% de los pacientes (78 casos), el agente etiológico se aisló e identificó por medio de los cultivos. *Fonsecaea pedrosoi* se encontró en 77 casos y *Phialophora verrucosa* en sólo un paciente.

Minotto y cols.¹⁸⁴ informaron resultados similares en un estudio de 100 pacientes residentes de Rio Grande do Sul, Brasil. De nuevo, hubo un predominio de pacientes masculinos (4:1); la mayoría eran granjeros de raza blanca con una edad que oscilaba entre 50 y 59 años. Lo más común era la presencia de lesiones verrugosas graves que aparecían en los miembros inferiores, con una media del tiempo entre la aparición de la enfermedad y el diagnóstico médico de 14 años. En el 16% de los casos la enfermedad se asoció con heridas por espinas. El análisis estadístico mostró recrudescimiento de la enfermedad en el 43% de los pacientes a pesar del tratamiento. *Fonsecaea pedrosoi* se aisló en el 96% de los casos; *Phialophora verrucosa*, en el 4%.

Micetomas

Micetomas se refiere a infecciones subcutáneas en las que el tejido está muy edematizado, con formación de fistulas que penetran profundamente a través de la superficie de la piel y segregan material purulento. Los pies (pie de Madura) y las manos son las partes más afectadas, se tornan notablemente tumefactos y deformados en las infecciones graves. Los micetomas tienen dos causas principales: bacterias que pertenecen al orden *Actinomycetales* (*Actinomyces*, *Nocardia* y especies de *Streptomyces*) y hongos verdaderos (micetomas eumicóticos), sobre todo el hongo dematiáceo *Exophiala jeanselmei* y el hongo filamentoso hialino *Pseudallescheria boydii* encontrados en casos esporádicos en los Estados Unidos.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-10 Feohifomicosis (cont.)

Los micetomas se ven con mayor frecuencia en otras partes del mundo, en especial en el oeste y el este de África. Es habitual un antecedente de lesión. En la mayoría de los casos están afectados los miembros inferiores y, con menor frecuencia, los superiores y otros sitios, como las regiones glútea, lumbar, submandibular y la cara.

La descripción realizada por Thammayya y cols.²⁷³ hace muchos años sobre la presentación de un micetoma de un paciente que también vivió en la India sigue siendo clásica para la enfermedad: "La parte inferior de la pierna derecha y el pie estaban irregularmente edematizados, firmes, indoloros y presentaban muchos nódulos pequeños y trayectos fistulosos sobre la tumefacción. Estaban afectados el extremo distal de la tibia y los huesos del pie. La secreción de las fistulas y los nódulos contenían gránulos irregulares, de 0.5-2 mm, castaño negruzcos, blandos, vermiculares, en forma de media luna y estaban compuestos sobre todo por células esféricas hinchadas, de 4-8 μ m de diámetro y escasas hifas, de 2.5-3 μ m de diámetro".

Una incidencia relativamente alta también se ha encontrado en Japón. Murayama y cols.¹⁸⁷ informaron un caso de micetoma que afectó la parte inferior de la pierna de una mujer de 34 años con lupus eritematoso sistémico. En una revisión de la literatura acompañante sobre infecciones por *Exophiala jeikei* en Japón, estos autores encontraron referencia a 54 casos (24 en hombres y 30 en mujeres). Cincuenta de estos casos (21 hombres y 29 mujeres, un cambio interesante en la relación hombre:mujer) estaban causados por hongos dematiáceos. Más de la mitad de estos pacientes tenían enfermedades subyacentes y los sitios de las lesiones eran sobre todo las extremidades.

La enfermedad sistémica suele ocurrir en huéspedes inmunodeprimidos. Por lo general, estas infecciones comienzan en los pulmones tras la inhalación de conidios que conduce a infecciones invasoras que pueden diseminarse a órganos distales. Las infecciones invasoras, sistémicas y diseminadas causadas por muchas especies de hongos feohifomicóticos mencionados por Rippon²³⁴ suelen afectar a pacientes inmunosuprimidos, con sitios primarios de infección en los pulmones, los senos paranasales o los sitios de traumatismo de la piel. También se incluyen casos de endocarditis como consecuencia de la implantación durante la cirugía o la inyección intravenosa de materiales contaminados en los drogadictos.

cans. Para separar las especies de levaduras se emplean la observación de la morfología de la colonia y los patrones distintivos de color, en especial cuando se observan en cultivos mixtos. *Candida albicans* forma colonias características amarillo verdosas a azul verdosas.

Ainscough y Kibbler³ evaluaron la rentabilidad y la ventaja de tiempo de CHROMagar en comparación con el agar dextrosa de Sabouraud. Se observó una sensibilidad global del 95,2% en el estudio de 21 cepas de levaduras aisladas en 298 muestras clínicas de pacientes con neutropenia y SIDA. En este estudio se encontró que CHROMagar es 100% sensible y 100% específico para *C. albicans*. Proporcionó el enfoque más económi-

co y que insume menos tiempo para el cultivo inicial y la identificación presuntiva de los aislamientos de levaduras. Los autores también recomiendan la inoculación directa para los cultivos de sangre cuando las células de levadura se observan en la microscopía.

CANDIDA ALBICANS

Dos patrones de crecimiento en el agar harina de maíz son útiles para identificar *Candida albicans*: 1) producción de clamidosporas, 2) blastoconidios que se disponen en los racimos densos distribuidos de modo uniforme a lo largo de las pseudohifas (fig. 21-84) o ambos. La revisión de estos patrones en agar harina de maíz es muy útil para la identificación de cepas que no producen tubos germinales.

El crecimiento de colonias de *Candida albicans* también puede llevar a una identificación presuntiva. Los bordes de las colonias a menudo presentan espículas radiadas en los cultivos más viejos (lámina en color 21-6B).

Si la prueba del tubo germinal es negativa y no se observan clamidosporas en las preparaciones en fresco del agar harina de maíz, es probable que se haya aislado una levadura distinta de *Candida albicans*. Aunque alrededor del 5% de *C. albicans* no produce tubos germinales, sería bastante raro tener una cepa



Figura 21-83 Microfotografía de un tubo germinal, característico de *Candida albicans* (objetivo de inmersión).

Recuadro 21-6 Procedimiento: prueba del tubo germinal

1. Se suspende en un tubo de ensayo que contiene 0,5 mL de plasma o suero de conejo o humano una porción pequeña de una colonia aislada en la levadura por probar.
2. El tubo de ensayo se incuba a 35 °C por no más de 2 horas.
3. Una gota de la suspensión en suero de la levadura se coloca sobre un portaobjetos, se recubre con un cubreobjetos y se examina con el microscopio para determinar la presencia de tubos germinales (fig. 21-83).
4. La prueba no es válida si se examina después de 2 horas.

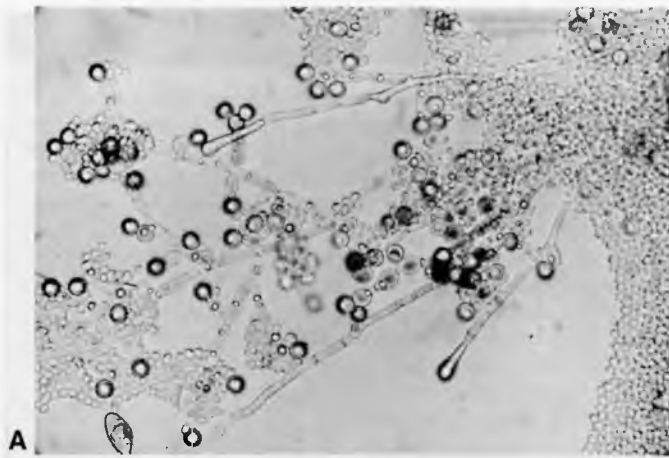


Figura 21-84 Microfotografías de preparaciones a partir del agar harina de maíz de *Candida albicans*, que revelan la producción de clamidosporas (izquierda) y agrupación regular de blastoconidios a lo largo de las hifas (derecha).

que tampoco produce clamidosporas. Siguiendo el diagrama 21-7, el paso siguiente es observar los patrones de crecimiento en el agar harina de maíz para realizar una identificación presuntiva de otra especie de *Candida*. Para reiterar, es importante revisar los patrones de crecimiento en el agar harina de maíz como una verificación del control de calidad en las identificaciones de la especie proporcionadas por sistemas automatizados y equipos comerciales, ya que éstos no siempre son correctos. Con este fin, a continuación se describen los patrones clásicos para las especies de *Candida* no *albicans* aisladas con mayor frecuencia.

CANDIDA TROPICALIS

Candida tropicalis produce pseudohifas con blastoconidios que nacen de modo individual o en racimos irregulares pequeños a lo largo de las pseudohifas en los puntos de estrechamiento (fig. 21-85). Como este patrón no es específico, son necesarios los estudios de asimilación de hidratos de carbono o la identificación a través del uso de alguno de los sistemas de identificación de levaduras.



Figura 21-85 Microfotografía de una preparación a partir del agar harina de maíz de *Candida tropicalis*, que muestra la producción leve de conidios que se disponen de modo irregular a lo largo de las hifas.

CANDIDA PARAPSILOSIS

Lo importante para la identificación presuntiva de *C. parapsilosis* en las preparaciones de agar harina de maíz es la observación de áreas focales múltiples de crecimiento satélite adyacente a las líneas de siembra, que forman lo que familiarmente se ha descrito como patrones de “artemisia”, de “cerillas entrecruzadas” o de “arañas” (fig. 21-86). Una vez observado, este patrón se comparará con los códigos de identificación de los sistemas comerciales.

CANDIDA KEFYR (PSEUDOTROPICALIS)

Lo fundamental es la observación de abundantes blastoconidios alargados o rectangulares que forman racimos laxos entrecruzados característicos que se asemejan a la disposición de “leños en el arroyo” (fig. 21-87). *C. krusei* también produce un patrón similar, salvo que los puntos de origen están agrupados de modo secuencial como ramas de un árbol. Para diferenciar estas dos especies pueden ser necesarios los estudios de asimilación de hidratos de carbono.

OTRAS ESPECIES PATÓGENAS EMERGENTES DE CANDIDA

Es importante la identificación definitiva de las especies de *Candida* no *albicans* para detectar las cepas patógenas emer-

Recuadro 21-7 Procedimiento para la siembra del agar harina de maíz con Tween 80

1. Realizar tres cortes paralelos de 0,5 cm o 1 cm, separados en la superficie del agar harina de maíz, sosteniendo el ansa recta de inoculación en un ángulo de 45°.
2. Colocar un cubreobjetos en la superficie del agar, que cubra una porción de las estrias sembradas.
3. Incubar las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 horas en una cámara cerrada y húmeda. Al final del período de incubación, examinar con el microscopio a través del cubreobjetos y observar el patrón de crecimiento para hacer una identificación presuntiva.



Figura 21-86 Microfotografía de una preparación a partir del agar harina de maíz de *Candida parapsilosis*, que muestra la formación característica de colonias satélites con formas de araña a lo largo de la línea de siembra.



Figura 21-87 Microfotografía de una preparación a partir del agar harina de maíz que ilustra la disposición de "leños en el arroyo" característica de los blastoconidios largos de *Candida kefyr*.

gentes, en especial las que han adquirido resistencia a los fármacos antimicóticos.²⁰⁰ *Candida krusei* es resistente al ketocozazol.²⁹⁹ *Candida dubliniensis*, con un fenotipo estrechamente relacionado con *Candida albicans*, en particular las cepas aisladas en pacientes con muguet orofaríngeo, ha adquirido resistencia inducida al fluconazol.¹⁷⁴ Estas cepas pueden identificarse en el laboratorio mediante la demostración de las siguientes características:²⁶⁷

- Incapacidad para crecer a 45 °C.
- Aspecto de colonias rugosas con "pies" en el agar semillas de niger (*C. albicans* produce colonias de bordes lisos).
- Producción de pseudohifas y clamidosporas en el agar semillas de niger (*C. albicans* sólo produce blastoconidios redondos u ovales²⁶² (véase fig. 21-88)).
- Presencia de colonias azul oscuro en CHROMagar *Candida*.
- Perfiles de asimilación de hidratos de carbono en los sistemas de identificación de levaduras API 20C AUX o Vitek. *C. dubliniensis*, a diferencia de *C. albicans*, no puede utilizar la D-xilosa, la trehalosa ni la metil-D-glucosidasa.⁸⁹
- Sondas de DNA específicas de especie.⁷²

En ciertos linajes de *Candida lusitanae* ha surgido resistencia esporádica a la anfotericina B a través de un mecanismo del cambio de colonias antes sensibles.³⁰⁴ De nuevo, es importante identificar estas cepas patógenas emergentes en el laboratorio clínico para evitar la administración empírica de agentes antimicóticos a los cuales presentan resistencia.

ESPECIES DE *CANDIDA* Y CANDIDIASIS

De los datos obtenidos de 180 hospitales estadounidenses que participan en el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intrahospitalarias (National Nosocomial Infections Surveillance, NNIS) se informaron 27 200 aislamientos micóticos asociados con infecciones intrahospitalarias en los Estados Unidos entre enero de 1980 y abril de 1990. De éstos, las especies de *Candida* determinaron 19 621 (72,1%).¹³⁰ Los factores predisponentes para esta frecuencia elevada de infecciones por levaduras son:

- Aumento de la utilización de quimioterapia y de trasplantes de médula ósea y de otros órganos, con inmunosupresión intensa acompañante.
- Internaciones prolongadas en hospitales.
- Cateterismo vascular.
- Administración prolongada de antimicrobianos de amplio espectro.
- Uso profiláctico extenso de antimicóticos.

En una revisión de pacientes con candidiasis intrahospitalaria, Wright y Wenzel³⁰³ citan las quemaduras, la asistencia mecánica respiratoria, la colonización por especies de *Candida* y las transfusiones repetidas como factores de riesgo adicionales. Estos autores mencionan un estudio nacional de participación de hospitales de 1996, dirigido bajo el programa de Vigilancia y Control de Patógenos de Importancia Epidemiológica (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance, SCOPE) en el que las especies de *Candida* figuran detrás de las especies de *Staphylococcus* como la causa más frecuente de septicemia en los pacientes hospitalizados.



Figura 21-88 Microfotografía de una muestra de esputo con tinción de Gram que muestra pseudohifas y la brotación de blastoconidios característicos de las especies de *Candida* (objetivo de inmersión).

Los pacientes con cáncer, en especial los que sufren leucemia y trastornos linfoproliferativos en quienes los recuentos de leucocitos en sangre periférica están disminuidos, también tienen un riesgo mayor. Kalin y Petrini¹³³ citan un aumento de la mortalidad en los pacientes con leucemia causada por infecciones micóticas desde un mínimo del 5% antes de la era antibiótica hasta una frecuencia actual del 40%. Los agentes primarios aislados con mayor frecuencia fueron las especies de *Candida*. No obstante, la edad avanzada, aunque no directamente relacionada con las infecciones por levaduras, contribuye al aumento de la morbilidad. Por ejemplo, la candidiasis mucocutánea en los ancianos, incluso el muguet y la estomatitis por la dentadura postiza, se asocia con irritación mecánica local de la mucosa bucal.¹¹⁸

En el extremo opuesto del espectro de la edad, los recién nacidos extremadamente enfermos también tienen un riesgo alto de adquirir infecciones intrahospitalarias por levaduras, con afectación particular del sistema nervioso central. Otras causas predisponentes para las infecciones por levaduras incluyen las alteraciones de las defensas del huésped debidas a disminuciones en las reservas de proteínas o de la producción de anticuerpos, supresión de la flora bacteriana normal, embarazo y diabetes mellitus u otras enfermedades metabólicas crónicas.

En los casos en que un aislamiento clínico es de gran importancia o cuando no puede hacerse la identificación exacta de la especie por las características fenotípicas, se dispone de técnicas moleculares que utilizan sondas de DNA específicas de especie a través de los Laboratorios de Salud Pública estadounidenses y los Centers for Disease Control and Prevention que proporcionan la diferenciación rápida e inequívoca de estas diversas especies de *Candida*.

La estandarización de las pruebas de sensibilidad in vitro a los antimicóticos (antifungigramas) en gran parte por las investigaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (antes, National Committee for Clinical Standards) de los Estados Unidos, ha hecho posible determinar el grado de resistencia de los aislamientos de levaduras.^{220,230} Las aplicaciones de la prueba E también permitieron que los laboratorios clínicos determinen los perfiles de sensibilidad a determinados antimicóticos.^{218,221} Las manifestaciones clínicas importantes de la candidiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 21-11 (*Candida albicans*) y en el recuadro de correlación clínica 21-12 (especies de *Candida* no *albicans*).

Especies que producen hifas verdaderas

Las colonias de las especies de *Geotrichum* y de *Trichosporon* son blanco grisáceas y al comienzo presentan un aspecto levaduriforme, pero enseguida forman una superficie delicada y sedosa como hifas verdaderas y artroconidios en la madurez. En las preparaciones de agar harina de maíz, las especies de *Geotrichum* y *Trichosporon* producen hifas verdaderas que se segmentan y se rompen para formar artroconidios. Las especies de *Geotrichum* pueden diferenciarse porque producen un solo tubo germinal en un ángulo del artroconidio, que simula un palo de jockey (fig. 21-89). Por el contrario, en las especies de *Trichosporon* típicamente los blastoconidios se forman de ambos ángulos del artroconidio y simulan "orejas de conejo" (fig. 21-90). En los casos en que estas características de identificación no sean evidentes en el agar harina de maíz, casi todas las cepas de las especies de *Trichosporon* son productoras de ureasa y dan un resultado positivo en esta prueba, mientras que todas las especies de *Geotrichum* son negativas.

Las manifestaciones clínicas de la tricosporonosis y la geotricosis se presentan en la recuadro de correlación clínica 21-13.

Especies que no producen hifas verdaderas

Los aislamientos que no forman hifas en el agar harina de maíz incluyen especies de *Cryptococcus*, *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata* y especies de *Rhodotorula* y de *Saccharomyces*. Las levaduras de las especies de *Cryptococcus* son esféricas, con un tamaño variable y están ampliamente separadas por el material capsular. Las levaduras de *Candida glabrata* son más pequeñas, de tamaño regular y tienden a disponerse en racimos compactos. A continuación se describen con mayor detalle los géneros característicos junto con los rasgos diferenciales de otros géneros aislados con menor frecuencia, como *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Hansenula* y *Malassezia*. Cepas ocasionales de las especies de *Candida* pueden producir sólo pseudohifas rudimentarias o ninguna; por consiguiente, en toda colonia en la que se sospecha alguna especie de *Candida* deben hacerse preparaciones del agar harina de maíz.

CRYPTOCOCOSIS Y CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en las muestras clínicas siempre debe considerarse importante hasta demostrar lo contrario. Hasta el comienzo de la epidemia de SIDA en la década de 1980, la incidencia de la criptococosis en los Estados Unidos era baja (alrededor de 300 casos por año). La mayoría de estos casos tempranos sucedía en pacientes con inmunodeficiencias celulares, en especial en individuos con enfermedad de Hodgkin.¹⁴⁹ En la actualidad, *C. neoformans* es uno de un grupo selecto de microorganismos que causan infección en los pacientes con SIDA y se lo encuentra en el 6-13% de los casos, según el lugar de residencia.¹⁸⁶ La incidencia de la criptococosis en los pacientes con SIDA llega al 15% o más en algunos sitios de África subsahariana.¹⁸³

Cryptococcus neoformans es el criptococo que causa la mayoría de las infecciones humanas. Esta especie es una levadura encapsulada cuyo hábitat natural es el suelo que, al estar contaminado con deyecciones de paloma, pollo o pavo que producen un pH alcalino y aumentan la concentración de nitrógeno, favorece la multiplicación del microorganismo. Las levaduras pueden ser transportadas por el aire en las nubes de polvo creadas en las tareas de barrido, limpieza y excavaciones. Por consiguiente, las personas que trabajan en granjas de pollos, los encargados de parques de la ciudad frecuentados por estorninos y otros pájaros y los espeleólogos que pueden explorar cuevas infestadas por murciélagos tienen un riesgo especial de adquirir la infección. Se aconseja a las personas inmunosuprimidas, en especial los que presentan SIDA, que no participen en estas actividades. En los casos en que no sea evidente la exposición inmediata, el comienzo de la criptococosis aguda puede representar la revelación de infecciones latentes.

La síntesis de la cápsula es un determinante de virulencia fundamental, ya que proporciona un mecanismo de adherencia a los revestimientos de la mucosa y protección de la fagocitosis, tanto durante el tránsito a través del torrente circulatorio como en los sitios de infección.¹¹³ *Cryptococcus neoformans* tiene un tropismo particular por el sistema nervioso central y en muchos casos la primera manifestación clínica es la meningitis. La producción del pigmento melanina también es un determinante de la virulencia, ya que protege a la levadura contra el daño inducido por los oxidantes. La producción de proteinasas y manoproteínas y la liberación de metabolitos poliólicos

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-11 Candidiasis (*Candida albicans*)

La causa más frecuente de candidiasis humana es *Candida albicans*. Los principales factores de virulencia que contribuyen al aumento en su capacidad de infectar son la germinación rápida en los tejidos después de diseminarse por el torrente circulatorio; la producción de proteasas, las adhesinas para las proteínas de la matriz extracelular, los receptores de unión al complemento y los cambios fenotípicos.^{52,200} McCullough¹⁶ y Pfaller²¹⁷ realizaron una revisión de la historia; la taxonomía, la epidemiología y los factores de virulencia de *Candida albicans*. Las principales manifestaciones clínicas de *Candida albicans* son de tres tipos: mucocutánea, cutánea y sistémica.

Candidiasis mucocutánea

La candidiasis de las mucosas afecta sobre todo la cavidad bucal y el conducto vaginal. La candidiasis bucal, una enfermedad conocida como *muguet*, es la manifestación clínica más frecuente de candidiasis en los seres humanos. La infección se manifiesta como placas blancas en la mucosa bucal y la lengua,²⁰ que, en las infecciones más graves, pueden unirse en una membrana. Estas se adhieren firmemente al epitelio y cuando se las retira revelan una base enrojecida y edematosa. El diagnóstico puede hacerse mediante la observación de las pseudohifas y los blastoconidios característicos en la microscopia de las preparaciones teñidas con Gram de frotis del exudado (fig. 21-88). Entre las causas predisponentes figuran la alteración de la flora normal después de la antibióticoterapia prolongada, el pH bajo de las secreciones salivales en los recién nacidos, la hipertrofia de las papilas de la lengua ("lengua negra vellosa") y la glositis crónica.²⁵ La candidiasis bucal se reconoce ahora como una enfermedad que define al SIDA y se observa casi en el 100% de estos pacientes.²⁷⁰

Aunque clásicamente está causada por *Candida albicans*, la especie estrechamente relacionada, *Candida dubliniensis*, ha surgido hace poco como el agente más problemático en muchos casos, lo que expresa la resistencia inducida a ciertos agentes antimicóticos derivados de los azoles, en especial el fluconazol.^{174,267} Por consiguiente, puede estar indicada la identificación por el laboratorio de *C. dubliniensis* para los casos de muguet bucal antes de administrar el tratamiento empírico con un antimicótico azólico.

Las mucosas de la tráquea y los bronquios, y casi cualquier de parte del tubo digestivo, pueden sufrir infecciones por *Candida*, que en su mayoría representan propagación de la enfermedad orofaríngea. Se informaron casos de esofagitis, gastritis, enteritis y enfermedad perianal, si bien la unión gastroesofágica es un sitio frecuente de infecciones por *Candida*. Un ambiente con pH bajo puede explicar esta predisposición, en especial en los pacientes con procesos malignos de la sangre. La disfagia, el dolor retroesternal, la hemorragia gastrointestinal alta y las náuseas son síntomas asociados. Los candidiasis esofágica también puede suceder como una propagación orofaríngea, sobre todo en los recién nacidos.

Candidiasis cutánea

Las infecciones de la piel suelen afectar las partes húmedas e intertriginosas, como las zonas interdigitales de las manos y los pies, debajo de las mamas, las axilas y los pliegues de la ingle. La infección de las uñas se conoce como onicomicosis, o paroniquia si están afectados los pliegues de la piel que encierran las uñas. La dermatitis del pañal de los recién nacidos también es una manifestación frecuente. La candidiasis mucocutánea crónica es una infección oportunista de la piel y las mucosas, asociada con varios trastornos genéticos que afectan la función de los leucocitos o del sistema endocrino. La displasia tímica, con hipogammaglobulinemia o sin ella, el hipoparatiroidismo y la enfermedad granulomatosa crónica, esta última que abarca la deficiencia de mieloperoxidasa de los fagocitos e impide la muerte de las levaduras después de la fagocitosis, figuran entre las enfermedades predisponentes presentadas por Rippon.²³⁴

Candidiasis diseminada

La candidiasis sistémica es una enfermedad relativamente rara, que suele suceder como un episodio terminal en los pacientes con neoplasias debilitantes (crisis blásticas de leucemias y linfomas, por ejemplo), enfermedades inmunosupresoras y luego del trasplante de órganos, en especial durante el síndrome de rechazo agudo. Abi-Said¹ realizó una revisión de las enfermedades de base para la diseminación hemática de la candidiasis. A continuación se describen los órganos en los cuales puede producirse la siembra tras la diseminación de las especies de *Candida* a partir de los sitios primarios de infección mucocutánea.

Candidiasis del aparato urinario

Esta presentación es relativamente rara y se manifiesta como cistitis, causada con mayor frecuencia por *Torulopsis* (*Candida*) *glabrata* y pielonefritis, ya sea por vía ascendente a partir de la infección vesical o por diseminación hemática desde un sitio primario distante de infección. Pueden verse agregados de pseudohifas y blastoconidios en la histología de los glomérulos, probablemente en un microambiente que favorece el crecimiento debido a la disminución del pH por el intercambio de iones de Na⁺ e H⁺. En la actualidad, *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata* es el segundo o tercer agente causal de infecciones superficiales (bucal, esofágica, vaginal o urinaria) o sistémicas candidiásicas, como lo indican Fidel y cols.⁸¹ La emergencia de *C. glabrata* como patógeno intrahospitalario puede relacionarse con su resistencia a los azoles que se han usado de manera eficaz en el tratamiento de otras infecciones por levaduras. Zmierzak y cols.³⁰⁷ informan un caso de artritis crónica y recurrente por *C. glabrata* que afectó en un comienzo el tobillo derecho. Un año después del tratamiento exitoso, la infección recidivó en la rodilla izquierda; se consideró que esto representaba la diseminación hemática.

Endocarditis

Esta infección se ve más a menudo en personas con valvulopatías preexistentes, en especial tras episodios de septicemia asociados con el uso de catéteres permanentes, infusiones intravenosas prolongadas y abuso de drogas intravenosas. Hogevis y Alestigt¹²² presentaron siete casos de endocarditis en el oeste de Suecia. En cuatro casos las infecciones se asociaron con la colocación de prótesis valvulares; en tres casos estaban afectadas las válvulas propias. Debido a la alta mortalidad, los autores hacen hincapié en la necesidad del diagnóstico temprano, el tratamiento antimicótico inmediato y la cirugía de urgencia si la ecografía revela una falta de respuesta. La septicemia por *Candida* también puede observarse en los pacientes que reciben antibióticos y corticosteroides por períodos muy prolongados. Aunque la mayoría de las cepas de *C. albicans* pueden aislarse en los cultivos de sangre realizados en los frascos para hemocultivos comerciales, Marcelis y cols.¹⁷³ informaron que los medios de cultivo que contienen resina (específicamente, en su estudio utilizaron BACTEC PLUS que tiene un alto contenido en resina) puede reforzar la recuperación, en especial en pacientes que reciben antibióticos.

Meningitis por *Candida*

Esta enfermedad rara es secundaria a la diseminación a partir de los sitios de infección en los aparatos gastrointestinal o respiratorio, émbolos sépticos liberados de las válvulas cardíacas infectadas, traumatismo o como complicación de la neurocirugía. En una revisión retrospectiva de 21 casos de especies de *Candida* aisladas en el líquido cefalorraquídeo luego de una neurocirugía, Geers y Gordon⁹¹ encontraron que el 86% de estos pacientes tenían válvulas cerebrospinales permanentes (desviaciones). Gelfand y cols.⁹² informaron casos de sobreinfección tras meningitis bacteriana aguda en adultos que sufrieron traumatismo del sistema nervioso central o intervención quirúrgica. Estos autores aconsejan que en todo paciente con meningitis bacteriana que no mejora con tratamiento antimicrobiano debe investigarse la sobreinfección por *Candida*, en especial en los casos en que hay colocados catéteres permanentes.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-12 Infecciones por especies de *Candida* no *albicans*

Las especies de *Candida* distintas de *C. albicans* suelen considerarse flora normal de la piel y las superficies mucocutáneas y sólo raras veces se atribuyen como agentes infecciosos. En una revisión de 1 591 casos de infecciones por *Candida* publicados en 37 informes entre 1952 y 1992 Wingard²⁹⁹ encontró que las especies de *Candida* no *albicans* eran los agentes causales en el 46% de las infecciones sistémicas. *Candida tropicalis* produjo el 25% de las infecciones, *C. glabrata* el 8%, *C. parapsilosis* el 7% y *C. krusei* el 4%. De estos informes, los pacientes con leucemia serían infectados con más probabilidad por *C. albicans* o *C. tropicalis*; los receptores de trasplante de médula ósea lo serían por *C. krusei* o *C. lusitaniae*.

En un estudio similar, más reciente, Wright y Wenzel³⁰³ determinaron que *Candida albicans* se aisló en el 58% de las infecciones intrahospitalarias, *C. tropicalis* en el 25%, *C. parapsilosis* en el 15%, *C. glabrata* en el 6% y *C. lusitaniae* en el 2%. *C. tropicalis* y *C. krusei* se aislaron con mayor frecuencia en los pacientes con neutropenia secundaria a linfoma o leucemia, *C. parapsilosis* en recién nacidos que reciben líquidos para la hiperalimentación y *C. glabrata* en el posquirúrgico de pacientes tras la extirpación de tumores sólidos. Estas especies no *albicans* también se encuentran cada vez con mayor frecuencia como agentes de otras infecciones, lo que determina que sea importante su identificación exacta en el laboratorio clínico.⁴⁷

En una revisión extensa de levaduras patógenas nuevas y emergentes, Hazen relacionó 30 levaduras emergentes con 168 referencias.¹¹⁷ Aunque entre las especies de *C. no albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (en especial aisladas en cultivos de sangre), *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* y *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*) estaban en aumento. Hazen también menciona la emergencia y el aumento significativo en la incidencia de *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Hansenula* y especies de *Trichosporon* aisladas en materiales clínicos, con varias citas a informes de casos específicos de infecciones causadas por estos agentes.

Se han propuesto varias causas para la emergencia súbita de especies de levaduras como agentes de infecciones invasoras, como el uso de antibióticos del amplio espectro y de agentes antineoplásicos, la administración amplia de vancomicina, el cateterismo intravenoso y el aumento de pacientes con neutropenia e inmunosupresión. El uso tan difundido de fluconazol puede ser la causa de la disminución relativa en el aislamiento de *Candida albicans* en cultivos de sangre en relación con otras especies de *Candida*. *Candida lusitaniae* en particular, muchas de cuyas cepas son resistentes a los fármacos antimicóticos utilizados para tratar las infecciones por *Candida albicans*, ha surgido como un patógeno oportunista importante.²³

La contaminación indirecta a través del personal del hospital también puede explicar los aumentos en las infecciones por levaduras en ciertos ambientes. Por ejemplo, un estudio reciente de personal del hospital realizado por Strausbaugh y cols.²⁶⁵ reveló que el 70% del personal de enfermería y de otras secciones era portador de levaduras en las manos, con las especies de *Rhodotorula* y *C. parapsilosis* como las aisladas con mayor frecuencia. En este aspecto, los recién nacidos que tienen una relación estrecha con el personal de enfermería dedicado a su cuidado representan otra población que es susceptible a la candidiasis.¹³⁹ Para una revisión más completa de la patología clínica de *C. parapsilosis* véase el trabajo de Weems.²⁸⁴

explican la invasión y la destrucción de las células observadas en los sitios de infección.

Puede sospecharse *Cryptococcus neoformans* si las colonias de levaduras producen el típico aspecto mucoso. Sin embargo, cabe mencionar que no todas las cepas pueden producir cápsulas. Las cepas no encapsuladas a menudo desencadenan una reacción granulomatosa más pronunciada, como se observa en los cortes de tejidos, en contraste con la necrosis de licuefacción que se asocia más a menudo con la invasión por cepas no encapsuladas. El crecimiento se observa dentro de las 36 a 72 horas en agar sangre de carnero al 5% y en la mayoría de los otros medios de aislamiento primario (lámina en color 21-6).

En la microscopia, la identificación de las especies de *Cryptococcus* puede hacerse mediante la demostración de levaduras esféricas de tamaño irregular (4-10 µm), rodeadas por una cápsula espesa de polisacáridos (las células pueden alcanzar los 20 µm o más de diámetro si se incluye la cápsula en la medición). En las preparaciones de agar harina de maíz, no se forman pseudohifas; las levaduras esféricas de tamaño irregular están separadas de las otras por espacios producidos por el material capsular (fig. 21-91). Las células encapsuladas, a menudo con un solo brote adherido por una hebra muy delgada, también pueden observarse en las preparaciones con tinta china (fig. 21-92). Debido a su falta de sen-



Figura 21-89 Microfotografía de *Geotrichum candidum*, que muestra arthroconidios, algunos de los cuales presentan la extensión característica, similar al tubo germinal, desde uno de los ángulos, simulando un "palo de jockey".



Figura 21-90 Microfotografía de *Trichosporon beigellii*, que muestra arthroconidios, uno de los cuales presenta los blastoconidios con brotes característicos desde dos ángulos, simulando "orejas de conejo".

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-13 Levaduras productoras de artroconidios

Trichosporonosis

Trichosporon beigelii, una de las especie formadoras de artroconidios encontradas con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos, clásicamente causa la piedra blanca. El ser humano puede ser portador de este hongo en la piel, en especial alrededor del ano. La piedra blanca es una infección que afecta el pelo del cuero cabelludo o del cuerpo, o el vello pubiano y se presenta como nódulos pequeños y circunscriptos o concreciones en el tallo piloso. Cada nódulo contiene hifas retorcidas que pueden observarse con facilidad en las preparaciones directas con KOH a partir de las cuales puede aislarse el microorganismo. A menudo la infección puede erradicarse con el simple afeitado; sólo en raras ocasiones se necesitan azoles, tópicos o sistémicos, para erradicarla.

La enfermedad diseminada, con más probabilidad de origen endógeno y que representa la propagación desde localizaciones de colonización cutánea o gastrointestinal, puede manifestarse en personas inmunodeprimidas y en algunos casos es mortal.⁷⁶ Hoy y cols.¹²⁴ realizaron la revisión de 19 casos de infecciones diseminadas por *T. beigelii* en pacientes con diversas enfermedades neoplásicas tratados en el M. D. Anderson Hospital en Houston en un período de 10 años. La manifestación clínica más común entre este grupo de pacientes fue la enfermedad febril o la neumonía inespecífica. Las tres cuartas partes de estos pacientes fallecieron; respecto de la discusión en otra parte, el diagnóstico no se sospechó hasta la muerte en el 25% de los casos en que se practicó la necropsia. Otras especies de *Trichosporon* pueden causar infección invasora, en especial en los pacientes con procesos hemáticos malignos.¹³⁵

La publicación de Sweet y Reed²⁶⁹ indica que los neonatos no son inmunes a la enfermedad diseminada. Yoss y cols.³⁰⁵ hallaron que los recién nacidos con bajo peso presentan una susceptibilidad particular, una situación de gran preocupación porque la mayoría de los casos han sido mortales. Lamentablemente, muchas veces el diagnóstico se retrasa porque no se reconoce la enfermedad o el microorganismo no se identifica con rapidez en el laboratorio. Es importante que los microbiólogos reconozcan los artroconidios característicos en las preparaciones del agar harina de maíz como indicio inicial para la identificación y realicen las pruebas confirmatorias adecuadas.

Trichosporon beigelii es un productor rápido de ureasa y de actividad sacarolítica con la formación de ácido a partir de la mayoría de los hidratos de carbono. Como advertencia, *Trichosporon beigelii* comparte determinantes antigénicos con *Cryptococcus neoformans*; por consiguiente, el suero y el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con enfermedad diseminada pueden dar un resultado falso positivo en la prueba de aglutinación del látex para el criptococo.

Geotrichosis

Las infecciones diseminadas por especies de *Geotrichum* suelen encontrarse con menor frecuencia. Se han informado casos aislados de este tipo de infección diseminada por *Geotrichum candidum*, dos en pacientes con leucemia aguda.²⁴⁷ Uno de estos pacientes evolucionó a la insuficiencia renal 3 días antes de la muerte. Los glomérulos estaban bloqueados con segmentos de hifas del hongo. El caso más reciente, informado por André y cols.¹⁴ fue el de una muchacha joven a quien se estaba tratando por hepatoblastoma. Después de las complicaciones por infecciones bacterianas secundarias, la paciente sobrevivió tras un ciclo de 5 semanas con anfotericina B por vía intravenosa seguido de 6 meses de itraconazol por vía oral. Aunque no se han establecido regímenes terapéuticos en pacientes con infección diseminada por *Geotrichum*, se recomienda el uso de dosis altas de itraconazol y anfotericina B liposómica.²⁴⁷

Si bien se han informado casos de neumonitis secundaria por especies de *Geotrichum*, su aislamiento en las secreciones respiratorias suele representar contaminación o comensalismo y deben descartarse otras causas. *G. candidum* asimila sólo la glucosa, la galactosa y la xilosa que, salvo la utilización de esta última, es un patrón similar al de *T. capitatus*. La mayoría de las cepas de *Geotrichum* no producen ureasa.

sibilidad, el procedimiento con tinta china se está realizando con menor frecuencia en las muestras de líquido cefalorraquídeo remitidas a los laboratorios clínicos donde se utilizan pruebas más sensibles para la detección del antígeno criptocócico.

Un aislamiento en el que se sospecha *C. neoformans* puede confirmarse mediante la demostración de la producción de ácido cafeico o a través de la producción de un pigmento castaño rojizo, ya sea en el medio agar semillas de níger (lámina en color 21-6D) o en forma directa mediante la inoculación de



Figura 21-91 Microfotografía de una preparación de agar harina de maíz de *Cryptococcus neoformans*, que ilustra levaduras esféricas, de tamaño irregular, separadas por material polisacárido.

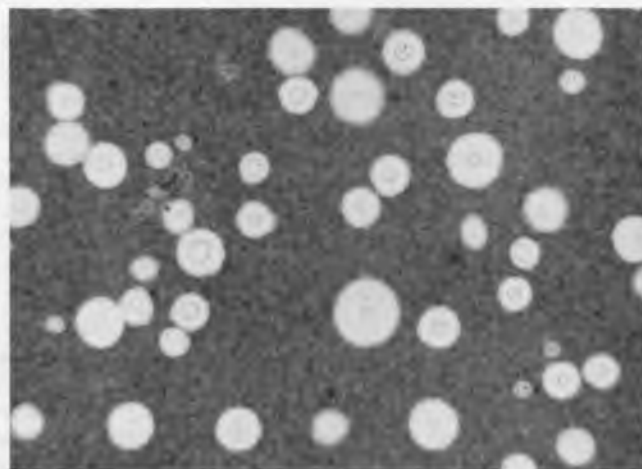


Figura 21-92 Microfotografía de una preparación con tinta china, que muestra levaduras de tamaño irregular, encapsuladas y esféricas de *Cryptococcus neoformans*.

una tira de papel de filtro impregnada con reactivo en una porción de la colonia desconocida y la observación de la aparición de un pigmento negro.

Aunque en los seres humanos pueden aislarse otras especies de *Cryptococcus*, su papel como agentes causales de infección es poco habitual. Las presentaciones clínicas de estos casos varían desde lesiones cutáneas hasta fungemia. La mayoría de los casos de fungemia producidos por las especies no *neoformans* se adquieren en el ámbito hospitalario, por lo general en pacientes con neutropenia asociada con catéteres intravasculares permanentes.¹³¹ Estos autores también informan dos casos de fungemia causados por *Cryptococcus laurentii* y advierten que casi todos los aislamientos de *Cryptococcus* no *neoformans* son más resistentes al fluconazol y a la flucitosina que la mayoría de los de *C. neoformans*, por lo que en los casos clínicamente importantes se requiere una identificación de especie.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS SIN CULTIVO

Los ensayos para la detección de antígeno en las muestras de líquido cefalorraquídeo son los más utilizados para establecer el diagnóstico de meningitis criptocócica y han reemplazado a la técnica consagrada de la tinta china, que es menos sensible. El material capsular actúa como reactivo, lo que produce la reacción de aglutinación con los reactivos utilizados en estas pruebas.⁸⁵ La prueba de aglutinación del látex disponible en la actualidad por varios fabricantes es confiable, fácil de realizar y lo suficientemente sensible y específica para ser llevada a cabo ampliamente en la mayoría de los laboratorios de micología clínica. No se requiere equipo especial y el procedimiento es fácil de dominar. Las reacciones falsas positivas pueden reducirse si se hierve el líquido antes de realizar la prueba o mediante el tratamiento previo con pronasa para destruir las proteínas extrañas que pueden unirse o bloquear el acoplamiento antígeno-anticuerpo. Los desinfectantes y los jabones contaminantes también pueden causar reacciones falsas positivas.²² El líquido de sinéresis proveniente de las placas de agar puede contaminar las agujas de inoculación durante la toma de muestra de la colonia, lo que puede determinar resultados falsos positivos. Estas reacciones falsas positivas pueden detectarse mediante el empleo de partículas de látex de control recubiertas con globulinas normales.

Información clínica adicional sobre criptococosis se presenta en el recuadro de correlación clínica 21-14.

Otras levaduras de importancia médica que no forman hifas

CANDIDA (TORULOPSIS) GLABRATA

Candida glabrata es el nombre aceptado en la actualidad para este microorganismo. Es agente de infecciones urinarias y comprende alrededor del 20% de todas las levaduras aisladas en muestras de orina.⁸⁸ Se han informado casos de endocarditis³⁶ y de infección diseminada¹¹⁹ causados por *C. glabrata*. Este hongo asimila la glucosa y la trehalosa, un patrón de asimilación que es útil para la identificación en el laboratorio.

Las colonias de *C. glabrata* crecen con más lentitud que otras levaduras y a menudo requieren 48 a 72 horas para visualizarse. Por lo tanto, si se aísla una levadura de crecimiento lento en el agar sangre de una muestra clínica (en especial de la orina), que forma colonias pequeñas, enteras, convexas, brillantes y lisas (lámina en color 21-6E) y que en la microscopia aparece como células de 2 a 3 μm de diámetro, con un brote único, de tamaño regular, sin la formación de pseudohifas, debe considerarse *Candida (Torulopsis) gla-*

brata. En las preparaciones de agar harina de maíz, las células de *C. glabrata* se disponen en racimos relativamente firmes, sin la separación observada con las especies de *Cryptococcus* (fig. 21-93).

ESPECIES DE RHODOTORULA

Las especies de *Rhodotorula* son contaminantes transportados por el aire que pueden convertirse en comensales de la piel o pueden aislarse en orina y heces. El aislamiento de las secreciones respiratorias suele tener poca importancia. En el pasado las infecciones eran raras; sin embargo, en la actualidad *Rhodotorula rubra* se menciona entre los agentes "emergentes" de infección. La fungemia se asocia con mayor frecuencia con los catéteres colonizados o las soluciones intravenosas contaminadas.^{43,140} Especies de *Rhodotorula* se han aislado en cortinas de duchas, juntas de bañeras y cepillos de dientes. Otras infecciones poco habituales causadas por este microorganismo son septicemia relacionada con sondas permanentes: meningitis y peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal continua.

La observación de colonias levaduriformes con una red o pigmentación rojo anaranjada (lámina en color 21-6F) con más probabilidad corresponde a especies de *Rhodotorula*. La morfología microscópica no es diagnóstica. No se forman pseudohifas; en cambio se observan células ovaladas con brotes que se disponen en racimos irregulares y laxos. Casi todas las cepas son productoras rápidas de ureasa.

ESPECIES DE SACCHAROMYCES

Las colonias, que aparecen en el transcurso de 36 a 48 horas, son blanco grisáceas y pastosas con pliegues irregulares. El aspecto es inespecífico y puede ser necesario realizar estudios de asimilación de hidratos de carbono para confirmar la identificación. Los resultados negativos en la asimilación de la celobiosa y la xilosa son útiles para la diferenciación de las especies de *Saccharomyces* de otras especies bioquímicamente relacionadas.

La morfología microscópica tampoco es específica. Se observan racimos laxos de levadura grandes, ovales, con brotes en las preparaciones de agar harina de maíz. Cuando las colonias crecen en agar para ascosporas deficiente desde el punto de vista nutricional (contiene acetato de potasio, extracto de levadura, glucosa, agua y agua destilada), la identificación puede confirmarse mediante la observación de las ascosporas. Después de la incubación durante 7-10 días de una placa inoculada, puede hacerse el frotis de una de las colonias aisladas y tñirlas para ácido-alcohol resistencia. Con esta técnica se observan ascosporas que aparecen como células grandes, de paredes gruesas y esféricas, con un pigmento rojo característico (lámina en color 21-6H).

Saccharomyces cerevisiae, la levadura común "de cerveza" o "de panadería", suele colonizar las mucosas de los seres humanos, pero por lo general no se la considera patógena. En la literatura antigua se han publicado casos ocasionales de fungemia en pacientes inmunosuprimidos.^{44,77,194,272} Oliver y cols.²⁰² describieron tres casos de receptores de trasplante de médula ósea en una unidad de hematología en quienes se produjo infección invasora por *S. cerevisiae*. Dos de los pacientes fallecieron. La genotipificación de las cepas invasoras y portadoras demostró una cepa indistinguible de la de los pacientes que habían estado al mismo tiempo en la unidad, lo que sugiere una infección cruzada.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 21-14 Criptococosis

Las siguientes son las diversas manifestaciones clínicas de la criptococosis. En la actualidad se la considera una enfermedad que define al SIDA y deben realizarse pruebas para HIV siempre que se aísla *C. neoformans* en muestras clínicas o cuando las pruebas de detección de antígeno sean positivas. No obstante, y como se indica a continuación, se han detectado casos recientes de criptococosis en huéspedes inmunocompetentes. Aunque no habitual, especies de *Cryptococcus* no *neoformans* también pueden ser agentes de fungemia y de enfermedad diseminada.¹³¹

Sistema nervioso central

La enfermedad del sistema nervioso central puede aparecer sin evidencia de enfermedad en otra localización. El comienzo de los síntomas puede ser insidioso, con cefaleas leves, fallas de la memoria o cambios de la personalidad como únicos indicios. También puede haber fiebre de baja intensidad. A medida que la enfermedad progresa se manifiestan lentamente signos y síntomas sugestivos de meningitis, es decir, rigidez de nuca, dolor de cuello y pruebas positivas ante la flexión de la rodilla y de la pierna (signos de Brudzinki y de Kernig). En los casos de granulomas criptocócicos localizados, pueden evidenciarse signos y síntomas como parálisis, hemiparesia y convulsiones jacksonianas. La visión borrosa, la diplopía, la oftalmoplejía, los trastornos del habla, la visión doble y la inestabilidad de la marcha suelen ser manifestaciones de una lesión que se expande (criptococoma). El edema de papila suele ser el signo de aumento de la presión intracraneal. A medida que la enfermedad progresa pueden experimentarse pérdida de peso, malestar general, persistencia de la fiebre, náuseas, vómitos y vértigos. En los casos progresivos fulminantes o mortales las alteraciones mentales pueden ser más marcadas (agitación, irritabilidad, confusión, alucinaciones, psicosis), que evolucionan en delirio, coma y, por último, la muerte. El examen del líquido cefalorraquídeo puede revelar un aumento de los linfocitos, concentraciones bajas de glucosa y elevadas de proteínas. La criptococosis del SNC de comienzo espontáneo es una enfermedad que define el SIDA.

Criptococosis pulmonar

Puede observarse neumonía localizada o generalizada. Un caso recién publicado por Sweeney y cols.²⁶⁸ indica que la criptococosis pulmonar puede afectar a huéspedes inmunocompetentes. Estos autores informan el caso de un niño de 10 años con histiocitoma fibroso maligno de hueso y nódulo pulmonar secundario a la infección por *C. neoformans*. El diagnóstico del paciente se sugirió por la aparición de una lesión pulmonar en un estudio de tomografía computarizada. En una revisión de 13 casos, 6 fueron asintomáticos. La enfermedad criptocócica pulmonar a menudo se reconoce como resultado de estudios por imágenes realizados por otras razones. Zhu y cols.³⁰⁶ también comunicaron cuatro casos de criptococosis pulmonar en pacientes no infectados por HIV, asociados con meningitis criptocócica. De nuevo, ninguno de los cuatro pacientes tenía síntomas evidentes de enfermedad pulmonar. Lee y cols.¹⁵⁵ citan la tinción de Riu (utilizada para demostrar flagelos bacterianos) como un modo excelente para demostrar los microorganismos en frotis preparados de cepillados broncoscópicos o aspirados con aguja en casos en que el diagnóstico no puede hacerse debido a la falta de signos o síntomas primarios, o hallazgos radiográficos.

Kerking y cols.¹³⁷ explicaron la evolución natural, la presentación clínica, el diagnóstico y el tratamiento de la criptococosis pulmonar primaria en una revisión de 41 pacientes. Pudieron establecer el diagnóstico cuando la radiografía de tórax anormal se asociaba con el aislamiento de *C. neoformans* de las secreciones respiratorias, la observación de microorganismos de aspecto típico que aparecen como mucicarmín positivos o ambos, en cortes de tejido pulmonar. La mayoría de los pacientes en su serie tenían enfermedades subyacentes que predisponen a la infección criptocócica: tratamiento inmunosupresor (28 de 41), diabetes mellitus (20 de 41), procesos malignos hemáticos o neoplasias linforreticulares (12 de 41), trasplante renal reciente (10 de 41) y enfermedades del tejido conectivo por hepatitis crónica activa (5 de 41). Siete de los pacientes no presentaron ninguna alteración de base detectable. Predominaron los síntomas generales; la fiebre y el malestar se observaron en más de la mitad de los pacientes. El dolor torácico, la disnea, la pérdida de peso y los sudores nocturnos en combinaciones variables se observaron en un cuarto a un tercio de los pacientes. Sólo siete de los pacientes refirieron tos. Siete pacientes fueron asintomáticos y se estudiaron sólo por radiografías anormales. Las alteraciones en la radiografías de tórax incluían lesiones en masa circunscriptas, infiltrado alveolar o intersticial, abscesos con niveles hidroaéreos o lesiones cavitarias (7 de 41), lesiones solitarias en moneda y opacidades redondeadas pequeñas y múltiples.

Criptococosis cutánea

La infección criptocócica primaria de la piel es rara; la enfermedad cutánea suele ser una manifestación de infección sistémica.¹⁰⁶ Murakawa y cols.¹⁸⁶ encontraron en su institución que el 5,9% de los pacientes tratados por infección criptocócica y SIDA también presentaban lesiones cutáneas. Los autores describen una variedad de lesiones: pápulas umbilicadas, nódulos y placas violáceas, que a veces se asemejan a las del molusco contagioso o en otros casos recuerdan más al sarcoma de Kaposi. Las lesiones se observaron con mayor frecuencia en la cabeza y el cuello. Pema y cols.²¹³ compararon las manifestaciones clínicas de la criptococosis en las eras anterior y posterior al SIDA. Hamann y cols.¹¹² describieron un caso de celulitis criptocócica primaria del brazo derecho en un hombre australiano de 75 años. El agente etiológico era *C. neoformans* var. *gattii*, un hongo que es endémico en Australia y puede causar infecciones en los seres humanos inmunocompetentes.

Criptococosis diseminada

Como las cepas de *C. neoformans* que producen material capsular pueden resistir a la fagocitosis por los neutrófilos segmentados o pueden sobrevivir en el citoplasma de los fagocitos mononucleares, estos microorganismos pueden distribuirse ampliamente en el huésped humano. En los casos diseminados, pueden verse afectadas casi todas las vísceras u órganos. Como se mencionó, la mayoría de las lesiones criptocócicas cutáneas representan la enfermedad diseminada. Aun cuando un episodio inicial de meningitis se cura, los síntomas pueden repetirse por la reinfección desde un sitio remoto.

Minamoto y Rosenberg¹⁸¹ informaron que la prostatitis criptocócica persiste después del tratamiento en apariencia exitoso en el 29% de los varones con enfermedad diseminada y sirve como reservorio para la recurrencia de la meningitis. Liu¹⁶¹ seleccionó de la literatura 40 casos de osteomielitis criptocócica que en el 75% de los casos se limitaba a un solo hueso. Las vértebras representaron el sitio más afectado. En estos casos, la sarcoidosis, la tuberculosis y la corticoterapia previa fueron las principales causas predisponentes de la criptococosis. La miositis criptocócica sólo se informa en raras ocasiones, en su mayoría en pacientes con infección por HIV. O'Neill y cols.²⁰³ informaron un caso raro de miositis criptocócica no relacionada con SIDA en un receptor de trasplante cardíaco sometido a tratamiento inmunosupresor. La enfermedad hepática primaria puede predisponer a la peritonitis criptocócica, aunque es un hecho raro.²⁶³

Las infecciones criptocócicas urinarias también son infrecuentes.²⁶¹ Los riñones, en particular los glomérulos, a menudo albergan grandes cantidades de microorganismos (siempre que haya un pH ligeramente ácido debido al intercambio de Na⁺ e H⁺). Cuando se aísla *C. neoformans* en las vías urinarias, debe realizarse una búsqueda de la enfermedad diseminada. En los casos de meningitis con cultivos negativos, por ejemplo, el diagnóstico de criptococosis puede hacerse mediante el aislamiento de los microorganismos en la orina.

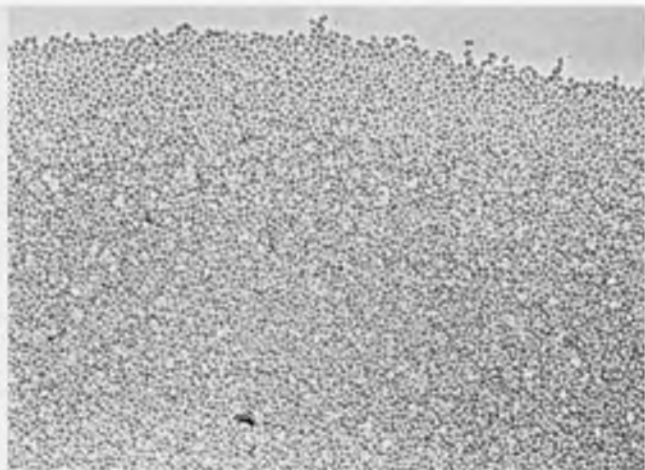


Figura 21-93 Microfotografía de una preparación a partir del agar harina de maíz de *Candida glabrata*, que ilustra racimos compactos de levadura diminutas, uniformes, no separados por material capsular.

HANSENULA ANOMALA

A pesar de aislarse raras veces en los laboratorios clínicos, *Hansenula anomala* se incluye aquí porque, además de las especies de *Saccharomyces*, produce ascosporas ácido-alcohol resistentes cuando se observan en un frotis con la tinción específica para demostrar esta propiedad. Las ascosporas de *Hansenula* difieren de las de *Saccharomyces* porque son aplanadas en uno de los lados en lugar de esféricas, con un margen externo o labio bien diferenciado en la base plana, simulando un sombrero de policía inglés (fig. 21-94). Se han informado infecciones aisladas en pacientes inmunosuprimidos, asociadas por lo general con los catéteres permanentes. Murphy y Buchanan¹⁸⁸ informaron 52 recién nacidos colonizados por *Hansenula anomala*, algunos de los cuales tenían evidencia de infección sistémica. Ma y cols.¹⁶⁹ comunicaron un caso de un recién nacido prematuro con osteomielitis estafilocócica al que se le determinó fungemia por *Hansenula anomala* justo antes

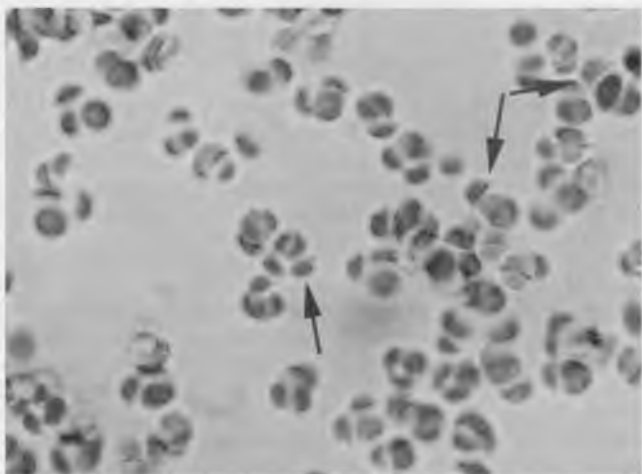


Figura 21-94 Microfotografía de una preparación con tinción para ácido-alcohol resistencia, que revela levaduras ácido-alcohol resistentes de *Hansenula anomala*, con la forma característica de sombrero de policía inglés, completo con ala (flechas).

de la iniciación del tratamiento antimicrobiano con teicoplanina. El recién nacido se curó después de 10 días de tratamiento con antimicóticos. Kalenic y cols.¹³⁴ informaron un brote reciente de infección por *Hansenula anomala* en ocho pacientes adultos tratados en una unidad quirúrgica de cuidados intensivos. No se identificó la fuente de las infecciones ni la vía de transmisión.

MALASSEZIA FURFUR

El aislamiento en cultivo puede ser difícil porque el microorganismo requiere ácidos grasos para el crecimiento. Cuando se prevé su aislamiento sobre la base de la historia clínica, deben agregarse algunas gotas de aceite de oliva virgen a la superficie de la placa de agar sangre de carnero inmediatamente después de la siembra. En algunos laboratorios de micología, es de práctica habitual recubrir las placas de agar preparadas de todos los cultivos de sangre provenientes de salas de cuidados intensivos neonatales porque estos recién nacidos reciben nutrición parenteral total y tienen un riesgo alto de presentar septicemia por *Malassezia*.⁵⁴ Los microorganismos crecen bien como colonias levaduriformes pequeñas debajo de las gotas de aceite (lámina en color 21-6G). En la microscopía se observan levaduras pequeñas con brotes, aisladas o en racimos laxos. Las hifas observadas en las preparaciones en fresco directas con KOH de los raspados de piel no se observan en las preparaciones provenientes de los cultivos de levaduras.

Malassezia furfur, una levadura lipofílica que es comensal habitual de la piel, es la causa de una infección cutánea superficial en personas con higiene deficiente, conocida como tiña (pitiriasis) versicolor. Se presenta como lesiones cutáneas descamativas, sobre todo del tórax y la espalda, que a veces se extiende al cuello, la cara y los brazos. Las lesiones son planas, de contorno irregular y pueden tener pigmentación castaña, que a menudo aparecen como manchas blancas que cambian de color, en especial en la piel expuesta a la luz del sol. Los elementos micóticos en estas lesiones producen fluorescencia rojo ladrillo cuando se los examina con una longitud de onda larga con luz ultravioleta (lámpara de Wood). El examen directo de los raspados de piel revela hifas y células de 3-5 µm de diámetro que emiten brotes (familiarmente conocidos como “espagueti y albóndiga”), con la formación de un collar característico en el borde entre la célula madre y la célula hija.

También se han informado infecciones sistémicas y septicemia, la mayoría asociada con catéteres vasculares profundos, en especial en pacientes que reciben hiperalimentación a largo plazo. El informe de casos de Rosales y cols.²³⁷ de meningitis por *Malassezia furfur* en recién nacidos de muy bajo peso que reciben nutrición parenteral total e infusión líquida lipídica en el espacio subaracnoideo a través de una guía periférica por el cuero cabelludo indica que esta fuente de fungemia no ha sido eliminada. Muchas de las emulsiones para la hiperalimentación tienen alto contenido de ácidos grasos de cadena larga. Se establece un microambiente ideal en el sitio del catéter donde puede agruparse una cantidad pequeña de emulsión con alto contenido en aceite, que favorece el crecimiento de microorganismos lipofílicos endógenos presentes en la superficie cutánea. El catéter proporciona una interrupción de la barrera en la piel a través de la cual pueden ingresar en el torrente circulatorio los microorganismos proliferantes.

Identificación por el laboratorio de las “levaduras negras”

AUREOBASIDIUM PULLULANS

Las especies de *Aureobasidium* crecen como colonias lisas y húmedas que aparecen como “levaduras negras”. En la mi-

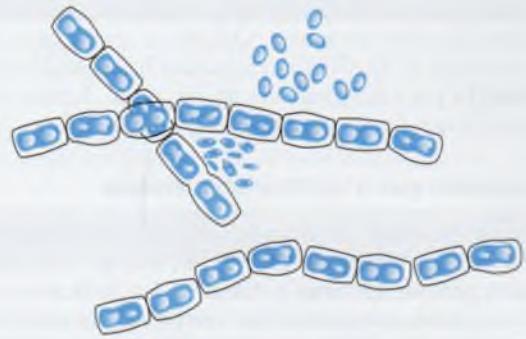


Figura 21-95 Microfotografía y esquema del aspecto microscópico de *Aureobasidium pullulans*, que muestran cadenas de células grandes, similares a artroconidios, teñidos de oscuro con conidios pequeños y hialinos en el fondo.

croscopia, las hifas dematiáceas oscuras se engrosan a medida que la colonia madura y aparecen como artroconidios. Desde los brotes se forman grandes cantidades de conidios unicelulares, hialinos, pequeños y elípticos a partir de los centros de los segmentos de las hifas individuales (fig. 21-95). Se han informado casos ocasionales de feohifomicosis cutánea secundaria a *Aureobasidium pullulans* en seres humanos.²³⁹ Los informes de casos más recientes incluyen el caso raro comunicado por Bolignano y Criseo²⁷ de infección micótica intrahospitalaria diseminada debido a *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* en un paciente con traumatismo grave y el comunicado por Gupta y Elewski¹⁰² en un paciente de 50 años con una úlcera de córnea infectada. A los 5 días posteriores a la cirugía presentó escleritis que revirtió tras el tratamiento antimicótico, el desbridamiento quirúrgico y la crioterapia.

PHAEOANNELLOMYCES WERNECKII

El género "*Phaeoannellomyces*" fue creado en 1985 por McGinnis y cols.¹⁷⁷ para ubicar a esas levaduras negras que se

caracterizan por la formación de células que funcionan como anélidos" (*phaeo* = oscuro; *annello* = anélidos; *myces* = hongo).

Phaeoannellomyces werneckii (*Exophiala werneckii*) produce levaduras bicelulares. La célula hija se forma a partir de una extensión de la célula madre que luego se acorta para formar una cicatriz (anélido), que da el aspecto de tabique con tinción oscura que separa las dos células (fig. 21-96). Esta formación del anélido exige la inclusión en el nuevo género *Phaeoannellomyces*, según el esquema de McGinnis. Engleberg y cols.⁷⁴ informaron un caso de quiste feohifomicótico causado por *Phaeoannellomyces elegans*. Las levaduras en esta especie son unicelulares y pueden formar paredes oscuras gruesas y pseudohifas cuando maduran.

Aún existen controversias acerca de si el género "*Phaeoannellomyces*" tiene legitimidad taxonómica. Kwon-Chung y cols.¹⁵³ encontraron que "las características de la colonia levaduriforme son invariablemente inestables y la colonia se convierte en micelial cuando los cultivos se mantienen en el laboratorio". Esta autora continúa describiendo un cultivo de *Phaeoannellomyces elegans* derivado a su laboratorio que, cuando

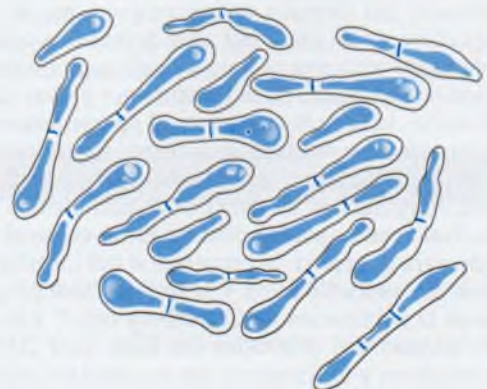


Figura 21-96 Microfotografía y esquema de la forma de levadura de especies de *Phaeoannellomyces*, que revelan levaduras dobles, largas y separadas por una barra transversa que toma una tinción oscura distintiva (anélido).

llegó, ya había asumido las características morfológicas indistinguibles de *Exophiala jeanselmei*. Sobre la base de estas observaciones, Kwon-Chung opina en contra de crear una designación de género separado para la forma de levadura, ya que considera que son sinónimos. Quizás en respuesta a este hallazgo, la escuela de McGinnis citada antes ha sugerido el término **sinamorfa** para designar una de las varias formas anamórficas con las que puede presentarse un hongo.

Sistemas comerciales para la identificación de levaduras

Varias compañías han introducido equipos comerciales para identificar levaduras (recuadro 21-8).²⁸⁰ El uso de estos sistemas requiere pericias técnicas y familiaridad suficiente con cada prueba realizada para posibilitar interpretaciones precisas. En cada caso, deben seguirse de modo minucioso las instrucciones del fabricante. Cada director o supervisor de laboratorio debe evaluar factores como el costo, la disponibilidad, el vencimiento y la estabilidad de los reactivos, la adaptabilidad al flujo de trabajo y las necesidades específicas de los servicios clínicos antes de tomar la decisión de implementar estos sistemas en su laboratorio.

Pruebas de sensibilidad a los antimicóticos (antifungigrama)

Mediante un proceso con acuerdo general que se llevó a cabo en la década pasada, el Subcomité sobre Pruebas de Sensibilidad para los Antimicóticos del Clinical Laboratory Standards Institute estableció métodos estandarizados y reproducibles para la realización de las pruebas de sensibilidad de las levaduras (antifungigramas).^{192,219,220,230} El establecimiento de estas normas de laboratorio, en especial para las levaduras, ha proporcionado valiosas pautas para el tratamiento con antimicóticos que se correlacionan mejor con los resultados clínicos.⁹³ El método de macrodilución y su modificación de microdilución sirven en la actualidad como estándares de referencia. Al contrario de otros sistemas elaborados para realizar los antifungigramas, estos métodos les permiten ahora a muchos laboratorios de microbiología clínica proporcionar esos servicios.

Sewell y cols.,²⁵³ en un estudio comparativo sobre estas pruebas para el fluconazol, mostraron que el Epsilometer Etest® (AB Biodisk, Solna, Suecia) se correlaciona bien con los métodos de referencia, con una coincidencia global del 84%, que llega al 90% para la mayoría de las especies de *Candida*, salvo *C. tropicalis* (56%). *Candida (Torulopsis) glabrata* también mostró valores de comparación bajos en este estudio (34%).

El Etest® emplea una tira plástica que contiene un gradiente continuo definido del fármaco antimicrobiano que se coloca sobre la superficie de un placa del agar después de que se ha sembrado de modo uniforme con un inóculo que contiene una concentración estandarizada de la levadura por probar (fig. 21-97). Al hidratarse, la tira plástica libera el agente antimicótico en el agar circundante y produce un aumento logarítmico en la concentración de antibiótico desde sólo 0,002 µg/mL hasta tanto como 256 µg/mL, de acuerdo con el antimicótico que se va a probar. Los detalles para realizar el Etest, como el medio recomendado para la prueba, la preparación del inóculo estándar, los pasos del procedimiento y la lectura también pueden encontrarse en la publicación de Colombo y cols.⁴⁸ Este informe incluye, además, los resultados del Etest para 200 aislamientos de levaduras y los compara con los métodos estándares para varios fármacos individuales. Las coincidencias esenciales entre los dos métodos dentro de una ± 1 dilución fueron del 71% para el ketoconazol, el 80% para el fluconazol y el 84%

para el itraconazol. Desde la publicación de este trabajo, el uso de un medio estandarizado (RMPI 1640), con lectura final a las 48 horas y otros ajustes han elevado el porcentaje de coincidencia esencial lo suficiente como para establecer el Etest como un método alternativo para las pruebas de sensibilidad para los hongos de la mayoría de las especies de levaduras. Como ya se mencionó, puesto que el Etest es menos laborioso y más fácil de realizar, estas pruebas están ahora dentro del alcance de muchos laboratorios de microbiología clínica.

En un estudio posterior realizado en múltiples sitios, Pfaller y cols.²¹⁸ demostraron un nivel elevado de reproducibilidad del método de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del Etest entre las cuatro instituciones participantes. Cada laboratorio que participó recibió subcultivos de dos cepas de *Candida* utilizadas para el control de calidad de la American Type Culture Collection (ATCC) (*C. parapsilosis*, ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258), tiras Etest y placas de agar RPMI suficientes para realizar 20 pruebas replicadas con cada uno de los cinco fármacos: anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol y ketoconazol. En casi todas las combinaciones de fármaco y cepas problema probadas, se observó una distribución muy firme, entre el 98% y el 100% de las CIM, dentro de un rango de tres diluciones. Las diferencias selectivas de los resultados entre el Etest y el método estándar para flucitosina y fluconazol contra *C. krusei* se relacionaron con el crecimiento desigual entre el agar Etest enriquecido con glucosa y el caldo sin suplementar utilizado en la prueba de macrodilución en caldo de referencia.

El Etest detectó una subpoblación resistente de cepas no recogida por el método de referencia. Después de analizar todos los datos, los autores concluyeron que el estudio estableció un nivel de coincidencia excelente entre los laboratorios y dentro del mismo laboratorio entre los dos métodos, lo que proporciona amplia documentación de la utilidad del Etest para determinar los perfiles de sensibilidad a los antimicóticos. Esta estandarización de los métodos de prueba, el establecimiento de valores críticos interpretativos para ciertas combinaciones de fármaco-levadura y la reproducibilidad de los resultados, tanto entre los laboratorios como dentro del mismo laboratorio clínico, proporcionarán la base sobre la cual pueden medirse los resultados clínicos.⁷⁸

La motivación de realizar los antifungigramas en los laboratorios clínicos va más allá de establecer los perfiles de resistencia de un aislamiento dado. La aparición de resistencia a los antimicóticos se está convirtiendo en un problema de preocupación cada vez mayor. Por ejemplo, con el uso más extendido del fluconazol, también aumentaron los informes de resistencia a este fármaco en especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*.²⁷⁸ Estos investigadores citan, además, el aumento en la resistencia de *Candida lusitanae* y *Cryptococcus neoformans* a la anfotericina B, tal vez como consecuencia del uso de tratamiento con un solo fármaco. Peyron y cols.²¹⁶ encontraron que el Etest proporciona los medios óptimos para la discriminación entre aislamientos de *C. lusitanae* resistentes a la anfotericina B y aquellos que son sensibles al fármaco. Estos autores encontraron que los aislamientos supuestamente resistentes tenían un valor crítico de la CIM $\geq 0,38$ µg/mL utilizando el medio de cultivo estándar RPMI del Instituto para Estándares en el Laboratorio Clínico.

Asimismo, se observó menor sensibilidad al itraconazol contra aislamientos seleccionados de *Aspergillus fumigatus*. La resistencia a los azoles también se observa en aislamientos de *Candida albicans* de pacientes con SIDA, que tal vez sea la consecuencia del uso excesivo de este fármaco en el tratamien-

Recuadro 21-8 Estudio de siete sistemas de identificación de levaduras**Vitek® (BioMérieux Vitek, Hazelwood, MO)**

La tarjeta Vitek utilizada en este estudio comprende 30 pocillos que se inoculan con una suspensión de la levadura desconocida y se incuban a 30 °C durante 24-48 horas en la cámara de incubación provista con el sistema. Los cambios de color se leen por espectrofotometría y se informa como un código numérico de nueve dígitos. La base de datos incluye 36 especies de levaduras. En este estudio, el 59,6% de los 52 aislamientos se identificaron sin pruebas adicionales. Sin embargo, con el uso de la tarjeta ID-YST, que comprende 64 pocillos con 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, junto con el sistema nuevo VITEK 2, Graf y cols. informaron que el 92,1% de 222 cepas fueron leídas de manera inequívoca, con sólo 11 aislamientos identificados con una discriminación baja.

Sistemas API ID 32C® y API 20C AUX® (BioMérieux, Lyon, Francia)

El API ID 32 C y 20C AUX contienen 32 y 20 microtubos, respectivamente. Las reacciones se leen en forma visual después de 24, 48 o 72 horas de incubación a 30 °C comparando la turbidez del medio dentro de cada uno de los microtubos con la de los controles. Puede calcularse un número perfil de 10 y 7 dígitos, respectivamente. La base de datos de API ID 32 incluye 63 especies de levaduras y la de API 20C AUX, 43. En el presente estudio, los sistemas API ID 32C y API 20C Aux identificaron el 63,5% y el 59,6% de los 52 aislamientos sin las pruebas adicionales. Sin embargo, estas tasas relativamente bajas de rendimiento se mejoran mucho, hasta el 98%, si las lecturas se realizan a las 72 horas en lugar de a las 24 horas. La dificultad principal con este sistema radica en la lectura visual de la turbidez relativa dentro de cada una de las cúpulas, lo que origina una variabilidad considerable entre los observadores.

Yeast Star® (CLARC Laboratories, Heerlen, Países Bajos)

El sistema Yeast Star se basa en los efectos inhibitorios de colorantes específicos sobre el crecimiento de las levaduras. Se coloca un panel de seis colorantes encima de un medio de crecimiento sólido sembrado e incubado durante 24-48 horas a 37 °C. Los resultados se registran en la forma de un código de seis dígitos. La base de datos contiene 16 especies de levaduras. En este estudio, el sistema Yeast Star identificó el 59,6% de 52 aislamientos sin necesidad de pruebas adicionales. El nivel relativamente bajo de rendimiento se debió sobre todo a la falta de identificación por la pequeña base de datos de la que se dispone. Este sistema no es muy empleado.

Auxacolor® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Francia)

El sistema de identificación Auxacolor se basa en la utilización de hidratos de carbono y el crecimiento se visualiza por el cambio de color del indicador de pH. La placa de microtitulación contiene 16 pocillos y se lee después de 24-72 horas de incubación a 30 °C. Además, se incluyen otras características, como la capacidad de crecer a 37 °C, la formación de micelio o artrosporas y la presencia de cápsula. La base de datos contiene 26 especies de levaduras. En este estudio, el sistema Auxacolor identificó correctamente el 80,8% de las 52 cepas; fue el que presentó mejor rendimiento entre los sistemas analizados. En un estudio realizado por Campbell y cols., el rendimiento fue del 91,2%, con sólo 2 de 146 aislamientos que se identificaron de modo incorrecto.

Sistema RapID Yeast Plus® (Innovative Diagnostics Systems, Norcross, GA)

El sistema RapID Yeast Plus se basa en la utilización de hidratos de carbono como sustrato, la hidrólisis de ácidos grasos y urea, y la hidrólisis enzimática de sustratos glucósido y arilamida. Un panel de 18 cavidades se incuban durante 4 horas a 30 °C y se lee después del agregado de reactivos específicos. A partir de los resultados obtenidos se crea un código de seis dígitos y se lo compara con los de una base de datos que incluye 43 especies de levaduras. En el presente estudio se identificó el 76,9% de 52 cepas sin pruebas adicionales. Espinel-Ingroff y cols. informaron un rendimiento del 79,1% en la identificación de especies emergentes de *Candida*; sin embargo, el rendimiento fue del 94,2% en la identificación de las especies que se encuentran con más frecuencia en los laboratorios clínicos.

API Candida® (BioMérieux, Lyon, Francia)

El sistema API Candida consiste en 10 tubos que contienen sustratos deshidratados y se basa en la acidificación de los azúcares o en reacciones enzimáticas. Las tiras se leen después de 24-48 horas de incubación a 30 °C. Se obtiene un perfil numérico de cuatro dígitos que se compara con los de una base de datos con 26 especies de levaduras. En este estudio, se identificó de modo correcto el 78,8% de 52 cepas sin pruebas adicionales. En un estudio realizado por Fricker-Hidalgo y cols., el 75,2% de todos los aislamientos de levaduras estudiados se identificaron correctamente sin pruebas adicionales; sin embargo, se identificó correctamente el 90% de las especies encontradas en los laboratorios clínicos. Los niveles más bajos de rendimiento se debieron a las dificultades en la lectura de ciertas reacciones de color, en especial en las cúpulas que contenían *N*-acetil-glucosamina y β -xilosa.

Referencias citadas

- Campbell CK, Davey KG, Holmes AD. Comparison of the API Candida system with the Auxacolor system for identification of common yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1999;37: 821-823.
- Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, et al. Comparison of the RapID Yeast Plus system with API 20C system for the identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36: 883-886.
- Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA. Comparison of new API Candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1996;36: 1846-1848.
- Graf B, Adam T, Zill E, Gopbel UB. Evaluation of the Vitek2 system for rapid identification of yeasts and yeastlike organisms *J Clin Microbiol* 2000;38: 1782-1785.



Figura 21-97 Fotografía de la superficie de un placa del agar que muestra el Etest®. Se han colocado varias tiras para la difusión en gradiente sobre un crecimiento confluyente ("en césped") de *Candida krusei*. Las interpretaciones de las CIM de las tiras se leen en el sentido de las agujas del reloj que comienza con fluconazol en la posición 11: FL (fluconazol), > 256 µg/mL; FL (flucitossina) > 32 µg/mL; IT (itraconazol), 0,38 µg/mL; VO (voriconazol) 0,38 µg/mL, AP (anfotericina B), 2 µg/mL.

to de la candidiasis orofaríngea (*muguet*). La resistencia intrínseca de *Candida krusei* a los imidazoles y la aparición de resistencia de *Candida glabrata* a este grupo de antimicóticos también representan un problema. White y cols.²⁹³ han publicado una revisión de los factores clínicos, celulares y moleculares que subyacen en la aparición de cepas resistentes, en especial de *Candida albicans*. En resumen, se está tornando indispensable que los laboratorios de microbiología clínica provean datos acerca de las pruebas de sensibilidad in vitro a los antimicóticos para detectar estos patrones emergentes de resistencia.

Diagnóstico serológico de las enfermedades micóticas

En la actualidad, la serología para hongos sólo se realiza en determinados laboratorios de referencia. Los procedimientos consagrados por la tradición, como la prueba de precipitinas en tubo, la inmunodifusión, la aglutinación del látex y las pruebas de fijación del complemento están siendo reemplazados por técnicas más nuevas y sensibles. Las técnicas de inmunoanálisis (EIA) que utilizan anticuerpos monoclonales específicos de especie, los análisis con sondas de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se están utilizando cada vez más en los laboratorios de micología clínica.¹¹⁴

Como regla, los resultados únicos de las reacciones serológicas específicas de especie en títulos de 1:32 o mayores indican enfermedad; sin embargo, la demostración de una elevación del cuádruple o mayor de un título en muestras tomadas con 3 semanas de diferencia puede ser de mayor significación.⁵⁶ Los títulos menores de 1:32 o los que no muestran un aumento de cuatro veces entre muestras pareadas indican la presencia de infección temprana o reactividad cruzada inespecífica con otros antígenos. No obstante, los resultados de todos los estudios serológicos deben considerarse presuntivos.

Los anticuerpos de la clase IgM (determinados mediante el empleo de métodos de precipitación en tubo, aglutinación del látex o inmunodifusión) suelen detectarse alrededor de las 2 semanas después de adquirir la enfermedad e indican infección reciente. Por lo general, los anticuerpos IgM ya no se detectan después de los 6 meses. Los anticuerpos IgG (detectados por fijación del complemento o por inmunodifusión) aparecen poco después del aumento en el título de IgM, no alcanzan el máximo hasta alrededor de las 6 a 12 semanas y pueden permanecer elevados durante muchos meses después de la infección. En consecuencia, no puede usarse un solo título elevado de anticuerpos IgG para distinguir entre infecciones recientes y pasadas.

Los métodos serológicos que no utilizan cultivos y las nuevas técnicas moleculares se han revisado en las secciones dentro de la presentación de cada infección micótica cuando eran útiles para establecer el diagnóstico de enfermedad invasora. En la actualidad, gran parte de la atención se está derivando al desarrollo de análisis sensibles para la detección directa de antígenos de los hongos en muestras clínicas y líquidos biológicos, que a menudo permiten conocer los resultados el mismo día de la obtención de la muestra. Todos los meses se publican grandes adelantos en las aplicaciones prácticas de las técnicas moleculares, lo que obliga a los directores y los supervisores de los laboratorios de micología clínica a mantenerse actualizados con la bibliografía médica a fin de determinar cuáles pueden aplicarse a ámbitos clínicos específicos.¹⁴⁵

REFERENCIAS

1. Abi-Said D, Anaissie E, Uzur O, et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis 1997;24:1122-1128.
2. Adam RD, Piquin ML, Peterson EA, et al. Phaeoophomycosis caused by the fungal genera *Bipolaris* and *Exserohilum*: a report of 9 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 1986;65:203-217.
3. Ainscough S, Kibbler CC. An evaluation of the cot-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. J Med Microbiol 1998;47:623-628.
4. Aisner JA, Schimpff SC, et al. Aspergillus infection in cancer patient: association with fire-proofing materials in a new hospital. JAMA 1996;235:411-412.
5. Ajello L. Hyalophomycosis: a disease entity whose time has come. Newslett Med Mycol Soc; NY 1982;10:305.
6. Ajello L. Hyalophomycosis and phaeoophomycosis: two global disease entities of public health importance. Eur J Epidemiol 1986;2:243-251.
7. Al-Fouzan AS, Nanda A, Kubec K. Dermatophytosis of children in Kuwait: prospective survey. Int J Dermatol 1993;32:798-801.
8. Almeida OP, Jacks J Jr, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. Cnt Rev Oral Biol Med 2003;14:377-383.
9. Al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation. Clin Infect Dis 1998;26:1403-1406.
10. Alvarez M, Ponga BL, Rayon C, et al. Nosocomial outbreak caused by *Scedosporium prolificans* (influm): four fatal cases in leukemic patient. J Clin Microbiol 1995;33:3290-3295.
11. Amano PC. Fungal infections of the hand. Hand Clin 1998;14:605-612.
12. Ampel NM, Dols CL, Galgiani JN. Coccidioidomycosis during human immunodeficiency virus infection: results of a prospective study in a coccidioidal endemic area. Am J Med 1993;94:235-240.
13. Anaissie E, Fainstein V, Samo T, et al. Central nervous system histoplasmosis. An unappreciated complication of the acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med 1988;84:215-217.
14. Andre N, Coze C, Gentet JC, et al. *Geotrichum candidum* septicemia in a child with hepatoblastoma. Pediatr Infect Dis J 2004;23:86.
15. Antoniskis D, Larsen RA, Akil B, et al. Sero-negative disseminated coccidioidomycosis in patients with HIV infection. AIDS 1990;4:691-693.
16. Areno JP IV, Campbell GD Jr, George RB. Diagnosis of blasomycosis. Semin Respir Infect 1997;12:252-262.
17. Arguinchona HL, Ampel NM, Dols CL, et al. Positive coccidioidal serologies in HIV-infected patients without evidence of active coccidioidomycosis. International Conference on AIDS Aug 7-12, 1994. 10:160.
18. Arnold MG, Arnold JC, Bloom DC, et al. Head and neck manifestations of disseminated coccidioidomycosis. Laryngoscope 2004;114:747-752.
19. Babel DE, Rogers AL, Beneke ES. Dermatophytosis of the scalp: incidence, immune response and epidemiology. Mycopathologia 1990;109:69-73.

20. Bassiouny A, El-Refai HA, et al. *Candida* infection of the tongue and pharynx. *J Laryngol Otol* 1984;98:609-611.
21. Baumgardner DJ, Buggy BP, Mattson RJ, et al. Epidemiology of blastomycosis in a region of high endemicity in north central Wisconsin. *Clin Infect Dis* 1992;15:629-635.
22. Blevens LB, Fenn J, Segal H, et al. False positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J Clin Microbiol* 1995;33:1674-1675.
23. Blinkhorn RJ, Adelstein D, Spagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1989;27:236-240.
24. Blum HE. Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis* 1996;23:125-130.
25. Blumenfeld W, Gan GL. Diagnosis of histoplasmosis in bronchoalveolar lavage fluid by intra-cytoplasmic localization of silver-positive yeast. *Acta Cytol* 1991;5:710-712.
26. Boelaert JR, VanRoost GF, Vergauwe PL, et al. The role of desfemoxamine in dialysis-associated mucormycosis: report of three cases and review of the literature. *Clin Nephrol* 1988;29:261-266.
27. Bolignano G, Crisio G. Disseminated nosocomial fungal infection by *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*: a case report. *J Clin Microbiol* 2003;41:4483-4485.
28. Botteon FA, Camargo ZP, Bernard G, et al. Paracoccidioides brasiliensis-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol* 2002;40:387-391.
29. Boutati EI, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 1997;90:999-1008.
30. Bradsher RW. Clinical features of blastomycosis. *Semin Respir Infect* 1997;12:229-34.
31. Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother* 2003;15:Suppl 2:36-47.
32. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:89-117.
33. Butt AA, Carreon J. *Histoplasma capsulatum* sinusitis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2649-2650.
34. Calza L, Manfredi R, Donzelli C, et al. Disseminated histoplasmosis with atypical cutaneous lesions in an Italian HIV-infected patient: another autochthonous case. *HIV Med* 2003;4:145-148.
35. Camargo ZP, Taborda CP, Rodriguez EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol* 1991;29:31-38.
36. Carmody TJ, Kane KK. Torulopsis (*Candida*) grabrata endocarditis involving a bovine pericardial xenograft heart valve. *Heart Lung* 1986;15:40-42.
37. Castro LG, Salebian A, Sotto MN. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. *J Med Vet Mycol* 1990;28:15-26.
38. Chalub E, Sambuelli R, Armando R, Bitoni A. Histologic response of disseminated histoplasmosis in AIDS patients with skin lesions. *International Conference on AIDS* August 7-12, 1994. 10:148.
39. Chan TH, Koehler A, Li PK. *Paecilomyces variotii* peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1996;27:138-142.
40. Chan-Tack RM, Thio CL, Miller NS, et al. *Paecilomyces lilacinus* fungemia in and adult bone marrow transplant recipient. *Med Mycol* 1999;37:57-60.
41. Chappell MS, Mandell W, Grimes MM, Neu HC. Gastrointestinal histoplasmosis. *Dig Dis Sci* 1988;33:153-360.
42. Chowdhary G, Weinstein A, Klein R, Mascarenhas BR. Sporotrichal arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:112-114.
43. Chung JW, Kim BN, Kim YS. Central venous catheter-related *Rhodotorula rubra* fungemia. *J Infect Chemother* 2002;8:109-110.
44. Cimolai N, Gill MJ, Church D. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987;8:113-117.
45. Ciulla TA, Piper HC, Xiao M, Wheat LJ. Presumed ocular histoplasmosis syndrome: update on epidemiology, pathogenesis, and photodynamic, antiangiogenic, and surgical therapies. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:442-449.
46. Clancy CJ, Nguyen MH. Invasive *in situ* aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. *J Infect* 1998;37:229-240.
47. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* 1998;36:Suppl 1:156-165.
48. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995;33:535-540.
49. Confalonieri M, Nanetti A, Gandola L, et al. *Histoplasmosis capsulatum* in Italy: autochthonous or imported? *Eur J Epidemiol* 1994;10:435-439.
50. Cooper CR Jr, McGinnis MR. Pathology of *Penicillium marneffei*. An emerging acquired immunodeficiency syndrome-related pathogen. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:798-804.
51. Cooter RD, Lim IS, Ellis DH, Leitch IO. Burn wound zygomycosis caused by *Apophysomyces elegans*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2151-2153.
52. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:185-218.
53. Dahl MV, Grando SA. Chronic dermatophytosis: what is special about *Trichophyton rubrum*? *Adv Dermatol* 1994;9:97-109.
54. Danker WM, Spector SA, Fierer J, Davis CD. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis* 1987;9:743-753.
55. Darrisaw L, Hanson G, Vesole DH, Kehl SC. *Cunninghamella* infection post bone marrow transplant: case report and review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1213-1216.
56. Davies SF, Sarosi GA. Role of sero-diagnostic tests and skin tests in the diagnosis of fungal diseases. *Clin Chet Med* 1987;8:135-146.
57. Davie SF, Sarosi GA. Blastomycosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:474-479.
58. Davies SF, Sarosi GA. Epidemiological and clinical features of pulmonary blastomycosis. *Seminars in Resp Infect* 1997;12:206-218.
59. De Battle J, Motje M, Balanza R, et al. Disseminated infection caused by *Scedosporium prolificans* in a patient with acute multi-lineal leukemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:1694-1695.
60. De Hoog GS. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity. illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses* 1997;40:Suppl 2: 5-8.
61. Denning DW, Stephens DA. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2121 published cases. *Rev Infect Dis* 1990;12:1147-1201.
62. DiTommaso JP, Ampel NM, Sobonya RE, Bloom JW. Bronchoscopic diagnosis of pulmonary coccidioidomycosis: comparison of cytology, culture, and transbronchial biopsy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:83-87.
63. Dixon DM, Walsh TJ, Merz WG, McGinnis MR. Infection due to *Xylohypha bantiana* (*Cladosporium trichoides*). *Rev Infect Dis* 1990;11:515-525.
64. Donabedian H, O'Donnell E, Olszewski C, et al. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:2111-2118.
65. Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook house sporotrichosis: a point source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale prop in a Halloween haunted-house. *Arch Intern Med* 1997;157:1885-1887.
66. Dumich PS, Neel HB. Blastomycosis of the larynx. *Laryngoscopic* 1983;93:1266-1270.
67. Durkin MM, Connolly PA, Wheat LJ. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigen. *J Clin Microbiol* 1997;35:2252-2255.
68. Durkin MI, Witt J, LeMonte A, et al. Antigen assay with the potential to aid in diagnosis of blastomycosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:4873-4875.
69. Economopoulou P, Laskaris G, Kittas C. Oral histoplasmosis as an indicator of HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 1998;86:203-206.
70. Eleski BE. Tinea capitis: a current perspective. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:1-20.
71. Elgan GW. Chromomycosis. *Derm Clin* 1996;14:77-83.
72. Ellepola AN, Hurt SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:379-388.
73. Ellison MD, Hung RT, Harris K, Campbell BH. Report of the first case of invasive fungal sinusitis caused by *Scopulariopsis acremonium*: review of scopulariopsis infections. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1014-1016.
74. Engleberg NC, Johnson J IV, Bleustein J, et al. Phaeohyphomycotic cyst caused by a recently described species. *Phaeoanellomyces elegans*. *J Clin Microbiol* 1987;25: 605-608.
75. England DM, Hochholzer J. Primary pulmonary sporotrichosis: report of eight cases with clinicopathologic review. *Am J Surg Pathol* 1985;9:193-204.
76. Erer B, Galimberti M, Lucarelli G, et al. *Trichosporon beigeli*: a life-threatening pathogen in immuno-compromised hosts. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:745-49.
77. Eschete ML, West BC. *Saccharomyces cerevisiae* septicemia. *Arch Intern Med* 1980; 140:1539.
78. Espenel-Ingroff A. Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19:217-220.
79. Farr RC, Gardner G, Acker JD, et al. Blastomycotic cranial osteomyelitis. *Am J Otol* 1992;13:580-586.
80. Feldman BS, Snyder LS. Primary pulmonary coccidioidomycosis. *Semin Respir Infect* 2001;16:231-237.
81. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999;2:80-96.
82. Fernandez M, Noyola D, Rossmann SN, Edwards MS. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Curvularia lunata* and a review of *Curvularia* infections in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:727-73.
83. Fish DG, Ampel NM, Galgiani JN, et al. Coccidioidomycosis during human immunodeficiency virus infection: a review of 77 patients. *Medicine (Baltimore)* 1990;69: 384-391.
84. Fojtaszek MF, Kleiman MB, Connolly-Stringfield P, et al. The *Histoplasma capsulatum* antigen assay in disseminated histoplasmosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:801-805.
85. Frank UJK, Nishimura SL, Li NC, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of cryptococcal capsular polysaccharide antigen in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1993;31:94-101.
86. Fraser VJ, Keath EJ, Powderly WG. Two cases of blastomycosis from a common source: use of DNA restriction analysis to identify strains. *J Infect Dis* 1991;163: 1278-1281.
87. Friskel E, Klotz SA, Bartholomew W, Dixon A. Two unusual presentations of urogenital histoplasmosis and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;31: 189-191.
88. Frye RR, Donovan JM, Drach GW. Torulopsis glabrata urinary tract infections. *J Urol* 1988;139:1245-1249.
89. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3804-3808.

90. Gagliani JN. Coccidioidomycosis: a regional disease of national importance: rethinking approaches for control. *Ann Intern Med* 1999;130:293-300.
91. Geers TA, Gordon SM. Clinical significance of *Candida* species isolated from cerebrospinal fluid following neurosurgery. *Clin Infect Dis* 1999;28:1139-1147.
92. Gelfand MS, McGee ZA, Kaiser AB, et al. Candidal meningitis following bacterial meningitis. *South Med J* 1990;83:567-570.
93. Ghannoum MA. Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome. *J Chemother* 1997;9 Suppl 1:19-24.
94. Godoy H, Reichart PA. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis: report of 21 cases from Argentina. *Mycoses* 2003;46:412-417.
95. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis* 1995;21:1275-1281.
96. Gomez BL, Figueroa JJ, Hamilton AJ, et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategy for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 1997;35:3278-3283.
97. Gonzalez CE, Rinaldi MG, Sugar AM. Zygomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:895-914.
98. Gucalp R, Carlisle P, Gialanella P, et al. Paecilomyces sinusitis in an immunocompromised adult patient: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;23:391-393.
99. Gugni HC. A review of zygomycosis due to *Basidiobolus ranarum*. *Eur J Epidemiol* 1999;15:923-929.
100. Gupta AK, Elewski BE. Non-dermatophyte causes of onychomycosis and superficial mycoses. *Curr Top Med Mycol* 1996;7:87-97.
101. Gupta AK, Summerbell RC. Increased incidence of *Trichophyton tonsurans* tinea capitis in Ontario, Canada between 1985 and 1996. *Med Mycol* 1998;36:55-60.
102. Gupta V, Chawla R, Sen S. *Aureobasidium pullulans* scleritis following keratoplasty: a case report. *Ophthalm Surg Lasers* 2001;32:481-482.
103. Hadjipavlou AG, Mader JT, Naua HJ. Blastomycosis of the lumbar spine: case report and review of the literature, with emphasis on diagnostic laboratory tools and management. *Eur Spine J* 1998;7:416-41.
104. Hagman HM, Madnick EG, D'Agostino AN, et al. Hyphal forms in the central nervous system of patients with coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 2000;30:349-353.
105. Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJ. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2849-2854.
106. Haight DO, Esperanza LE, Greene JN. Case report: cutaneous manifestations of cryptococcosis. *Am J Med Sci* 1994;308:192-195.
107. Hajjeh RA. Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995;21 Suppl 1:S108-S110.
108. Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, et al. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J Infect Dis* 1997;176:499-504.
109. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J Infect* 1991;22:179-182.
110. Hall L, Wohlfiel SL, Roberts GD. Experience with MicroSeq D2 Large Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for identification of commonly encountered clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2003;41:5099-5102.
111. Hall L, Wohlfiel SL, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D21 LSU rDNA Sequencing Kit for the identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2004;42:622-626.
112. Hamann ID, Gillespie RJ, Ferguson JK. Primary cryptococcal cellulitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent host. *Austral J Derm* 1997;38:29-32.
113. Hamilton AJ, Goodley J. Virulence factors of *Cryptococcus aeriformans*. *Curr Topics Med Mycol* 1996;7:19-42.
114. Hamilton AJ. Scrodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffei: current status and future trends. *Med Mycol* 1998;36:351-364.
115. Hanson JM, Spector G, El-Mofty SK. Laryngeal blastomycosis: a commonly missed diagnosis: report of two cases and review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:281-286.
116. Harril WC, Stewart MG, Lee AG, Cernoch P. Chronic rhinocerebral mucormycosis. *Laryngoscope* 1996;106:1292-1297.
117. Hazen KC. New and emerging yeast pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:462-478.
118. Hedderwick S, Kauffman CA. Opportunistic fungal infections: superficial and systemic candidiasis. *Geriatrics* 1997;52:50-54.
119. Hickey WF, Somerville LH, Schoen FJ. Disseminated *Candida glabrata*: report of a uniquely severe infection and literature review. *Am J Clin Pathol* 1983;80:724-727.
120. Hiltbrand JB, McGuin WF. Oropharyngeal histoplasmosis. *South Med J* 1990;83:227.
121. Ho PL, Yuen KY. Aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;34:55-69.
122. Hogevis H, Alestig K. Fungal endocarditis—a report on seven cases and a brief review. *Infection* 1996;24:17-21.
123. Howell SJ, Toohy JS. Sporotrichal arthritis in south central Kansas. *Clin Orthop Relat Res* 1998;346:207-214.
124. Hoy J, Hsu KC, Rolston K, et al. *Trichosporon beigeli* infection: a review. *Rev Infect Dis* 1986;8:959-967.
125. Huang CT, McGarry T, Cooper S, et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome: report of five cases from a non-endemic area. *Arch Intern Med* 1987;147:1181-1184.
126. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. *J Clin Microbiol* 1993;312:419-421.
127. Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, et al. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1998;26:1092-1097.
128. Jabor MA, Greer DL, Amedee RG. Scopulariopsis: an invasive nasal infection. *Am J Rhinol* 1998;12:367-371.
129. Jain S, Koirala J, Castro-Pavia F. Isolated gastrointestinal histoplasmosis: case report and review of the literature. *South Med J* 2004;97:172-174.
130. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infection, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1995;20:1526-1530.
131. Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcemia. *Mycoses* 1998;41:277-280.
132. Kahn DG, Thommes J. Granulomatous orchitis and epididymitis secondary to *Histoplasma capsulatum* and CMV in AIDS. *International Conference on AIDS*, July 19-24, 1992, 8:93.
133. Kalin M, Petrini B. Clinical and laboratory diagnosis of invasive candida infection in neutropenic patients. *Med Oncol* 1996;13:223-231.
134. Kalenic S, Jandric M, Vegar V, et al. *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: a search for risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17:491-496.
135. Kalaoka-Nishimura S, Akiyama H, Saku K, et al. Invasive infection due to *Trichosporon cutaneum* in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 1998;82:484-487.
136. Kaufman L, Standard PG, Anderson SA, et al. Development of specific fluorescent-antibody test for tissue form of *Penicillium marneffei*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2136-2138.
137. Kerking TM, Duma RJ, Shadomy S. The evolution of pulmonary cryptococcosis: clinical implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. *Ann Intern Med* 1981;94:611-616.
138. Khoo SH, Denning DW. Invasive aspergillosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1990;19 Suppl 1:S42-S48.
139. Khoory BJ, Vito L, Dall'Agnola A, Fanos V. *Candida* infections in newborns: a review. *J Chemother* 1999;11:367-378.
140. Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, et al. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1992;14:841-846.
141. Kilburn CD, McKinney DS. Recurrent massive pleural effusion due to pleural, pericardial, and epicardial fibrosis in histoplasmosis. *Chest* 1991;100:1715-1717.
142. King D, Cheever LW, Hood A, et al. Primary invasive cutaneous *Microporum canis* infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1996;34:460-462.
143. Kirkland TN, Fierer J. Coccidioidomycosis: a re-emerging infectious disease. *Emerg Infect Dis* 1996;2:192-199.
144. Klein BSD, Vergeront JM, DiSlavo, et al. Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of transmission along waterways. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1333-1338.
145. Kobayashi GS. Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:393-396.
146. Kohl TD, Lisney M. *Tinea gladiatorum*: wrestling's emerging foe. *Sport Medicine* 2000;29:439-47.
147. Koneman EW, Roberts GD. Practical Laboratory Mycology. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985.
148. Kontoyannis DP, Vanvarian S, Anaissie EJ, et al. Infections due to *Cunninghamella bertholletiae* in patients with cancer: report of three cases and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:925-928.
149. Korfel A, Menssen HD, Schwartz S, Thiel E. Cryptococcosis in Hodgkin's disease: description of two cases and review of the literature. *Ann Hematol* 1998;76:283-286.
150. Krcmery V Jr, et al. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *J Hosp Infect* 1997;36:223-228.
151. Kurtin PJ, McKinney DS, Gupta MR, Driks M. Histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: hematologic and bone marrow manifestations. *Am J Clin Pathol* 1990;93:367-372.
152. Kurup A, Leo YS, Tan AL, Wong SY. Disseminated *Penicillium marneffei* infection: a report of five cases in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:605-609.
153. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992:136.
154. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:310-350.
155. Lee CH, Lan RS, Tai YH, et al. Riu's stain in the diagnosis of pulmonary cryptococcosis: introduction of a new diagnostic method. *Chest* 1988;93:467-470.
156. Lee TM, Greenberger PA, Patterson R, et al. Stage V (fibrotic) allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review of 17 cases followed from diagnosis. *Arch Intern Med* 1987;147:319-323.
157. Lemos LB, Cuo M, Baliga M. Blastomycosis: organ involvement and etiologic diagnosis: a review of 123 patients from Mississippi. *Ann Diagn Pathol* 2000;4:391-406.
158. Lemos LB, Baliga M, Guo M. Blastomycosis: the great pretender can also be an opportunist. Initial clinical diagnosis and underlying diseases in 123 patients. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:194-203.
159. Lemos LB, Soofi, M, Amir E. Blastomycosis and pregnancy. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:211-215.
160. Lewis SM, Lewis BG. Nosocomial transmission of *Trichophyton tonsurans* tinea corporis in a rehabilitation hospital. *Infect Contr Hosp Epidemiol*. 1997;18:322-325.
161. Liu PY. Cryptococcal osteomyelitis: case report and review. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998;30:33-35.
162. Liu D, Cole S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000;49:493-497.
163. Logan JL, Blair JE, Gagliani JN. Coccidioidomycosis complicating solid organ transplantation. *Semin Respir Infect* 2001;16:251-256.
164. Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood: a critical review. *Mycopathologia* 1983;82:49-55.

165. Lopez R, Mason JO, Parker JS, Pappas PG. Intraocular blastomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:805-807.
166. Low CD, Badenoch PR, Coster DJ. *Beauveria bassiana* keratitis cured by deep lamellar dissection. *Cornea* 1997;16:698-699.
167. Lopez AM, Williams PL, Ampel NM. Acute pulmonary coccidioidomycosis mimicking bacterial pneumonia and epileptic shock: a report of two cases. *Am J Med* 1993;95:236-239.
168. Lugo-Somolinos A, Sanchez JL. Prevalence of dermatophytosis in patients with diabetes. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:908-910.
169. Ma JS, Chen PY, Chen CH, Chi CS. Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:267-270.
170. MacDonald PB, Black GB, MacKenzie R. Orthopaedic manifestations of blastomycosis. *J Bone Joint Surg* 1990;72:860-864.
171. Mahmoudi M, Gershwin ME. Sick building syndrome. III. Stachybotrys chartarum J Asthma 2000;37:191-198.
172. Manns BJ, Baylis BW, Urhanski SJ, et al. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996;23:1026-32.
173. Marcellis L, Verhaegen J, Vandeven J, et al. Evaluation of Bactec high blood volume resin media. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:385-391.
174. Martinez M, et al. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002;40:3135-3139.
175. Mathisen DJ, Grillo HC. Clinical manifestations of mediastinal fibrosis and histoplasmosis. *Ann Thorac Surg* 1992;54:1053-1057.
176. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans* a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:136-144.
177. McGinnis MR, Schell WA, Carson J. *Phaeoannellomyces* and the *Phaeococcovetaceae* new dematiaceous blastomycete taxa. *J Med Vet Mycol* 1985;23:179-188.
178. McGinnis MR, Rinaldi MG. Selected medically important fungi and some common synonyms and obsolete names. *Clin Infect Dis* 1997;25:15-17.
179. Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, et al. Antibody response to the 4ds kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:200-206.
180. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004;349-357.
181. Migrino RQ, Hall GS, Lonyworth DL. Deep tissue infections caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: report of a case of prosthetic valve endocarditis and review. *Clin Infect Dis* 1995;21:672-674.
182. Miller HS, Nance MA, Brummitt CF, et al. Fungal infections associated with intravenous drug abuse: a case of localized cerebral phycormycosis. *J Clin Psychiatry* 1988;49:320-322.
183. Minamoto GY, Rosenberg AS. Fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Med Clin North Am* 1997;81:381-409.
184. Minotto R, Bernardi CD, Mallmann LF. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:585-592.
185. MMWR. Coccidioidomycosis—United States, 1991-1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993;22:21-24.
186. Murakawa GJ, Kerschmann R, Berger T. Cutaneous cryptococcus infection and AIDS: report of 12 cases and review of the literature. *Arch Dermatol* 1996;132:545-548.
187. Murayama N, Takimoto R, Kawai M, et al. A case of subcutaneous phaeohyphomycotic cyst due to *Exophiala jeanselmei* complicated with systemic lupus erythematosus. *Mycoses* 2003;46:145-148.
188. Murphy N, Buchanan CR, et al. Infection and colonization of neonates by *Hansenula anomala*. *Lancet* 1986;1:290-293.
189. Murphy RA, Miller WT Jr. Pulmonary mucormycosis. *Semin Roentgenol* 1996;31:83-87.
190. Murray PR. Comparison of the lysis-centrifugation and agitated biphasic blood culture system for detection of fungemia. *J Clin Microbiol* 1991;29:96-98.
191. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al. *Apergillus galactomannan* enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004;42:5517-5522.
192. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27-A. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
193. Nenoff P, Kellermann S, Scholter R, et al. Rhinocerebral zygomycosis following bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia: report of a case and review of the literature. *Mycoses* 1998;42:326-372.
194. Nielsen H, Stenderup J, Brunn B. Fungemia with *Sacharomycetaceae*: report of four cases. *Scand J Infect Dis* 1990;22:582-584.
195. Nielsen PG. Hereditary palmoplantar keratoderma and dermatophytosis in the non-hemmost country of Sweden (Norrbotten). *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh) 1994;1288:1-60.
196. Nightingale SD, Parks JM, Pou DK, et al. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *South Med J* 1990;83:624-630.
197. Nitayanama W. *Penicilliosis marneffei*: another AIDS defining illness in South-east Asia. *Oral Dis* 1999;5:286-293.
198. Nolan MT, Long IP, Macrae DP, Fitzgerald MX. Aspergillosis and lung fibrosis. *Irish J Med Sci* 1985;154:336-342.
199. Nucci M. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and *Zygomycetes* in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:607-612.
200. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. 1994. *J A Acad Dermatol* 1994;31(3 Pt 2):S2-S5.
- 200a. Odds FC. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol* 1999;36:2869-2873.
201. Okhravi N, Dart JK, Towler HM, Lightman S. *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with secondary keratitis: a case report and literature review. *Arch Ophthalmol* 1997;113:1321-1324.
202. Oliver WJ, James SA, Lennard A, et al. Nosocomial transmission of *Saccharomyces cerevisiae* in bone marrow transplant patients. *J Hosp Infect* 2002;52:268-272.
203. O'Neill CM, Ormsby AH, Prayson RA. Cryptococcal myositis: a case report and review of the literature. *Pathology* 1998;30:317-318.
204. O'Sullivan MV, Whitty M, Chahoud C, Miller SM. Histoplasmosis in Australia: a report of a case with a review of the literature. *Austral Dent J* 2004;49:94-97.
205. Opal SM, Asp AA, et al. Efficacy of infection control measures during a nosocomial outbreak of disseminated aspergillosis associated with hospital construction. *J Infect Dis* 1986;153:634-637.
206. Padhye AA, Smith G, McLaughlin D, Standard PG. Comparative evaluation of a chemiluminescent DNA probe and an exoantigen test for rapid identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1992;30:3108-3111.
207. Page LR, Drummond JF, et al. Blastomycosis with oral lesions: report of two cases. *Oral Surg* 1979;47:157-160.
208. Pappagianis D. Marked increase in cases of coccidioidomycosis in California, 1991, 1992, and 1993. *Clin Infect Dis* 1994;19:Suppl 1:S14-S18.
209. Pappas PG, Threlkeld MG, Bedsole GD, et al. Blastomycosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Medicine* (Baltimore) 1993;72:322-325.
210. Pappas PG, Tellez I, Deep AE, et al. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis* 2000;30:65-70.
211. Patterson JE, Barden GB, Pia FJ. Hospital acquired gangrenous mucormycosis. *Yale J Biol Med* 1986;59:453-459.
212. Paya CV, Roberts GD, Cockerill FR III. Laboratory methods for the diagnosis of disseminated histoplasmosis: clinical importance of the lysis-centrifugation blood culture technique. *Mayo Clin Proc* 1987;62:480-485.
213. Pema K, Diaz J, Guerra LG, et al. Disseminated cutaneous cryptococcosis. Comparison of clinical manifestations in the pre-AIDS and AIDS eras. *Arch Intern Med* 1994;154:1032-1034.
214. Perez RE, Smith M, McClelland J, et al. *Pseudallescheria boydii* brain abscess: complication of an intravenous catheter. *Am J Med* 1988;84:359-362.
215. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22:Suppl 2:S112-S118.
216. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, et al. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by E test. *J Clin Microbiol* 2001;39:339-342.
217. Pfaffer MA. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect* 1995;30:Suppl:329-338.
218. Pfaffer MA, Messer SA, Blomstrom A, et al. Multi-site reproducibility of the E-test MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1996;34:1691-1693.
219. Pfaffer MA, Rex H, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis* 1997;24:776-784.
220. Pfaffer MA, Bale M, Buchelman B, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth microdilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995;33:1104-1107.
221. Pfaffer MA, Messer SA, Mills K, et al. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001;39:4387-4389.
222. Phillips P, Wood WS, Phillips G, Rinaldi MG. Invasive hyalohyphomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* in a patient undergoing allogeneic bone marrow transplant. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:429-432.
223. Pickles RW, Pacey DE, Muir DB, Merrell WH. Experience with infection by *Scedosporium prolificans* including apparent cure with fluconazole therapy. *J Infect Dis* 1996;33:193-197.
224. Pieckova E, Jesenska Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann Agricult Environ Med* 1999;6:1-11.
225. Prabhu RM, Patel R. Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clinical Microbiol Infect* 2004;10:Suppl 1:31-47.
226. Prichard JB, Sorotkin RA, Rames RE III. Cutaneous manifestations of disseminated coccidioidomycosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 1987;39:203-205.
227. Purvis RS, Diven DG, Drechsel RD, et al. Sporotrichosis presenting as arthritis and subcutaneous nodules. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:879-884.
228. Reder PA, Neel HB III, Neel HB. Blastomycosis in otolaryngology: review of a large series. *Laryngoscope* 1993;103:53-58.
229. Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. *Clin Infect Dis* 2004;38:206-216.
230. Rex JH, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards: recommended broth microdilution testing of ketoconazole and itraconazole. *Clin Microbiol* 1996;34:816-817.
231. Rhame FS. Prevention of nosocomial aspergillosis. *J Hosp Infect* 1991;18:466-467.
232. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycosis in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:236-301.
233. Rinaldi MG. Phaeohyphomycosis. *Derm Clin* 1996;14:147-153.
234. Rippon RW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988.

235. Roller A, Westblom TU. Microsporium nanum infection in hog farmers. Am Acad Dermatol 1986;15:935-939.
236. Romano C, Paccagnini E, Difonzo EM. Onychomycosis caused by Alternaria spp. in Tuscany, Italy from 1985 to 1999. Mycoses 2001;44:73-76.
237. Rosales CM, Jackson MA, Zwick D. Malassezia furfur meningitis associated with total parenteral nutrition subdural effusion. Pediatr Dev Pathol 2004;7:86-90.
238. Sabota J, Brodell R, Rutecki GW, Hoppes WL. Severe tinea barbae due to Trichophyton verrucosum infection in dairy farmers. Clin Infect Dis 1996;23:1308-1310.
239. Salkin IF, Martinez JA, Kemm ME. Opportunistic infection of the spleen caused by Aureobasidium pullulans. J Clin Microbiol 1986;23:828-831.
240. Salkin IF, McGinnis MR, Dykstra MJ, Renaldi MG. Scedosporium inflatum: an emerging pathogen. J Clin Microbiol 1988;26:498-503.
241. Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, da Silva Lacaz C. Molecular detection and identification of Paracoccidioides brasiliensis. J Clin Microbiol 1997;135:1894-1896.
242. Sant'Anna GD, Mauri M, Arrarte JL, Camargo H Jr. Laryngeal manifestations of paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125:1375-1378.
243. Sarosi GA, et al. Laboratory diagnosis of mycotic and specific fungal infections. Am Rev Respir Dis 1985;132:1373-1379.
244. Sarosi GA, Johnson PC. Disseminated histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992;14:Suppl 1:S60-S67.
245. Sataloff RT, Wilborn A, Prestipino A, et al. Histoplasmosis of the larynx. Am J Otolaryngol 1993;14:199-205.
246. Schell WA, Perfect JR. Fatal, disseminated Acremonium strictum infection in a neutropenic host. J Clin Microbiol 1990;34:1223-1236.
247. Schliemann R, Glasmacher A, Bailly E, et al. Geotrichum capitatum septicemia in neutropenic patients: case report and review of the literature. Mycoses 1998;4:113-116.
248. Schubert MS. Allergic fungal sinusitis: pathogenesis and management strategies. Drugs 2004;64:363-374.
249. Seddon ME, Thomas MG. Invasive disease due to Epidermophyton floccosum in an immunocompromised patient with Behçet's syndrome. Clin Infect Dis 1997;25:153-154.
250. Sellier P, Monsuez JJ, Lacroix C, et al. Recurrent subcutaneous infection due to Scopulariopsis brevicaulis in a liver transplant recipient. Clin Infect Dis 2000;30:820-823.
251. Sennesh J, Cooper JN, Perfect JR. Disseminated zygomycosis: report of four cases and review. Rev Infect Dis 1989;11:741-754.
252. Severo LC, Kauer CL, Oliveira FD, et al. Paracoccidioidomycosis of the male genital tract: report of eleven cases and review of Brazilian literature. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2000;42:38-40.
253. Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL. Comparison of broth microdilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. J Clin Microbiol 1994;32:2099-2102.
254. Sharma OP, Chwogle R. Many faces of pulmonary aspergillosis. Eur Respir J 1998;12:705-715.
255. Sigier I, Harris JL, Dixon DM, et al. Microbiology and potential virulence of Sporothrix cyanescens, a fungus rarely isolated from blood and skin. J Clin Microbiol 1990;28:1009-1015.
256. Silva JP, De Souza W, Rozenal S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonian Region (Brazil). Mycopathologia 1998;143:171-175.
257. Simarro E, Mann F, Morales A, et al. Fungemia due to Scedosporium prolificans: a description of two cases with fatal outcome. Clin Microbiol Infect 2001;7:645-647.
258. Simmons RB, Price DL, Noble JA, et al. Fungal colonization of air filters from hospital. Am Ind Hyg Assoc J 1997;58:900-904.
259. Singh G, Wijesurendra CS, Green JT. Disseminated aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Int J STD AIDS 1994;5:63-66.
260. Singh VR, Smith DK, Lawrence J, et al. Coccidioidomycosis in patients infected with human immunodeficiency virus: review of 91 cases at a single institution. Clin Infect Dis 1996;23:563-568.
261. Sobel JD, Vazquez JA. Fungal infections of the urinary tract. World J Urol 1999;17:420-424.
262. Staib F, Arasteh K. Chlamydospore formation on Staib agar: observations made before Candida dubliniensis was described. Mycoses 2001;44:23-27.
263. Stiefel P, Parnies E, Miranda ML, et al. Cryptococcal peritonitis: report of a case and review of the literature. Hepato-Gastroenterol 1999;46:1618-1622.
264. Stockman L, Clark KA, Hung JM, Roberts GD. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, and Histoplasma capsulatum. J Clin Microbiol 1993;31:845-850.
265. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward T, et al. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J Clin Microbiol 1994;32:2299-2300.
266. Suh KN, Anekthananon T, Mariuz PR. Gastrointestinal histoplasmosis in patients with AIDS: case report and review. Clin Infect Dis 2001;32:483-491.
267. Sullivan DJ, Westermeng TJ, Haynes KA, et al. Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. J Microbiol 1995;141:1507-1521.
268. Sweeney DA, Caserta MT, Korones DN. A ten year old boy with pulmonary nodule secondary to Cryptococcus neoformans: case report and review of the literature. Pediatr Infect Dis J 2003;22:1089-1093.
269. Sweet D, Reid M. Disseminated neonatal Trichosporon beigelii infection: successful treatment with liposomal amphotericin B. J Infect 1998;36:120-121.
270. Syrjanen S, Valle SL, Anttonen J. Oral candidal infection as a sign of HIV infection in homosexual men. Oral Surg 1988;55:36-40.
271. Tamm M, Matouf M, Glanville A. Pulmonary scedosporium infection following lung transplantation. Transplant Infect Dis 2001;3:189-194.
272. Tawfik OW, Papasian CJ, Dixon AY, Potter LM. Saccharomyces cerevisiae pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. J Clin Microbiol 1989;27:1689-1691.
273. Thammyaya A, Sanyal M. Exophiala jeanselmei causing mycetoma pedis in India Sabouraudia 1980;18:91-95.
274. Tosti A, Piraccini BM, Stinchi C, Lorenzi S. Onychomycosis due to Scopulariopsis brevicaulis: clinical features and response to systemic antifungals. Br J Dermatol 1996;135:799-802.
275. Truett AA, Crum NF. Coccidioidomycosis of the prostate gland: two cases and a review of the literature. South Med J 2004;97:419-422.
276. Vainrub B, Macareno A, Mandel S, Musher DM. Wound zygomycosis (mucormycosis) in otherwise healthy adults. Am J Med 1988;84:546-548.
277. Vajpayee RB, Gupta SK, Bareja U, Kishore K. Ocular atopy and mycotic keratitis. Ann Ophthalmol 1990;22:369-372.
278. Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. Med Mycol 1998;36:Suppl 1:119-128.
279. Van den Saffele JK, Boelaert JR. Zygomycosis in HIV-positive patients: a review of the literature. Mycoses 1996;39:44-84.
280. Verweie PE, Breuker IM, Rijs ASMM, Maes JFGM. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. J Clin Pathol 1999;52:271-273.
281. Wack EE, Ampel NM, Galgiani NJ, Bronnimann DA. Coccidioidomycosis during pregnancies. Chest 1988;94:376-379.
282. Walsh TJ. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with neoplastic diseases. Semin Respir Infect 1990;5:111-122.
283. Wang JP, Granlund KF, Bozzette SA, et al. Bursal sporotrichosis: case report and review. Clin Infect Dis 2000;31:615-616.
284. Weems JJ Jr. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 1992;14:756-766.
285. Weitzman I. A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1993-1995. J Med Vet Mycol 1998;34:285-287.
286. Westenfeld F, Alston WK, Winn WC Jr. Complicated soft tissue infection with prepatellar bursitis caused by Paecilomyces lilacinus in an immunocompetent host: case report and review. J Clin Microbiol 1996;34:1559-1562.
287. Wheat J. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. Clin Microbiol Rev 1995;8:146-159.
288. Wheat LJ, Battiger DE, Sathapattayavongs B. Histoplasma capsulatum in the central nervous system: a clinical review. Medicine (Baltimore) 1990;69:244-260.
289. Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Williams B, et al. Diagnosis of histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome by detection of Histoplasma capsulatum polysaccharide antigen in bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis 1992;145:1421-1424.
290. Wheat LJ. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Curr Top Med Mycol 1996;7:7-18.
291. Wheat LJ. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: a review. Semin Respir Infect 2001;16:131-140.
292. Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. Infect Dis Clin North Am 2003;17:1-19.
293. White TC, Bowden RA, Marr KA. Clinical cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998;11:382-402.
294. Wilhelmus DR, Robinson NM, Font RA, et al. Fungal keratitis in contact lens wearers. Am J Ophthalmol 1988;106:708-714.
295. Wilhelmus KR, Jones DB. Curvularia keratitis. Trans Am Ophthalmol Soc 2001;99:111-130.
296. Williams B, Fojtasek M, Connolly-Stringfield P, Wheat J. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis, Ind. Arch Pathol Lab Med 1994;118:1205-1208.
297. Wilmington M, Aly R, Frieden IJ. Trichophyton tonsurans tinea capitis in the San Francisco Bay area: increased infection demonstrated in a 20-year survey of fungal infections from 1974 to 1994. J Med Veterin Mycol 1990;34:285-287.
298. Wilson CM, O'Rourke EJ, McGinnis MR, Salkin IF. Scedosporium inflatum: clinical spectrum of a newly recognized pathogen. J Infect Dis 1990;161:102-107.
299. Wingard JR. Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patient. Clin Infect Dis 1995;20:115-125.
300. Winn RE, Anderson J, Piper J, et al. Systemic sporotrichosis treated with itraconazole. Clin Infect Dis 1993;17:210-217.
301. Woods GL, Goldsmith JC. Aspergillus infection of the central nervous system in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Neurol 1990;47:181-184.
302. Wortman PD. Concurrent chromoblastomycosis caused by Fonsecaea pedrosoi and actinomycetoma caused by Nocardia brasiliensis. J Am Acad Dermatol 1995;32:390-392.
303. Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial candida: epidemiology, transmission, prevention. Infect Dis Clin North Am 1997;11:411-425.
304. Yoon SA, Vazquez JA, Steffan PE, et al. High frequency, reversible switching of Candida lusitanae clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:836-845.
305. Yoss BS, Sautter RL, Brenker HJ. Trichosporon beigelii, a new neonatal pathogen. Am J Perinatol 1997;14:113-117.
306. Zhu LP, Shi YZ, Weng XH, Mueller FM. Pulmonary cryptococcosis associated with cryptococcal meningitis in non-AIDS patients. Mycoses 2002;45:111-117.
307. Zmierzczak H, Goemaere S, Mielants H, et al. Candida glabrata arthritis: case report and review of the literature of arthritis. Clin Rheumatol 1999;18:406-409.

Observaciones preliminares sugestivas de *Zygomycetes*

- Colonias que crecen rápidamente con un margen mal definido, que cubren la placa de Petri en 48-72 horas
- La superficie de la colonia presenta una consistencia vellosa y puede tornarse espiculada a medida que se producen los esporangios
- Las hifas presentan diámetros irregulares, son anchas y acintadas y no tabicadas
- Las esporangiosporas nacen dentro de esporangios saculares esféricos o cilíndricos sujetos en los extremos de los esporangióforos

Formación de rizoides similares a raíces

Sí

No

Esporangióforos que se originan en forma nodal	Esporangióforos que se originan en forma internodal Apófisis prominente	Conidios esféricos que se originan en la superficie de un esporangio globuloso	Esporangiosporas que se originan en los esporangios cilíndricos y dispuestos como "pétalos de margarita" alrededor de una columela esférica	Esporangióforos ampliamente curvados hacia atrás	Esporangióforos a menudo ramificados, sin dilatación, donde se unen el esporangióforo y el esporangio
Especies de <i>Rhizopus</i>	Especies de <i>Absidia</i>	Especies de <i>Cunninghamella</i>	Especies de <i>Syncephalastrum</i>	Especies de <i>Circinella</i>	Especies de <i>Mucor</i>

Diagrama 21-1 Algoritmo que muestra la identificación de géneros de zigomicetos.

Observaciones preliminares sugestivas de un hongo filamentoso hialino

- Colonias que crecen rápidamente, enteras, algodonosas a granulares, blancas o con colores pastel variables
- Las hifas son angostas, tabicadas, hialinas y tienen paredes paralelas

Conidios en cadenas

Conidios en racimos

Conidios que se originan de modo aislado

Colonias verdes y granulares; fiálides ramificadas y romas; conidios de 2-3 μm , esféricos	Colonias verdes a verde amarillentas; fiálides adelgazadas; conidios de 2-3 μm elípticos, con tamaño y tinción irregulares	Colonias <i>beige</i> , granulares y rugosas de modo radial; 4-6 μm , conidios con paredes rugosas y forma de limón con bases truncadas	Colonias blanco grisáceas a salmón, lisas y sin vellosidades; conidios elípticos dispuestos como cúmulos de letras chinas	Colonias algodonosas, con la superficie y el reverso con pigmento rosa intenso o púrpura; macroconidios grandes, multicelulares, con forma de hoz	Colonias verdes que se extienden como el césped sin un margen; ovillos de conidios esféricos sostenidos por fiálides adelgazadas y digitiformes	Colonias que se extienden como un césped verde o amarillo sin un margen; ovillos de conidios esféricos que se originan lateralmente en las puntas adelgazadas de las fiálides	Colonias algodonosas de color gris ratón; conidios elípticos que se oscurecen con el tiempo y nacen de las puntas de conidióforos delicados	Colonias algodonosas blanco grisáceas; conidios elípticos y no pigmentados que nacen de las puntas de conidióforos delicados, similares a los de <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Colonias algodonosas blanco grisáceas; macroconidios grandes y esféricos, de paredes rugosas que se asemejan a los de <i>Histoplasma capsulatum</i>	Colonias algodonosas blanco grisáceas; conidios pequeños y elípticos en racimos laxos, cada uno adherido por un delicado conidióforo geniculado
Especies de <i>Penicillium</i>	Especies de <i>Paecilomyces</i>	Especies de <i>Scopulariopsis</i>	Especies de <i>Acremonium</i>	Especies de <i>Fusarium</i>	Especies de <i>Gliocladium</i>	Especies de <i>Trichoderma</i>	Especies de <i>Scedosporium</i>	Especies de <i>Chrysosporium</i>	Especies de <i>Sepedonium</i>	Especies de <i>Beauveria</i>

GÉNERO *ASPERGILLUS*

Esporulación desde la mitad superior de la vesícula

Fiálides dispuestas de forma circular

Observación de cleistotecios

Fiálides uniseriadas y compactas	Fiálides biseriadas y compactas	Fiálides biseriadas laxas	Conidios lisos y claros o <i>beige</i>	Conidios rugosos y negros	Colonias blancas y lisas	Colonias multicolores, verdes, amarillas, blancas
Colonias verdes, granulares y a menudo rugosas	Colonias <i>beige</i> , granulares y con rugosidades radiales	Colonias gris verdosas a castañas con placas amarillas	Colonias <i>beige</i> , algodonosas o granulares	Superficie de la colonia negro azabache		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>

Diagrama 21-2 Algoritmo que muestra la identificación por el laboratorio de los hongos filamentosos hialinos de crecimiento rápido.

Observaciones preliminares sugestivas de dermatófitos

- Las colonias crecen en 3 a 5 días con márgenes diferenciados
- La superficie de la colonia presenta un aspecto entre algodonoso y granular. La pigmentación de la superficie varía del blanco grisáceo al beige amarillento
- Las hifas son angostas, hialinas y tabicadas
- Se producen combinaciones de microconidios y macroconidios, cuyo tamaño, forma y disposición proporcionan las identificaciones de género y especie

EXAMEN MICROSCÓPICO

Macroaleuriosporas grandes, multicelulares, con forma de mazas, paredes delgadas y lisas

Macroaleuriosporas multicelulares, paredes gruesas y rugosas.
Microconidios escasos o ausentes

Microconidios abundantes; macroaleuriosporas escasas o ausentes, paredes delgadas y lisas

Aleuriosporas: no suelen estar presentes; sólo se observan hifas

Colonia de color caqui	Macroaleuriosporas fusiformes, extremo puntiagudo y curvo	Macroaleuriosporas en forma de maza y extremo redondeado	Microconidios esféricos, uniformes, en racimos laxos	Microconidios con forma de lágrima que nacen lateralmente de las hifas	Microconidios de tamaño irregular; se observan formas de globo	Hifas tipo astas y clamidosporas en cadenas
	Reverso de la colonia de color amarillo limón	Colonias de color canela		Pigmento rojo vino en el agar	No crecen en el agar <i>Trichophyton</i> 1	Crecimiento lento. La superficie de la colonia es lisa, apilada y parcialmente sumergida
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>

Diagrama 21-3 Algoritmo que muestra la identificación de género de los dermatófitos encontrados con mayor frecuencia.

Observaciones preliminares sugestivas de un hongo dimorfo

- Colonias que crecen lentamente; por lo general requieren de 7 a 14 días para el aislamiento primario
- La superficie de la colonia es blanco grisácea y de consistencia de telaraña
- Las hifas son delicadas, tabicadas y hialinas. Puede observarse la disposición en haces paralelos
- La identificación de especie se hace sobre la base del tamaño, la forma, la morfología y la disposición de los conidios

EXAMEN MICROSCÓPICO

Conidios en forma de maza, con paredes delgadas y lisas que nacen en los extremos de conidióforos largos y rectos (piruletas o chupetines)	Hifas segmentadas en atroconidios con forma de barril, separados por células que no se tiñen (tinción alternante)	Microconidios diminutos, producidos temprano. Más tarde, los macroconidios grandes, esféricos y especulados son diagnósticos	Conidios pequeños, en forma de maza, producidos de modo radial en el extremo de un conidióforo recto con una disposición que se asemeja a una margarita	Conidios pequeños, de pared delgada, que nacen de los extremos de conidióforos largos y rectos
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
CONFIRMAR LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE MEDIANTE LA CONVERSIÓN A LEVADURA (O SONDA DE ÁCIDO NUCLEICO)				
Levaduras esféricas, 10-15 µm de diámetro, con un solo brote de base ancha	Esférulas grandes, 75-200 µm de diámetro, que contienen endosporas de 3-5 µm observadas en cortes teñidos de tejido	Conidios diminutos, esféricos, hialinos, de paredes lisas, dispuestos en racimos. Se observan intracelulares en cortes teñidos de tejido	Conidios alargados, de 2-8 µm de longitud que brotan en forma individual, a menudo con forma de cigarro	Célula madre grande, esférica, lisa, de pared gruesa, con brotes múltiples similar a una rueda de timón

Diagrama 21-4 Algoritmo que muestra la identificación de género de los hongos dimorfos.

Observaciones preliminares sugestivas de un hongo filamentoso dematiáceo

- Las colonias crecen en 3 a 5 días, son algodonosas o vellosas, gris castaño o negro castaño; el reverso es negro azabache
- Hifas angostas, tabicadas, con pigmento castaño y paredes paralelas

Macroconidios muriformes

Macroconidios con tabiques transversales

Picnidios o conidios individuales

Macroconidios multicelulares, muriformes, como palillos de tambor, que nacen en cadenas aisladas o ramificadas, con el extremo como de uno que se ensambla con el extremo adelgazado del siguiente	Macroconidios multicelulares, muriformes, que nacen individualmente desde los extremos de conidióforos geniculados con un origen simpodial	Macroconidios multicelulares, muriformes, que nacen de modo individual desde los extremos de conidióforos cortos simulando una "bala de algodón sobre un palo"	Macroconidios multicelulares, muriformes, maduros e inmaduros, que nacen de modo individual y se agregan en racimos laxos	Macroconidios de 3 a 4 células divididas sólo por tabiques transversales. El centro de las células crece con más rapidez, se agranda y da el aspecto de un húmero	Conidióforos oscuros, simples o ramificados, geniculados, que tienen conidios cilíndricos en un patrón simpodial. Los conidios con múltiples células están recubiertos de paredes gruesas tabicadas. Los que germinan presentan tubos germinales en cada extremo de los conidios	Conidióforos y conidios similares en el aspecto a los de las especies de <i>Bipolaris</i> . Se observa un solo tubo germinal que surge en ángulo recto de los conidios que germinan	Conidióforos oscuros, erectos y geniculados. Conidios alargados, con forma de lápiz, multibicados que se originan individualmente en un patrón simpodial. Cada conidio tiene un nudo protuberante prominente y oscuro desde la célula hilar	Conidios grandes, oblongos a esféricos, negro azabache, que nacen de modo individual desde los extremos de conidióforos cortos y anchos, cada uno con una concavidad semejante a un cáliz dentro del cual están los conidios	Conidios pequeños, hialinos, esféricos a elípticos que se forman dentro de picnidios saculares, globulosos o subglobulosos, dispersos entre hifas tabicadas castañas, con paredes paralelas	Peritecios grandes y globulosos, con forma de botella, castaño oscuro a negros, formados en el substrato entre hifas tabicadas con tinción castaña. Hifas alargadas distintivas, similares a pelos, que salen desde el interior y dan aspecto de patas de araña
Especies de <i>Alternaria</i>	Especies de <i>Ulocladium</i>	Especies de <i>Stemphylium</i>	Especies de <i>Epicoccum</i>	Especies de <i>Curvularia</i>	Especies de <i>Bipolaris</i>	Especies de <i>Drechslera</i>	Especies de <i>Exserohilum</i>	Especies de <i>Nigrospora</i>	Especies de <i>Phoma</i>	Especies de <i>Chaetomium</i>

Diagrama 21-5 Algoritmo que muestra la identificación de los hongos filamentosos dematiáceos de crecimiento rápido.

Observaciones preliminares sugestivas de los agentes de cromomicosis y micetomas

- Colonias que crecen en 3 a 5 días con márgenes diferenciados
- La superficie de la colonia presenta consistencia algodonosa a granular. La pigmentación de la superficie es blanco grisácea a castaño negruzca; el reverso es negro azabache
- Las hifas son relativamente anchas, con paredes paralelas, con tabiques distintivos y amarillo oscuro a castaños
- Los conidios nacen en cadenas, racimos o aislados desde los extremos o los lados de las fiálides distintivos para cada género

EXAMEN MICROSCÓPICO

Conidios originados en cadenas			Conidios originados en racimos			Conidios originados en forma individual		
Cadenas cortas y ramificadas de conidios elípticos con cicatrices (zonas libres de citoplasma) conocidas como disyuntores	Cadenas largas (35 células o más) de conidios elípticos sin disyuntores	Colonias de crecimiento rápido a 42 °C. Esporulación tipo cladosporio	Fiálides cortas con forma de urna		Fiálide larga y adelgazada	Fiálides simpodiales que tienen conidios elípticos (esporulación tipo acroteca)		Conidios que nacen lateralmente desde las hifas (esporulación tipo rinocladiella)
			Extremo de la fiálide con forma de botella	Extremo de la fiálide con forma de plato		Conidios dispuestos de modo laxo	Conidios dispuestos de modo compacto	
<i>Cladophialophora carrionii</i>	<i>Cladophialophora bantiana</i>	Especies de <i>Cladosporium</i>	<i>Phialophora verrucosa</i>	<i>Phialophora richardsiae</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Fonsecaea* pedrosoi</i>	<i>Fonsecaea compacta</i>	Especies de <i>Rhinocladiella</i>

* Las diferentes especies de Fonsecaea pueden mostrar varias combinaciones de esporulación tipo cladosporio, fialófora y acroteca.

Diagrama 21-6 Algoritmo que muestra la identificación de género de los agentes de cromomicosis y micetomas.

Observaciones preliminares sugestivas de levaduras

- Las colonias crecen en 24-72 horas
- La superficie de la colonia es lisa a mucóide; puede desarrollar pies o micelio aéreo bajo. La pigmentación de la superficie varía del blanco al amarillo y del rosa rojizo al negro
- Ausencia de hifas verdaderas, salvo las especies que producen artroconidios
- Puede haber pseudohifas o no
- Se producen blastoconidios cuyos tamaño, forma y disposición permiten las identificaciones de género o especie

EXAMEN MICROSCÓPICO

Producción de pseudohifas y blastoconidios		Producción de hifas verdaderas y artroconidios		Ausencia de hifas			Levaduras negras		
Prueba del tubo germinal		Prueba de la ureasa		Prueba de la ureasa			Aneloconidios		
Positivo	Negativo	Positiva	Negativa	Positiva		Positiva	Negativa	No	Sí
Clamidosporas en agar harina de maíz	Ausencia de clamidosporas en agar harina de maíz			Prueba del ácido cafeico		Colonias anaranjadas a rojas		Hifas con tinción oscura que producen blastoconidios hialinos	Levaduras formadas por dos células con tabiques transversales que las dividen (anélidos)
<i>Candida albicans</i>	Especies de <i>Candida</i>	Especies de <i>Trichosporon</i>	Especies de <i>Geotrichum</i>	Positiva	Negativa	Especies de <i>Rhodotorula</i>	Especies de <i>Saccharomyces</i> Especies de <i>Hansenula</i> Especies de <i>Malassezia</i> Especies de <i>Blastoschizomyces</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Especies de <i>Phaeoannellomyces</i>
				<i>Cryptococcus neoformans</i>	Especies de <i>Cryptococcus</i>				
	Realizar identificación presuntiva sobre la base de los patrones de crecimiento en el agar harina de maíz.	Buscar los blastoconidios en los ángulos de los artroconidios (“orejas de conejo”) en el agar harina de maíz	Buscar los tubos germinales en ángulo recto desde los ángulos de los artroconidios (“palo de jockey”) en el agar harina de maíz	Buscar las levaduras de tamaño irregular rodeadas por material capsular		Inositol negativo			Pueden producir hifas y fiálides cuando maduran

Diagrama 21-7 Algoritmo que muestra la identificación de género de las levaduras encontradas con mayor frecuencia.

Parasitología

Riesgo y prevención de las infecciones parasitarias

Manifestaciones clínicas de las enfermedades parasitarias

Recolección, transporte y procesamiento de las muestras

Muestras fecales

Conservación de muestras clínicas

Examen visual

Procesamiento de muestras de heces recién emitidas para el examen de huevos y parásitos

Examen de muestras intestinales no fecales

Examen de muestras extraintestinales

Espuito

Orina y líquidos corporales

Biopsias y aspirados de tejidos

Raspados o biopsia de córnea

Biopsia de músculo

Sangre

Identificación y diferenciación de parásitos

Ciclos vitales de los parásitos humanos

Protozoos intestinales

Amebas intestinales

Amebiasis y *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica y *Entamoeba coli*

Diagnóstico serológico de amebiasis

Entamoeba histolytica no patógena: *Entamoeba dispar*

Otras amebas intestinales

Protozoos de clasificación incierta

Flagelados intestinales

Giardia lamblia

Otros flagelados intestinales

Ciliados: *Balantidium coli*

Coccidios

Cryptosporidium parvum

Cyclospora cayetanensis

Isospora belli

Especies de *Sarcocystis*

Filo *Microsporium*: especies de *Microsporidium*

Nematodos

Ascariasis y *Ascaris lumbricoides*

Tricocefalosis (trichuriasis) y *Trichuris trichiura*

Enterobius vermicularis (oxiuros)

Uncinarias

Estrongiloidiasis y *Strongyloides stercoralis*

Especies de *Trichostrongylus*

Capillaria philippinensis

Cestodos

Taenia solium y *Taenia saginata*

Diphyllobothrium latum: tenia gigante de los peces

Especies de *Hymenolepis*

Dipylidium caninum

Trematodos

Esquistosomas

Fasciola hepatica y *Fasciolopsis buski*

Clonorchis sinensis

Paragonimus westermani

Parásitos de la sangre y los tejidos

Paludismo

Babesia

Hemoflagelados: especies de *Leishmania* y de *Trypanosoma*

Leishmaniasis y especies de *Leishmania*

Tripanosomiasis

Filarias y filariasis

Oncocercosis y *Onchocerca volvulus*

Dracunculiasis

Dirofilariasis

Infecciones tisulares por protozoos

Toxoplasma gondii

Pneumocystis jiroveci

Infecciones parasitarias por otras larvas tisulares

Triquinosis

Larva migrans visceral

Larva migrans cutánea - *Toxocara*

Anisakiasis

Gnatostomiasis

Angiostrongiliasis

Hidatidosis (enfermedad hidatídica o equinococosis)

Especies de *Multiceps* - cenurosis

Esparganosis: *Spirometra mansonioides*

Diagnóstico serológico de las infecciones parasitarias

Fármacos utilizados con frecuencia en el tratamiento de las enfermedades parasitarias

El conocimiento de los parásitos comunes data desde tiempos remotos. En escritos antiguos de muchos países se mencionan gusanos cuya descripción es compatible con *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides* y tenias. También se describieron ciertos síntomas que causan estos parásitos.¹³⁵ Los ectoparásitos, como piojos, pulgas y garrapatas, no han sido pasados por alto. Ruffer²³¹ informó sobre la observación de huevos calcificados de *Schistosoma haematobium* en los riñones de dos momias egipcias de la dinastía 20 (1200-1090 a. C.), lo que prueba la existencia de esta infección en el antiguo Egipto. Los colonos chinos de las épocas primitivas estaban familiarizados con el cuadro clínico de infecciones graves por uncinarias, la denominada “lenta enfermedad”.

Los parásitos imaginarios han desempeñado un papel importante en medicina desde tiempos remotos. El dolor de muelas se atribuyó a la acción perforante particular de un “gusano de los dientes”. De manera similar, el exudado purulento de los oídos y de los ojos provenía de los gusanos que afectaban esas estructuras. Los gusanos cardíacos eran la causa de la muerte súbita; se describían los “gusanos sonoros”, tal vez relacionados con los ovillos de áscaris en el intestino, con la advertencia de que los que recibían medicación permanecieran callados durante el tratamiento por la posibilidad de que el parásito pudiese escuchar y no se eliminara.¹³⁵

Durante siglos se consideró que el origen de los parásitos, entre otras criaturas pequeñas, se debía a la generación espontánea. La opinión habitual acerca de los parásitos, así como de otros organismos vivos, era que podían crearse por cierta combinación adecuada de elementos opuestos. Se sabía que las tenias se asociaban con la ingestión de carne cruda; consideraban que su origen estaba en el estómago por los alimentos macerados, antes de que se eliminaran por las heces. Desde la época de los romanos se creía que las tenias eran tiras de mucosa intestinal; para muchos, los gusanos áscaris se originaban en la flema. Según los teóricos antiguos, algo imperceptible o invisible estaba dotado de todas las potencialidades; entonces,

por acción de un principio metafísico o de una fuerza fundamental podían crearse los seres vivos.²⁵

Las mejoras en el microscopio compuesto permitieron una mayor comprensión de los parásitos protozoos. Se le adjudica a van Leeuwenhoek haber realizado la primera observación de los protozoos, un “animáculo móvil” en el intestino del tábano, que poco después encontró en sus propias heces. La opinión actual es que se trataba de *Giardia lamblia*. Sin embargo, debió pasar más de un siglo antes de que se avanzara en el estudio de los protozoos. Con el amplio uso del microscopio compuesto, a principios del siglo xx se definieron las morfologías y los ciclos vitales de casi todos los parásitos que afectan a los seres humanos. La cronología de estos adelantos está bien detallada en las explicaciones históricas de Foster.⁸⁴

A pesar de la implementación de medidas preventivas para reducir la prevalencia de enfermedades parasitarias en la mayoría de los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, los parásitos humanos aún determinan inestimables pérdidas de vidas, amplia morbilidad y retraso del desarrollo económico. Según un informe de la distribución de parásitos humanos en China, “las tasas de prevalencia (de las enfermedades parasitarias) son de tal magnitud que resulta difícil concebir la estadística descriptiva”.²⁹⁵ Como se afirmó en este informe, “el número total de infecciones por protozoos y helmintos que existen en la actualidad en el mundo supera al de la población total ya que las infecciones son la norma más que la excepción”. En el recuadro 22-1 se mencionan las prevalencias estimadas de las enfermedades parasitarias humanas, sobre la base de estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud y otras fuentes de información.

En los Estados Unidos, ciertas especies de parásitos son más frecuentes que otras y lo más importante debe ser la experiencia para su identificación. En un programa de vigilancia sobre parásitos intestinales de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), se encontraron formas parasitarias en 64 901 (15,6%) de más de 400 000 muestras de heces examinadas.²⁹ *Giardia lamblia* se halló en el 3,8% de todas las mues-

Recuadro 22-1 Prevalencia mundial estimada de las enfermedades parasitarias*

Enfermedad parasitaria	Prevalencia global (millones de personas)
Amebiasis	500
Giardiasis	200
Ascariasis	800
Tricocefalosis (trichuriasis)	800
Uncinariasis	900
Estrongiloidiasis	50-100
Enterobiasis (oxiuriasis)	42 (países desarrollados)
Teniasis (cisticercosis)	1% de la población en países endémicos
Difilobotriasis	5-10
Esquistosomiasis	200
Fascioliasis	1-2
Clonorquiasis	20 (China)
Paragonimiasis	4-5
Paludismo	100-270
Leishmaniasis	12
Tripanosomiasis africana	20 000 casos nuevos/año
Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas)	15
Oncocercosis	20
Filariasis	90
Hidatidosis	1/100 000-150/100 000

* Las cifras de incidencia registradas aquí son estimaciones aproximadas que sólo tratan de ilustrar la enorme magnitud de las infecciones. Hay variaciones en las cifras publicadas en diferentes fuentes, lo cual refleja tal vez el acceso incompleto a la información o a diferencias de extrapolación de datos conocidos a toda la población.

tras de heces, huevos de *Trichuris trichiura* en el 2,7%, huevos de *Ascaris lumbricoides* en el 2,3%, huevos de *Enterobius vermicularis* en el 1,6% (no es un verdadero reflejo de la incidencia de esta enfermedad, ya que el examen de la muestra de heces no es el método más sensible para establecer el diagnóstico) y *Entamoeba histolytica* en el 0,6% de todas las muestras de heces. La difilobotriasis, como esparganosis y anisakiasis también aumentaron la frecuencia a medida que se puso de moda la ingestión de pescados frescos. Los médicos de atención primaria y los funcionarios de salud pública deben estar atentos a un posible aumento de las infecciones por tenias, incluso la neurocisticercosis y otras enfermedades parasitarias, por el "Acuerdo de libre comercio estadounidense" y un intercambio libre de productos alimenticios entre los países de América del Norte.

El recuadro 22-2 es un resumen de los parásitos encontrados por Bruckner y cols. en un estudio de 6 meses de duración de muestras de heces de pacientes ambulatorios tratados en el Olive View Medical Center y en el Harbor General Hospital de Los Angeles.²¹

En este estudio, en el 3% del total de las muestras de heces se identificaron otros protozoos; en el 3% otros nematodos y en el 0,5% otros cestodos. En un estudio más reciente realizado por el Parasitology Center de Tempe, Arizona, Amin⁷ informó que un tercio de las 5 792 muestras fecales provenientes de 2 896 pacientes de 48 estados y el Distrito de Columbia durante el año 2000 resultaron positivas para parásitos intestinales. Las infecciones múltiples con dos a cuatro especies de parásitos constituyeron el 10% de 916 pacientes infectados.

Blastocystis hominis infectó a 662 pacientes (72% de 916 casos), una prevalencia en aumento en los últimos años. Se identificaron otras 18 especies de parásitos intestinales: *Cryptosporidium parvum* y *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* ocuparon el segundo y el tercer lugar en la prevalencia, respectivamente. La prevalencia de la infección fue mínima (22-27%) en invierno, aumentó de modo gradual durante la primavera, alcanzó el máximo de 36-43% entre julio y octubre y disminuyó de a poco hasta llegar al 32% en diciembre.

El paludismo es infrecuente en los Estados Unidos y se lo suele encontrar en viajeros que visitaron áreas endémicas. Los CDC recibieron informes de 1 167 casos de paludismo con comienzo de los síntomas durante 1995 en personas de los Estados Unidos o uno de sus territorios.²⁸⁸ Esta cifra representa un aumento del 15% de los 1 014 casos informados en 1994. *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale* se diagnosticaron en el 48,2%, 38,6%, 3,9% y 2,2% de los casos, respectivamente. En tres pacientes había más de una especie presente (0,3% del total). En 80 casos (6,9%) no se diagnosticó la especie infectante. La cantidad de casos de paludismo informados, adquiridos en África (*n* = 519) siguió siendo casi la misma que en 1994 (*n* = 517); los casos adquiridos en Asia aumentaron un 32,4% (*n* = 335) y los adquiridos en el continente americano, el 37,4% (*n* = 246).

Dada la proliferación de viajes internacionales, los estudiantes y los técnicos que trabajan en los laboratorios de diagnóstico deben tener un amplio conocimiento de las enfermedades parasitarias. Los acuerdos comerciales entre los países, algunos de los cuales se sabe que son endémicos para las enfermedades parasitarias, también abren sus fronteras al ingreso de bienes que pueden estar contaminados con parásitos animales. Los viajeros de los Estados Unidos a tierras extranjeras deben recordar que varias enfermedades parasitarias son endémicas en la mayoría de los países en vías de desarrollo y que deben tomar precauciones adecuadas. Lamentablemente, no se conocen con precisión las cifras exactas y la prevalencia de los parásitos específicos debido a la falta de un sistema de registro legal que exija la notificación obligatoria de ciertas enfermedades. Con frecuencia, las enfermedades parasitarias se pasan por alto o se las diagnostica de manera errónea, ya que los síntomas pueden ser inespecíficos y similares a los de otras enfermedades infecciosas o a los del cáncer.

La incidencia frecuente de ciertas infecciones parasitarias en los pacientes con SIDA ha despertado gran interés en el personal de los laboratorios parasitológicos de regiones no endémicas. Vermud y cols.²⁷² observaron que la epidemia de SIDA

Recuadro 22-2 Incidencia de parásitos en muestras de heces²¹

	Olive View (1 350 muestras)	Harbor General (493 muestras)
Organismo	%	%
<i>Giardia lamblia</i>	14,5	8,7
<i>Endolimax nana</i>	13,0	8,5
<i>Entamoeba coli</i>	10,5	7,7
<i>Entamoeba histolytica</i>	4,5	5,3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3,9	2,0
<i>Hymenolepis nana</i>	3,3	1,4
<i>Dientamoeba fragilis</i>	2,1	2,8

tuvo una influencia definida en la prevalencia relativa de las enfermedades parasitarias. Por ejemplo, las especies de *Cryptosporidium*, raras veces reconocidas en los seres humanos antes de 1983, comprenden el 13,8% de todos los protozoos patógenos en 1984. En un estudio realizado en el New York Columbia–Presbyterian Medical Center de 41 958 muestras de heces remitidas para su análisis durante el período 1971–1984, *Strongyloides stercoralis* fue alcanzando la incidencia de *Trichuris trichiura* como el nematodo identificado con mayor frecuencia. En una publicación reciente, Harms y Feldmeier¹²² proponen que las infecciones por HIV y parasitarias pueden interactuar y afectarse mutuamente. Aunque la evolución natural de las enfermedades parasitarias puede verse alterada por la coinfección por el HIV, las parasitosis a su vez facilitan la progresión desde una infección asintomática al SIDA. Según estos autores, la base inmunopatogénica de los efectos perjudiciales que las enfermedades parasitarias pueden tener en el curso natural de la infección por HIV implica una activación preferencial de los linfocitos T helper (Th) 2. Estos autores concluyeron que para ayudar a combatir la pandemia de HIV también es necesario el control de las enfermedades parasitarias.

Riesgo y prevención de las infecciones parasitarias

Warren y Mahmoud analizaron los factores de riesgo para la adquisición de las infecciones parasitarias durante viajes a áreas infestadas del mundo y las medidas profilácticas para evitarlas.²⁷⁶ El riesgo más bajo es para los hombres de negocios que se alojan en hoteles de primera clase de las grandes ciudades durante períodos breves. En el extremo opuesto del espectro se encuentran los voluntarios y los misioneros que viven en tiendas de campaña o en moradas nativas en el ámbito rural.

La mayoría de las enfermedades parasitarias se contraen ya sea por ingestión de agua o alimentos contaminados, o a través de la picadura de un vector artrópodo. El hecho de beber agua no tratada o cepillarse los dientes con agua contaminada puede ser particularmente riesgoso. Como la mayoría de los parásitos intestinales resisten la congelación, el agua congelada contaminada es también insegura. El agua caliente de la canilla es bastante segura porque las formas infecciosas de la mayoría de los parásitos intestinales son sensible al calor; sin embargo, el agua corriente no siempre excede la temperatura crítica de 43 °C y su seguridad no pueden garantizarse. En áreas endémicas también debe evitarse la ingestión de leche fresca sin pasteurizar. La leche embotellada y las bebidas gasificadas suelen ser seguras.

La ingestión de carnes poco cocidas o de pescados de agua dulce crudos puede llevar a la infección por trematodos, tenias, nematodos como *Trichinella spiralis* y bradizoitos de *Toxoplasma gondii*. Los vegetales crudos son bastante seguros si se pelan antes de comer; sin embargo, en las verduras como lechuga y otras es muy difícil eliminar los huevos y los quistes infectantes de los parásitos. Deben tomarse precauciones para evitar las picaduras de insectos en las regiones tropicales. Se recomienda el uso de mosquiteros, fumigaciones con insecticidas en aerosoles, repelentes de insectos y ropa protectora de manga larga. Los viajeros a los países extranjeros, en particular los que visitan regiones subdesarrolladas de climas tropicales o subtropicales, deben consultar a las autoridades sanitarias locales acerca de los programas de inmunización adecuados. Los viajeros a regiones endémicas de paludismo deben recibir profilaxis con fármacos. Los individuos que planean visitar ciertos países deben consultar a las autoridades sanitarias esta-

tales locales para conocer la magnitud y la distribución geográfica de los diferentes parásitos palúdicos y cuál de los regímenes profilácticos debe comenzarse.

También debe advertirse a los viajeros a regiones tropicales acerca del riesgo de nadar en los estuarios naturales de agua dulce. Las cercarias infecciosas de especies de *Schistosoma* abundan en muchos ríos, lagos y canales y pueden penetrar con facilidad la piel intacta de un pescador confiado. El cloro en la concentración utilizada en las piscinas no garantiza la pureza del agua. Las cercarias de *Schistosoma* que infestan a los seres humanos no se encuentran en el agua de mar; sin embargo, el prurito del nadador puede ocurrir después de vadear en el agua salobre tras la penetración de la piel por las cercarias de especies que infectan a los animales. Los médicos deben procurar obtener información de algún viaje reciente a regiones donde las enfermedades parasitarias son endémicas e interrogar acerca de las condiciones de vida en esos lugares. Es necesario informar al laboratorio si se sospecha una enfermedad parasitaria para poder recolectar las muestras pertinentes y llevar a cabo los procedimientos adecuados para la recuperación óptima de las formas diagnósticas. De acuerdo con la presencia de enfermedades inmunosupresoras subyacentes, el antecedente de un viaje reciente hacia o desde una región endémica de enfermedades parasitarias o ambos, debe considerarse la realización de exámenes de heces para la investigación de parásitos, en particular las formas larvares de *S. stercoralis*, para todos los pacientes antes de que reciban fármacos inmunosupresores.

Manifestaciones clínicas de las enfermedades parasitarias

El síntoma más frecuente de la infección parasitaria intestinal es la diarrea, que puede ser acuosa, sanguinolenta o purulenta. El dolor abdominal cólico puede ser una característica importante en las enfermedades en las cuales el parásito invade la mucosa o la pared intestinal, como sucede en las infecciones por uncinarias, los esquistosomas de Manson u orientales o los trematodos intestinales. La infección con gran cantidad de *Ascaris lumbricoides* puede producir la obstrucción del intestino delgado. Los pacientes con tenias pueden ser asintomáticos, salvo por la pérdida de peso a pesar del aumento del apetito y de la ingesta de alimentos. El meteorismo, los eructos y la esteatorrea pueden observarse en los pacientes con giardiasis.

La eosinofilia en sangre periférica (15–50% o mayor) es uno de los marcadores más importantes de la infestación parasitaria. La eosinofilia también puede observarse en diversas secreciones, como esputo, heces diarreicas, exudados supurativos o líquidos de pseudoquistes o diversas cavidades corporales. Sin embargo, la falta de eosinófilos en sangre o líquidos corporales no excluye el diagnóstico de enfermedades parasitarias en las cuales la eosinofilia no es una manifestación habitual o la cantidad de parásitos puede ser escasa. La presencia de una erupción cutánea urticariana generalizada, considerada como reacción de hipersensibilidad secundaria a productos metabólicos o líticos de organismos muertos absorbidos a la circulación, también puede sugerir infección parasitaria. Si bien es un hallazgo inespecífico, la elevación de las concentraciones séricas de inmunoglobulina, en especial IgE, puede ayudar a la presencia de una enfermedad parasitaria, en especial cuando se asocia con eosinofilia.

La hepatoesplenomegalia es una manifestación habitual de la leishmaniasis (kala-azar) y de los trematodos hepáticos. La hipertensión portal, en particular, puede ser causada por *Schistosoma japonicum* y la ictericia es un signo de presenta-

ción común. Las masas ocupantes quísticas de hígado, cerebro y otros órganos pueden encontrarse en la amebiasis, la hidatidosis y las infecciones por cisticercos (estadios larvarios de *Taenia solium*).

El dolor suprapúbico, la polaquiuria (aumento de la frecuencia miccional) y la hematuria son muy sugestivas de la infección por *Schistosoma haematobium*. La neumonitis transitoria puede experimentarse durante las fases migratorias larvianas de las infecciones por áscaris o uncinarias. Este cuadro puede sospecharse si se observa gran cantidad de eosinófilos en el esputo. La tos, el dolor torácico y la hemoptisis, junto con la formación de quistes parabrónquiales, son manifestaciones usuales del trematodo pulmonar *Paragonimus westermani*. La fiebre de baja intensidad, la pérdida de peso, el edema facial y el dolor del músculo esquelético indican la posible infección por *Trichinella spiralis*. El prurito focal de la piel puede suceder en los sitios de penetración de las larvas de uncinarias o las cercarias de las especies de *Schistosoma*.

Los síntomas generalizados se experimentan con mayor frecuencia después de infecciones con parásitos sanguíneos. Entre las manifestaciones frecuentes del paludismo, la leishmaniasis y la tripanosomiasis se encuentran: fiebre, escalofríos, sudoraciones nocturnas, lasitud, mialgias y pérdida de peso. En estas enfermedades pueden observarse también grados variables de hepatoesplenomegalia y linfadenopatía. En varias enfermedades parasitarias pueden presentarse signos y síntomas neurológicos secundarios a encefalitis, meningitis o neuropatías localizadas. El compromiso del sistema nervioso central (SNC) suele ser difuso en la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño), el paludismo por *Plasmodium falciparum* y la toxoplasmosis, mientras que los abscesos o quistes se observan más a menudo en infecciones por *Entamoeba histolytica*, *T. solium* (cisticercosis) y *Echinococcus granulosus*. La miocardiopatía es una de las complicaciones más graves de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana, producida por *Trypanosoma cruzi*), la toxoplasmosis y las diversas infecciones por larvas migratorias. Los edemas masivos de piernas, brazos y escroto (elefantiasis) son habituales en la filariasis porque los parásitos adultos bloquean los vasos linfáticos y causan inflamación crónica extensa y fibrosis. Los nódulos subcutáneos localizados o las zonas inflamatorias serpiginosas en la piel pueden verse en enfermedades como oncocercosis, dracunculiasis o larva migrans cutánea, que representa las formas migratorias larvianas de las uncinarias de los perros y otros animales.

Tan²⁶² publicó un análisis sucinto de los aspectos clínicos y de laboratorio de diversas enfermedades parasitarias frecuentes y no frecuentes.

Recolección, transporte y procesamiento de las muestras

Las muestras adecuadas del paciente deben ser recolectadas y transportadas al laboratorio con los métodos de conservación pertinentes para permitir la detección y la identificación de todas las formas parasitarias. El diagnóstico de infecciones parasitarias se basa en gran medida en la observación macroscópica o microscópica de heces, orina, sangre, esputo y tejidos. La implementación confiable de las técnicas de procesamiento de laboratorio es un paso integral. No es posible revisar más que algunos de los procedimientos de laboratorio utilizados con frecuencia que pueden ayudar al aislamiento y la identificación de formas parasitarias en muestras clínicas. Para una

revisión sucinta, actual y práctica de estos procedimientos, el lector puede remitirse a la sección "Procedimientos diagnósticos" en la edición actual del texto clásico de García.⁹⁶

Muestras fecales

Las muestras de heces deben recolectarse en un recipiente limpio, de boca ancha con tapa de rosca. Las que están mezcladas con agua (contaminación del inodoro o de la chata) u orina son inadecuadas porque los trofozoítos pueden perder su movilidad o sufrir lisis. Las medicaciones que contienen vaselina, bismuto, antibióticos, antipalúdicos u otras sustancias químicas pueden afectar la detección de los protozoos intestinales. Por lo tanto, la observación de muestras debe retrasarse una semana o más después de ciertos procedimientos diagnósticos (enema de bario) o de haber interrumpido el tratamiento. Los pacientes que han recibido un enema de bario pueden no excretar organismos en sus heces durante al menos una semana después del procedimiento. La tapa del recipiente debe ajustarse de modo firme tras la recolección de la muestra para mantener la humedad adecuada. Todos los recipientes de muestras deben ser rotulados como se describió en el capítulo 1 de este libro.

Para obtener muestras fecales para el examen de parásitos, deben evitarse los catárticos con base oleosa, ya que el aceite retrasa la movilidad de los trofozoítos y distorsiona la morfología de otras formas. Las muestras deben recolectarse antes de la administración de ciertos fármacos y compuestos que pueden afectar la observación o retrasar la recolección hasta que hayan pasado los efectos de estos agentes. Estas sustancias incluyen antiácidos, caolín, vaselina y otros materiales oleosos, preparaciones antidiarreicas no absorbibles, bario o bismuto (se necesitan de 7-10 días para la eliminación de los efectos), agentes antimicrobianos (2-3 semanas) y colorantes vesicales (3 semanas).

La recolección de tres muestras fecales suele ser suficiente para establecer el diagnóstico de enfermedad parasitaria intestinal: dos obtenidas en días sucesivos durante las deposiciones normales y una tercera después de una purga con fosfato de sodio o sulfato de magnesio. No debe aceptarse más de una muestra fecal por día. Algunos autores aconsejan una única muestra para diagnosticar la mayoría de las infecciones parasitarias intestinales. Este enfoque depende de la experiencia del microscopista y de la cantidad de parásitos en la muestra o puede implementarse si el paciente se torna asintomático entre las recolecciones.⁹⁶ Hiatt y cols.¹³² encontraron que con exámenes adicionales, la posibilidad de aislamiento de *Entamoeba histolytica* aumenta un 22,7%; de *Giardia lamblia*, un 11,3% y de *Dientamoeba fragilis*, un 31,1%. Si se sospecha amebiasis o giardiasis intestinal puede necesitarse un total de seis muestras, recolectadas en días sucesivos. El examen de más de seis muestras en un período de 10 días rara vez proporciona más información. Las muestras posteriores al tratamiento deben examinarse a las 3 a 4 semanas después de su finalización en los pacientes con infecciones por protozoos y 5 a 6 semanas después del tratamiento por infecciones por *Taenia*.

Si se solicita un ensayo de PCR en una muestra de heces, se recomienda la implementación del siguiente protocolo:

1. Recolectar la muestra sin conservantes.
2. Conservar y enviar la muestra ya sea refrigerada (4 °C) o congelada (con hielo seco).
3. De manera alternativa, las muestras de heces pueden mezclarse con bicromato de potasio (dilución 1:1 con 5% p/v) o en etanol absoluto (dilución 1:1) y enviarlas refrigeradas.

Los frotis con tinciones tricrómicas, para ácido-alcohol resistencia o ambas deben acompañar la muestra de heces cuando se solicita la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *G. lamblia* y *E. histolytica/dispar* o *Cryptosporidium parvum* o *Cyclospora cayetanensis*, respectivamente. Todos los frotis teñidos deben revisarse con minuciosidad porque la realización de PCR es innecesaria si se identifica el parásito. Los detalles del procedimiento de extracción y los pasos para la amplificación del DNA fueron publicados por da Silva y cols.⁵⁴

CONSERVACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS

Muchas muestras de heces para el examen de huevos y parásitos se recolectan ya sea en el hogar, en el consultorio médico o en una clínica a cierta distancia del laboratorio que realiza el análisis. Como los trofozoítos se desintegran con rapidez después de la defecación y no forman quistes, las muestras de heces líquidas deben examinarse antes de los 30 minutos después de la recolección (no 30 minutos después de ser recibidas en el laboratorio), o las heces poco consistentes antes de los 60 minutos, con el objeto de detectar trofozoítos móviles, en particular si se sospechan infecciones por *E. histolytica*. Las heces sólidas, en las cuales no se espera observar trofozoítos, pueden examinarse hasta 24 horas después de su eliminación. Las muestras de heces nunca deben ser congeladas y descongeladas ni colocadas en estufas de incubación porque las formas parasitarias pueden deteriorarse con rapidez.

Se dispone de varios conservantes para la fijación permanente de muestras de heces que se mantienen con fines docentes futuros o que deben enviarse a laboratorios de referencia para el análisis. En el recuadro 22-3 se presentan las fórmulas y el modo de preparación de varios conservantes utilizados en la actualidad. A continuación se resumen las ventajas y las desventajas de estos elementos.

Fijadores alternativos. Las preocupaciones acerca de la toxicidad del formaldehído y la dificultad de eliminar los conservantes que contienen cloruro mercurio llevaron a varias compañías a comercializar alternativas al método de referencia: el reactivo alcohol polivinílico de baja viscosidad (LV-PVA). En un estudio de 68 muestras de heces recién emitidas, que en conjunto contenían 31 formas parasitarias, Jensen y cols.¹⁴⁶ concluyeron que Proto-Fix® (Alpha-Tec Systems, Vancouver, WA) y EcoFix® (Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH) fueron sustitutos seguros para el ambiente del PVA, que causan una distorsión mínima del parásito. En un estudio de 20 muestras positivas de heces que contenían uno o más parásitos con diferentes estadios de huevos, larvas y quistes, Pietrzak-Johnston y cols.²¹⁵ también concluyeron que EcoFix es comparable con el tradicional LV-PVA para la visualización de protozoos en frotis teñidos de modo permanente, lo que confirma los hallazgos tempranos de García y Shimizu.⁹⁴ En cada uno de estos estudios, las formas parasitarias presentan detalles nucleares bien definidos; incluso ciertos parásitos se identifican mejor en las muestras conservadas con EcoFix que en las fijadas por el método tradicional PVA.

Cuando se tiñen de manera adecuada con estas técnicas, los organismos presentan un citoplasma azul verdoso a violáceo y la cromatina roja a violeta rojiza contra un fondo verde. Los huevos y las larvas de helmintos tienen un aspecto rojo o violeta. Recuérdese que los huevos de *Trichuris trichiura* y los quistes de *Giardia lamblia* no se concentran tan bien en PVA como en el material fijado con formol, que la morfología de las formas larvianas de *Strongyloides stercoralis* es deficiente en

las heces fijadas con PVA y que *Isospora belli* puede ser pasado por alto.

Se comercializan varios dispositivos para la concentración fecal, que fueron presentados por García,⁹³ como el tubo FPC JUMBO® y los sistemas FPC HYBRID® (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA), el sistema de concentración PARASED® (Medical Chemical, Torrance, CA) y el sistema de concentración MACRO-CON® (Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH), además de una terminal de trabajo automatizada para el análisis microscópico de los concentrados fecales (DiaSys., Waterbury, CT). Puede recomendarse cualquiera de estos productos utilizados en la actualidad en los laboratorios clínicos.

EXAMEN VISUAL

Las muestras de heces emitidas recientemente y enviadas para la detección de parásitos deben ser sometidas a la observación visual para determinar la presencia de bario, aceites u otros materiales que pueden hacer que el material resulte inadecuado para el procesamiento ulterior. La porción del material que muestra sangre o moco debe ser específicamente seleccionada para el estudio microscópico porque puede provenir de úlceras o abscesos purulentos, donde la concentración de amebas puede ser máxima. El examen visual también puede utilizarse a fin de determinar los procedimientos adecuados para llevar a cabo. Es poco probable que las heces sólidas contengan trofozoítos; por lo tanto, suelen ser innecesarias las preparaciones en fresco y sólo se requiere preparar concentrados. Los huevos y las larvas de helmintos y los quistes de protozoos pueden observarse en el sedimento de los concentrados. Los preparados directos deben limitarse a las heces diarreicas y deben prepararse frotis teñidos para evaluar mejor las estructuras internas de cualquiera de las formas parasitarias observadas. Estos enfoques se detallan en la sección que sigue.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE HECES RECIÉN EMITIDAS PARA EL EXAMEN DE HUEVOS Y PARÁSITOS

Las muestras de heces líquidas deben examinarse antes de los 30 minutos de su eliminación (no de la llegada al laboratorio) para aumentar al máximo la posibilidad de observar los trofozoítos móviles. Las muestras blandas, que pueden contener trofozoítos, quistes o ambos, deben examinarse antes de una hora de su eliminación. En los casos en los que los retrasos son inevitables, la muestra debe conservarse como se describió antes para evitar la posible desintegración de trofozoítos. Las muestras de heces sólidas deben rechazarse o, como es poco probable que contengan trofozoítos, pueden mantenerse hasta un día, con refrigeración a la noche si es necesario.

En las muestras remitidas para el examen parasitológico deben hacerse tres tipos de preparaciones: 1) en fresco directas, 2) concentrados y 3) frotis teñidos permanentes.

Las preparaciones directas en solución fisiológica son valiosas para la detección de trofozoítos. Los huevos y las larvas de helmintos y protozoos también pueden observarse en preparaciones directas en solución fisiológica; el agregado de una gota de yodo puede ayudar a la visualización de estas formas. En el caso de las muestras fecales acuosas o líquidas, la centrifugación de la muestra sola puede ser suficiente porque los trofozoítos no se concentran bien a partir de las heces líquidas y los quistes se observarán en el sedimento. El examen directo puede omitirse para el procesamiento de las heces blandas, ya que

Recuadro 22-3 Fijadores habituales para muestras fecales: fórmulas y preparación**Formaldehído al 10% en solución fisiológica**

En un recipiente de almacenamiento adecuado con tapa de rosca ajustada, agregar 100 mL de formaldehído en 900 mL de solución de cloruro de sodio al 0.85%.

Ventajas

- Está disponible con facilidad, es fácil de preparar y actúa como un fijador para todos los propósitos.
- El reactivo preparado tiene un vencimiento prolongado.
- Se conserva bien la morfología de huevos de helmintos, larvas, quistes de protozoos y formas de coccidios.
- Las muestras conservadas con formaldehído son adecuadas para los procedimientos de concentración, microscopia de epifluorescencia y realización de tinciones para ácido-alcohol resistencia, safranina y cromótropa y son compatibles con los equipos de inmunoanálisis.

Desventajas

- Las muestras conservadas con formaldehído no son adecuadas para la preparación de frotis para tinción tricrómica.
- La conservación es inadecuada para mantener la morfología de trofozoítos de protozoos.
- La realización de los procedimientos de PCR puede verse dificultada, en especial después de un tiempo de fijación amplio.

Algunos parasitólogos prefieren una fórmula con formaldehído al 5%, ya que se afirma que es menos perjudicial para los protozoos y emite menos vapores de formaldehído en el ambiente del laboratorio.

LV-PVA (alcohol polivinílico de baja densidad)**Fórmula**

- Alcohol polivinílico, 10 g
- 95% alcohol etílico, 62.5 mL
- Cloruro mercuríco, en solución acuosa saturada, 125 mL
- Glicerina, 3 mL

Preparación

Los ingredientes líquidos se mezclan en un vaso de precipitación de 500 mL y se agrega PVA en polvo sin mezclar. Cubrir el vaso de precipitación con papel o papel metálico y permitir que el PVA se remoje durante una noche. Calentar la mezcla lentamente a 75 °C y agitar con suavidad durante 30 segundos hasta que se logre una suspensión levemente lechosa.

Ventajas

- Se conserva bien la morfología de trofozoítos y quistes de protozoos.
- Se preparan con facilidad los frotis para tinciones tricrómicas permanentes.
- Las formas parasitarias se conservan y adhieren al portaobjetos.
- Las muestras conservadas permanecen estables durante varios meses.

Desventajas

- La morfología de los huevos y las larvas de helmintos, los coccidios y los microsporidios se conservan de manera inadecuada.
- El cloruro mercuríco es el principal componente, lo que hace difícil y costoso el desecho del fijador.
- El reactivo es difícil de preparar en el laboratorio.
- No puede utilizarse para procedimientos de concentración o equipos de inmunoanálisis.
- Inadecuado para las tinciones de ácido-alcohol resistencia, safranina y cromótropo.

MIF (meriolate-yodo-formaldehído)**Fórmula**

Las dos soluciones deben prepararse y almacenarse de modo separado y se mezclan inmediatamente antes de su empleo.

Solución I

- Tintura de timerosal, 1: 1 000, 40 mL
- Formaldehído, solución acuosa al 10% (USP), 5 mL
- Glicerol, 1 mL
- Agua destilada, 50 mL

Solución II

- Yoduro de potasio, cristales (KI), 10 g
- Yodo, cristales (agregar después de disolver el KI), 5 g de agua destilada, 100 mL

Preparación

El vencimiento de cada solución es de varios meses si se mantiene a temperatura ambiente en una botella oscura. En un frasco ampolla, mezclar 9.4 mL de la solución I con 0.6 mL de la solución II justo antes de su uso. Agregar el equivalente de cerca de 1/4 de cucharada de té de heces recién emitidas y mezclar bien con un aplicador. Dejar que la suspensión se estabilice durante 24 horas; luego, con una pipeta, eliminar una pequeña porción de la capa media anaranjada pálida y la capa inferior de coloración más intensa para la preparación de frotis.

Recuadro 22-3 Fijadores habituales para muestras fecales: fórmulas y preparación (cont.)**Ventajas**

- Los componentes del reactivo fijan y tiñen las formas parasitarias.
- La preparación es sencilla y perdurable.
- Adecuado para los procedimientos de concentración.

Desventajas

- Como sucede con el conservante formaldehído, no es adecuado para la preparación de frotis para tinciones tricrómicas permanentes.
- La morfología de los trofozoítos de protozoos se conserva de modo inadecuado.
- El componente yodo puede interferir en otras tinciones y en la fluorescencia; puede causar distorsión de los protozoos.

Acetato de sodio, ácido acético, formaldehído (SAF)**Fórmula**

Formaldehído (solución al 37-40%), 0,6 mL
 Ácido acético glacial, 0,3 mL
 Acetato de sodio, 225 mg
 Agua destilada, 13,88 mL

Preparación

Disolver el acetato de sodio en el agua destilada, agregar lentamente las soluciones de ácido acético glacial y formaldehído, mezclar y almacenar. El vencimiento es de varios meses.

Ventajas

- Fácil de preparar y el reactivo tiene un vencimiento prolongado.
- Adecuado para las tinciones para ácido-alcohol resistencia, safranina y cromótopo.
- No interfiere en los equipos de inmunoanálisis.
- Exento de la sustancia química tóxica cloruro mercurio.

Desventajas

- Debe utilizarse el aditivo albúmina-glicerina o similar para la adherencia de la muestra al portaobjetos.
- Las tinciones permanentes son inferiores a las obtenidas con PVA o el fijador de Schaudinn.

Fijador de Schaudinn**Fórmula:**

Cloruro mercurio, solución acuosa saturada (HgCl_2), 110 g
 Agua destilada, 1 000 mL

Preparación

En un vaso de precipitación en baño María colocado en una campana, hervir el cloruro mercurio hasta su disolución y dejarlo varias horas hasta que se formen cristales.

Fijador de Schaudinn (solución madre)

Cloruro mercurio, solución acuosa saturada, 600 mL
 Alcohol etílico, 95%, 300 mL

Agregar 5 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solución madre justo antes de su uso.

Ventajas

- Se conservan bien los trofozoítos y los quistes.
- Los frotis teñidos de modo permanente se preparan con facilidad.

Desventajas

- El cloruro mercurio es el principal componente, lo que hace difícil y costoso el desecho del fijador.
- La morfología de los huevos y las larvas de helmintos, los coccidios y los microsporidios se conserva de manera inadecuada.
- Debe utilizarse el aditivo albúmina-glicerina o similar para la adherencia de la muestra al portaobjetos.
- Menos adecuado que otros conservantes para los procedimientos de concentración.

ninguna de las formas parasitarias presentes aún se detectará en la preparación concentrada.

Las identificaciones finales de los parásitos no deben hacerse del examen de preparaciones directas solas; en cambio, deben prepararse frotis teñidos de modo permanente y examinarse para confirmar las características morfológicas típicas. Deben prepararse tinciones permanentes sobre cualquiera de las muestras en las que se prevé un retraso en el transporte. Para ello, se deben mezclar una o dos gotas de la muestra con tres a cuatro gotas de alcohol polivinílico, dispersarlas sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio y dejarlas secar al aire; o puede agregarse una pequeña cantidad a un volumen igual de fijador de Schaudinn en un tubo tapado.

Preparados directos en fresco. El procedimiento para los preparados en fresco es útil para identificar trofozoítos de protozoos, quistes, ooquistes, y huevos y larvas de helmintos. Los preparados en solución fisiológica se realizan mediante la emulsificación de una pequeña porción de las heces en una gota de solución fisiológica sobre un portaobjetos, luego se cubre la mezcla con un cubreobjetos. De manera ideal deben realizarse dos preparaciones en el mismo portaobjetos, el segundo con yodo. La dilución del preparado debe ser la que se precisa para que se pueda leer un diario a través del portaobjetos. Si el preparado es demasiado espeso, en especial las preparaciones con yodo, las formas parasitarias se tiñen de modo deficiente y puede ser difícil diferenciarlas de los detritos de fondo. Si son demasiado delgadas, las formas parasitarias con cantidades bajas de parásitos pueden diluirse y no advertirse durante la observación microscópica habitual. Las preparaciones con solución fisiológica también se utilizan para observar la movilidad de los trofozoítos. Los quistes de protozoos parecen más refringentes en solución fisiológica que en las preparaciones con yodo. Las estructuras internas de los trofozoítos o los quistes de protozoos suelen estar mal delineados en las preparaciones con solución fisiológica, lo que dificulta la identificación definitiva. Siempre deben prepararse frotis teñidos de modo permanente, en especial si se sospecha *Giardia lamblia*.

Los ooquistes de las especies de *Cyclospora* pueden observarse en preparaciones en fresco con microscopia de fluorescencia UV, en la cual aparecen como estructuras azul intenso (el filtro de excitación UV actúa a 330-365 nm). El uso de microscopia de campo claro y fluorescencia proporciona un método eficaz y fiable para el diagnóstico. En el caso de que no se hayan realizado las preparaciones originales también deben prepararse otros frotis.

El yodo se utiliza como una tinción para destacar las estructuras internas de los parásitos intestinales. Deben utilizarse soluciones de yodo al 1% (p. ej., yodo de D'Antoni, preparado por el agregado de 1 g de yoduro de potasio y 1,5 g de cristales de yodo en polvo en 100 mL de agua destilada). El yodo de Lugol, utilizado para las tinciones de Gram, en su potencia completa es demasiado fuerte para teñir las formas de protozoos, pero puede utilizarse como solución recién preparada diluida 1:5 con agua destilada (que tiene el aspecto de un té cargado). Sin embargo, el examen de preparaciones con yodo solas puede no ser satisfactorio porque los trofozoítos ya no son móviles. Ambas preparaciones, en solución fisiológica y con yodo, pueden realizarse en un único portaobjetos, lo que permite la comparación de todas las formas sospechosas.

Si se desea, el cubreobjetos puede sellarse. Para ello se aplica una preparación fundida de vaselina y parafina en una relación 1:1 en los bordes del cubreobjetos mediante la punta de un hisopo de algodón. La parafina y la vaselina deben calentarse a cerca de 70 °C para mezclarlas inmediatamente antes de su

uso. El sellado se realiza asegurando primero los cuatro ángulos con una gota del sellador en caliente para fijar el cubreobjetos. Luego se esparce una capa delgada de la mezcla alrededor de los bordes. El sellado del cubreobjetos impide el movimiento de los organismos cuando se utilizan objetivos de inmersión y evita el desecado de la preparación. También pueden utilizarse otras preparaciones selladoras (p. ej., esmalte de uñas claro).

Debe examinarse de modo sistemático toda el área del cubreobjetos con movimiento superpuesto hacia atrás y hacia adelante con objetivo 10×. Si se observa una forma sospechosa, puede ser necesario un aumento mayor a fin de determinar los detalles internos.

Métodos de concentración fecal. Los huevos, los quistes y los trofozoítos suelen estar en escasa cantidad en las heces que son difíciles de detectar directamente en los frotis o en las preparaciones en fresco; por consiguiente, siempre deben llevarse a cabo procedimientos de concentración. Los dos métodos utilizados con mayor frecuencia son: 1) flotación y 2) sedimentación. Ambos están destinados a separar los protozoos y los huevos de helmintos intestinales de los detritos fecales excesivos. En el protocolo 22-1 se describen los detalles de estos procedimientos.

Técnicas de flotación. Las técnicas de flotación se utilizan con menor frecuencia en los laboratorios clínicos que el procedimiento de sedimentación. Se emplean soluciones que tienen una densidad relativa mayor que los organismos que flotan, de modo que ciertas formas parasitarias se dirigen hacia la parte superior mientras que los detritos fecales descienden hasta el fondo. Con frecuencia se utiliza sulfato de cinc, que tiene una densidad relativa de 1,018. En comparación, la densidad de los protozoos y de muchos de los huevos de helmintos es menor. Por ejemplo, la densidad relativa de los huevos de uncinarias es de 1,055, la de un huevo de *Ascaris* de 1,110; la de un huevo de *Trichiura* de 1,150 y la de los quistes de *Giardia lamblia* de 1,060.

La ventaja principal de la técnica de flotación es que produce un material más limpio, en el cual las formas parasitarias se distinguen con facilidad. Las desventajas más importantes residen en que las paredes de los huevos y los quistes a menudo se colapsan, lo que dificulta la identificación; asimismo, algunos huevos de parásitos no flotan. Los huevos operculados de trematodos y cestodos pueden no detectarse porque la elevada concentración de sulfato de cinc hace que el opérculo se abra, el huevo se llena con líquido y se hunde en el fondo del tubo. Por esta razón, deben examinarse con el microscopio tanto el filtrado de la parte superior como el sedimento de la parte inferior del tubo.

Bartlett y cols.¹⁴ describieron una técnica de flotación con sulfato de cinc modificada que puede adaptarse para utilizarla con muestras fijadas con formol. La fijación con formaldehído no sólo evita que los huevos operculados estallen de modo que pueden detectarse en los eluidos de la flotación, sino que también evita la distorsión de las formas parasitarias causadas por las soluciones salinas de densidad relativa elevada.

Técnicas de sedimentación. Se utilizan soluciones de densidad relativa más baja que los parásitos, de modo que la concentración de huevos, quistes y otras formas se produce en el sedimento. Las técnicas de sedimentación se recomiendan para los laboratorios de diagnóstico general porque son más fáciles de realizar y hay menos posibilidades de errores técnicos.

La concentración de parásitos intestinales por técnicas de sedimentación, ya sea por gravedad o centrifugación, conduce

a una recuperación adecuada de protozoos, huevos y larvas, aunque éstos pueden ser más difíciles de detectar en las preparaciones microscópicas en fresco y en los frotis teñidos, por la comparativamente gran cantidad de detritos en el fondo. En el procedimiento de concentración de formaldehído utilizado en la mayoría de los laboratorios, el éter dietílico se ha reemplazado por acetato de etilo. Young y cols.³⁰⁴ demostraron que el acetato de etilo es menos inflamable y peligroso que el éter dietílico y que no se ve afectada la capacidad de concentrar los quistes y los huevos. Debe tenerse cuidado durante los pasos de lavado del procedimiento para decantar el sobrenadante; si no, puede perderse una cantidad significativa de formas parasitarias. Neimeister y cols.¹⁹⁷ han demostrado que Hemo-De (PMP Medical Industries, Irving, TX y distribuido por Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) es un sustituto eficaz del acetato de etilo. Hemo-De es un solvente con una densidad relativa y una solubilidad similares a las del acetato de etilo; no es inflamable ni tóxico y es biodegradable (clasificado como GRAS [*generally regarded as safe*; por lo general considerado seguro] por la US Food and Drug Administration).

Frotis teñidos de modo permanente. Aunque las preparaciones en fresco temporarias del material fecal para el examen microscópico directo facilitan la detección rápida de parásitos intestinales en muestras fecales, los protozoos más pequeños pueden pasarse por alto. Por consiguiente, García⁹⁶ recomienda preparar tinciones permanentes como parte del examen de cada muestra de heces remitida para el análisis parasitológico. En particular, puede aumentar la detección y la identificación de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y otras infecciones por protozoos.²⁴⁶ La morfología de los quistes y los trofozoítos se visualiza mejor en los frotis teñidos. Las preparaciones permanentes también pueden realizarse de estos frotis, para usos en docencia y para consultas futuras con especialistas cuando se observan formas inusuales.

Los dos tipos de tinciones permanentes más utilizadas para visualizar protozoos intestinales en frotis fecales son: 1) tinción con hematoxilina férrica y 2) tinción tricrómica de Gomori modificada (de Wheatley). La tinción con hematoxilina férrica es una técnica popular utilizada para la definición más exacta de la morfología de los parásitos intestinales. El procedimiento es algo difícil de controlar y es mejor si lo realiza una persona con experiencia para lograr resultados óptimos. La tinción tricrómica es muy utilizada en los laboratorios diagnósticos porque su realización es fácil y se obtienen buenos resultados tanto en muestras fecales recién emitidas como en las conservadas con PVA. En el protocolo 22-2 se describe en detalle el procedimiento de tinción tricrómica.

Cuando se presentan síndromes diarreicos, en especial en los pacientes inmunosuprimidos o infectados con SIDA, que implican patógenos emergentes nuevos—especies de *Cryptosporidium*, especies de *Cyclospora* y especies de *Microsporium*—pueden requerirse otras tinciones en el análisis de las heces líquidas y blandas. Los ooquistes de las especies de *Cryptosporidium* y de *Cyclospora* se tiñen bien con la tinción para ácido-alcohol resistencia modificada en la cual se emplea como decolorante ácido sulfúrico al 1%.

También se dispone de un método con anticuerpos fluorescentes para la detección de especies de *Cryptosporidium*, a menudo en combinación con un anticuerpo monoclonal dirigido contra quistes de *Giardia lamblia* (detallado más adelante en este capítulo). Recuerdese que para realizar las técnicas para ácido-alcohol resistencia y anticuerpos monoclonales deben utilizarse materiales recién emitidos o fijados con formaldehído, no pueden utilizarse muestras conservadas con PVA.⁹³

Los microorganismos diminutos de las especies de *Microsporium* no se colorean bien con la mayoría de las tinciones. La tinción de Weber²⁷⁹ y la de Ryan²³² se han utilizado con éxito en los laboratorios clínicos. Más recientemente, en los CDC se ha desarrollado la tinción con cromótropo R. En esta tinción, la concentración del componente cromótropo 2R ha sido aumentada 10 veces para facilitar la penetración del colorante en las formas parasitarias diminutas. Es importante preparar un frotis delgado (gota fina) utilizando alrededor de 10 µL de una suspensión de heces no concentradas fijada con formaldehído al 10% sobre un portaobjetos (también pueden utilizarse concentrados con formol, pero no aumenta de manera sustancial la cantidad de microorganismos, que no se concentran bien, por campo microscópico). El procedimiento rápido cromótropo-Gram en caliente es una tinción alternativa rápida, fiable y simple de realizar.¹⁹⁰ Para esta técnica, primero se efectúa una tinción de Gram sobre el frotis de gota fina, pero en lugar de agregar safranina, al portaobjetos se le coloca una tinción cromótropa calentada (50-55 °C) durante al menos un minuto. Las esporas de microsporidios aparecen como estructuras ovoideas violetas contra un fondo verde pálido. En cada corrida de tinción debe agregarse un portaobjetos control de esporas de microsporidios provenientes de la muestra conservada con formaldehído al 10%. Este control proporciona un punto de referencia para distinguir las esporas verdaderas de otros elementos similares. Estas tinciones se describen en detalle más adelante en este capítulo.

Examen de muestras intestinales no fecales

Los parásitos como *Giardia lamblia* y *Strongyloides stercoralis* son habitantes habituales del duodeno y el yeyuno, por lo que para demostrarlos pueden requerirse muestras de contenido duodenal. Se realiza una preparación en fresco del material aspirado y se la examina con el microscopio. Si se observan organismos móviles puede resultar útil una segunda preparación con yodo para destacar las estructuras internas, de modo que pueda hacerse la identificación definitiva.

El contenido duodenal puede examinarse con la prueba del hilo.¹⁴⁸ El elemento utilizado es una cápsula de gelatina pesada que contiene un hilo de nailon de cola larga (comercializado como Enterotest, por Hedeco, Palo Alto, CA). Un extremo del hilo que sobresale de la cápsula se adhiere a la cara del paciente. Se deglute la cápsula y por el peristaltismo el hilo pesado se dirige al duodeno. Después de 4 a 6 horas, se elimina el hilo y todo el moco teñido de bilis adherido al extremo distal se utiliza para realizar preparaciones en fresco y frotis teñidos para estudios microscópicos. El examen del contenido duodenal debe realizarse sólo en los pacientes con signos y síntomas sugestivos de giardiasis. McHenry y cols.¹⁸⁴ obtuvieron aspirados duodenales de 144 pacientes a quienes se les estaban realizando endoscopias por otras razones. *Giardia lamblia* se aisló sólo en un paciente (0,7%).

La infección por *Enterobius vermicularis* del conducto rectal se detecta mejor mediante la cinta engomada de celulosa. Para efectuar el examen se aplica la superficie adhesiva de una cinta de celulosa transparente de 7,5 a 10 cm sobre los pliegues perianales de un paciente con presunta infección por oxiuros. Las muestras recogidas a la mañana temprano, enseguida después de despertarse y antes de bañarse, son óptimas para la detección de los huevos. Para proporcionar un apoyo firme a la cinta puede usarse un bajalengua. La cinta se coloca con el lado adhesivo hacia el portaobjetos y se examina para determinar los huevos característicos de *E. vermicularis*. Para obtener la

muestra puede utilizarse un “aplicador” desechable disponible en el comercio, con una superficie plana y pegajosa (“Swube”-“Falcon 2012 disposable applicator”; Falcon, Oxnard, CA). En la figura 22-1 se ilustra el aspecto microscópico de una preparación positiva.

En algunos casos de infección por *Entamoeba histolytica* puede ser necesario realizar exámenes histológicos de biopsia del sigmoides, cuando los exámenes repetidos de heces no revelan los organismos. El procesamiento de estas muestras se describe más adelante en este capítulo.

Examen de muestras extraintestinales

ESPUTO

En raras ocasiones, los estadios larvarios de uncinarias, *Ascaris lumbricoides* o *Strongyloides stercoralis* o los huevos de *P. westermani* se ven en muestras de esputo. La preparación en fresco directa con solución fisiológica suele ser suficiente. Si el esputo es extraordinariamente mucoso o espeso, para licuar la muestra puede agregarse una cantidad igual de *N*-acetil-L-cisteína al 3% o de hidróxido de sodio al 3% (o cloro de lejía doméstica pura) que se mezcla durante 2 o 3 minutos y luego se centrifuga. Tras la centrifugación, con el sedimento se realiza la preparación en fresco para el examen microscópico. Si el examen de la muestra de esputo se retrasa por cualquier razón, debe agregarse formaldehído al 10% para conservar los huevos o las larvas de helmintos.

ORINA Y LÍQUIDOS CORPORALES

En el caso de muestras con volúmenes grandes es necesario dejarlas reposar durante 1 o 2 horas. Luego se toman alrededor de 50 mL del fondo del sedimento obtenido por centrifugación. El sedimento altamente concentrado puede entonces observarse mediante una preparación directa en fresco. Si se observan elementos que sugieren parásitos, es útil el agregado de yodo o teñir la preparación para destacar las estructuras internas diagnósticas.

BIOPSIAS Y ASPIRADOS DE TEJIDOS

En las úlceras cutáneas (como las observadas en la leishmaniasis), los nódulos cutáneos (observados en la oncocercosis y en las infecciones por *Mansonella streptocerca*) y los ganglios linfáticos se puede realizar aspiración con aguja fina o biopsia. En los casos en los que se sospecha leishmaniasis cutánea, el material debe aspirarse con aguja y jeringa desde el fondo del lecho de la úlcera. Puede obtenerse un “corte de piel” para diagnosticar la leishmaniasis subcutánea mediante la toma de una porción pequeña de piel con una pinza o elevándola con la punta de una aguja. La punta de un “cono” pequeño de piel se corta con un instrumento quirúrgico afilado o con una hoja de afeitar. El corte debe ser lo suficientemente profundo para incluir la papila dérmica; sin embargo, no tanto como para ocasionar sangrado. Pueden indicarse biopsias de las mucosas rectal y vesical para identificar huevos característicos en casos de sospecha de esquistosomiasis intestinal o urinaria.

Todo el tejido de la biopsia debe remitirse al laboratorio sin el agregado de fijador formol. Si no puede evitarse un retraso en el procesamiento, las muestras deben colocarse en el fijador PVA. Si la muestra es blanda, se raspa una porción pequeña y se coloca en una gota de solución fisiológica para el examen en fresco. También deben prepararse frotis por impronta, realizados apretando una superficie de corte reciente del tejido contra la superficie de un portaobjetos, el cual se coloca de

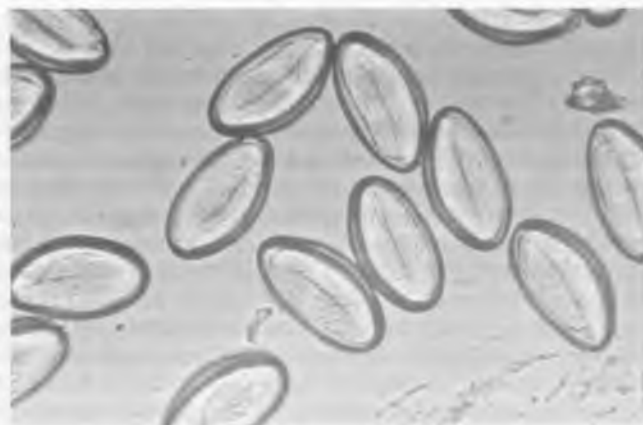


Figura 22-1 Microfotografía de la preparación realizada con cinta de celulosa engomada de un paciente en el que se sospecha oxiuriasis, que ilustra el resultado positivo con varios huevos ovales, de paredes delgadas de *Enterobius vermicularis*.

inmediato en un fijador, como la solución de Schaudinn. Pueden realizarse tinciones tricrómicas u otras. La porción restante del material de biopsia se remite entonces para examen histológico.

RASPADOS O BIOPSIA DE CÓRNEA

Los raspados de córnea son útiles para hacer el diagnóstico en casos de sospecha de queratitis por *Acanthamoeba*. Los raspados de córnea, obtenidos por un médico, se colocan sobre un portaobjetos y se fijan en alcohol metílico durante 3-5 minutos. García⁹⁶ sugiere que la tinción debe realizarse con blanco de calcoflúor, un blanqueador textil que se adquiere en el comercio. Se disuelve en agua destilada una solución de blanco de calcoflúor al 0,1% y azul de Evans al 0,1%. Se agregan algunas gotas de esta solución en el frotis fijado con metanol durante 5 minutos. Se inclina el portaobjetos y el líquido se escurre en una toalla de papel absorbente; se agrega un cubreobjetos y se lo examina para investigar la presencia de quistes de amebas de color verde manzana (los trofozoítos no se tiñen), los cuales presentan una fluorescencia verde manzana o blanco azulada de acuerdo con la combinación de luz excitadora/filtro utilizada.

BIOPSIA DE MÚSCULO

Las formas larvarias en espiral características de *Trichinella spiralis* se demuestran mejor en una preparación tomada de una biopsia de músculo esquelético (véase lámina en color 22-11G). García⁹⁶ sugiere tratar el material de biopsia con un líquido de digestión antes del examen. Este líquido se prepara mediante el agregado de 5 g de pepsina a una mezcla de 1 000 mL de agua destilada y 7 mL de CIH concentrado. El tejido se coloca en un frasco Erlenmeyer de boca ancha y el líquido de digestión se agrega en la relación de 1 parte de tejido y 20 partes de líquido. La mezcla de digestión se mantiene a 37 °C durante 12 a 24 horas. Después de la digestión, se examinan con el microscopio algunas gotas del eluido para determinar la presencia de larvas. Si no se observan, se debe centrifugar una alícuota de 15 mL de la mezcla y se examina el sedimento.

SANGRE

Se coloca una gota de la sangre anticoagulada sobre un portaobjetos al que se le agrega un cubreobjetos; la muestra se examina con el microscopio para evaluar la presencia de formas extraeritrocíticas grandes, a menudo móviles, como tripanosomas y microfilarias. La presencia de microfilarias en la sangre circulante tiene una marcada periodicidad que depende de la especie involucrada; por consiguiente, es crítico el momento de la recolección de la muestra. Si se sospecha una infección por filarias, los momentos óptimos para la recolección a fin de demostrar su presencia son: *Loa loa*, al mediodía (10 a. m. a 2 p. m.); *Brugia* o *Wuchereria*, a la noche, después de las 8 p. m. *Mansonella*, en cualquier momento; *Onchocerca*, en cualquier momento.

Cuando se examina por primera vez un frotis de sangre teñido, se lo debe revisar con bajo aumento (250× o menos) en busca de las formas parasitarias más grandes que pueden pasarse por alto si se utiliza sólo microscopía de inmersión. La morfología de los plasmodios intraeritrocíticos (paludismo, *Babesia*, *Theileria*) se observa mejor en los frotis de sangre periférica teñidos con Wright o con Giemsa.

Los frotis de sangre preparados para la detección de paludismo deben recolectarse específicamente para este propósito y no deben permanecer en la bandeja durante la ronda de recolección. Los frotis deben prepararse con muestras de sangre anticoagulada lo antes posible después de la recolección, ya que la exposición prolongada al anticoagulante puede distorsionar la morfología de los esquizontes maduros y los gametocitos. Asimismo, los estadios sexuales continúan su desarrollo durante el almacenamiento de la muestra hemática en el ambiente templado del laboratorio. Con la exposición de la muestra de sangre al aire, los microgametocitos pueden dar origen a los microgametos (exflagelación), éstos se liberan al plasma y pueden confundirse microscópicamente con especies de *Borrelia*. Los merozoítos, en particular los de *Plasmodium vivax*, pueden liberarse de los esquizontes maduros y reinvasar otros eritrocitos, donde pueden aparecer con un aspecto similar a las pequeñas formas en "anillo de sello" de *Plasmodium falciparum*. Por consiguiente, es preferible la recolección de muestras de sangre capilar.

Deben prepararse frotis de sangre de gota fina y gruesa. El frotis de gota fina, utilizado sobre todo para la identificación definitiva de especies de plasmodios y otros parásitos intraeritrocíticos, se prepara exactamente igual que el utilizado para realizar el recuento diferencial de leucocitos. Se efectúan al menos dos frotis por paciente. Los frotis de gota fina se forman con sangre esparcida en una capa de modo tal que el espesor de la capa disminuye progresivamente hacia el borde esfumado o "cola", donde los eritrocitos no se superponen; este extremo debe tener 1,5 a 2 cm de largo. Hay que tener cuidado al preparar un frotis de gota fina para ver que la cola esté esparcida en forma regular y no presente espacios vacíos, rayas u otros artefactos de técnica. La preparación de los frotis de gota fina y gruesa se describe en el protocolo 22-3.

Los frotis de gota gruesa constan de una capa gruesa de eritrocitos deshemoglobinizados (lisados). Un frotis de gota gruesa adecuado es aquel que apenas permite leer las palabras de un periódico a través de la película. Estos frotis contienen una concentración 30× de elementos parasitarios cuando se compara con un área igual de una gota fina. Por lo tanto, la preparación de frotis de gota gruesa tiene una utilidad particular para la detección de los parásitos del paludismo en las infecciones leves; sin embargo, la morfología de los trofozoítos muchas veces está afectada, lo que dificulta la identifica-

ción de especie. Si se observan elementos sospechosos de paludismo, debe prepararse una gota fina para hacer la identificación de la especie.

El frotis de gota gruesa se prepara colocando dos o tres gotas de sangre en la superficie de un portaobjetos para cubrir un área del tamaño de una moneda de diez centavos de dólar. La sangre debe obtenerse por punción del pulpejo del dedo y dejar que fluya libremente; debe evitarse presionar el dedo. La gota se debe revolver continuamente durante alrededor de 30 segundos para evitar la formación de coágulos de fibrina. Hay que dejar el portaobjetos sobre una mesada plana y permitir que se seque por completo al aire, ya que cualquier resto de humedad puede causar su desprendimiento. El tiempo de secado será de al menos 30 minutos o más prolongado si el clima es húmedo. El tiempo de secado puede acortarse si se lo ventila con un abanico o con un secador de pelo (en la posición "frío"). La posibilidad de desprendimiento aumenta en los frotis hechos con sangre anticoagulada. Una vez seca la película, debe lisarse la sangre colocando el portaobjetos en agua o solución buffer inmediatamente antes de la tinción.

Si se utiliza sangre anticoagulada (que en la actualidad es la práctica habitual), no es necesario revolver la muestra porque no se forman filamentos de fibrina. El EDTA potásico es el anticoagulante de elección. García (comunicación personal) describió una técnica en la cual pueden realizarse los frotis de gota gruesa y fina en el mismo portaobjetos. Para ello se colocan dos o tres gotas de sangre anticoagulada en uno de los extremos del portaobjetos y luego, con el palillo de un aplicador, se extiende la gota sobre la superficie del resto del portaobjetos mediante un movimiento rodante continuo. Se formarán ambas áreas, fina y gruesa, en las intersecciones de los círculos concéntricos. Si las muestras iniciales son negativas para parásitos, deben tomarse al menos tres muestras sucesivas.

Ambos frotis deben teñirse lo antes posible después de la preparación (siempre dentro de las 48 horas) con la técnica de Giemsa o de Wright. Cabe recordar que el pH del colorante y el del buffer deben controlarse con cuidado entre 7 y 7,2; los colorantes utilizados en el laboratorio de hematología tienen un pH cercano a 6,8, lo que elimina la posibilidad de observar los gránulos de Schuffner. Debe evitarse el uso de instrumentos de tinción automatizados. Los frotis de gota gruesa pueden requerir un tiempo de exposición algo más prolongado que el empleado en las preparaciones de gota fina.

Se recomienda examinar al menos 300 campos microscópicos de objetivo de inmersión con un aumento 1 000× en gota fina y alrededor de 100 campos en los de gota gruesa. La cantidad de microorganismos puede ser muy escasa en los pacientes con recidivas, en los que presentan infección temprana y en los que recibieron un tratamiento inadecuado o profilaxis parcial. En estos casos, debe duplicarse la cantidad de campos examinados. La interpretación adecuada del frotis de gota gruesa requiere considerable experiencia y la realización de controles positivos para su comparación.

Identificación y diferenciación de parásitos

Aunque ciertos signos y síntomas clínicos pueden sugerir la posibilidad de una enfermedad parasitaria, el diagnóstico definitivo se realiza mediante la demostración del organismo causal en muestras recolectadas de manera adecuada. Como muchos artefactos de técnica pueden tener similitud con formas parasitarias, la identificación final siempre debe hacerse sobre la base de criterios morfológicos bien establecidos. Las inter-

pretaciones microscópicas, en particular, no pueden basarse en conjeturas y no debe darse un diagnóstico de laboratorio de una enfermedad parasitaria hasta que puedan demostrarse con claridad y de modo objetivo las características de identificación adecuadas. En la lámina en color 22-1 se muestran artefactos seleccionados que tienen características que sugieren parásitos verdaderos.

Un problema con el que se enfrenta tanto el estudiante nuevo como el docente de parasitología clínica es la falta de un criterio unificado para la taxonomía de los parásitos. En este libro se sigue el enfoque tradicional de separar los parásitos en diversos grupos morfológicos (protozoos, nematodos, cestodos, trematodos, etc.) con pleno conocimiento de que puede perderse cierto grado de correlación entre la clínica y el laboratorio. Por ejemplo, aunque las uncinarias y los oxiuros se incluyen desde el punto de vista taxonómico en los nematodos, existen considerables diferencias en lo que respecta a sus ciclos vitales, los modos de infección y la gravedad de las enfermedades que causan. De hecho, cada especie de parásito es única y los intentos de agruparlos con cualquiera de los criterios siempre conllevan algún grado de deficiencia.

El microscopio para el examen de los parásitos debe tener un ocular al cual se le adapta un micrómetro ocular calibrado con precisión. En el protocolo 22-4 se presenta el procedimiento de calibración del micrómetro ocular. La capacidad de medir con exactitud el tamaño de las formas parasitarias encontradas en las muestras clínicas suele ser vital para la identificación correcta de los parásitos. En las descripciones que siguen se destacan las variaciones de tamaño de varias formas parasitarias diagnósticas.

Ciclos vitales de los parásitos humanos

Muchos de los ciclos vitales de los parásitos humanos se incluyen en las secciones sobre identificación de laboratorio que siguen. No se pretende que los estudiantes memoricen las fases de cada ciclo vital; antes bien, estas descripciones son útiles para indicar las formas infectantes, invasivas y diagnósticas de cada parásito, un conocimiento de lo que es necesario para el diagnóstico.

La figura 22-2 se diseñó para proporcionar una orientación global de los ciclos vitales de los parásitos importantes para los seres humanos. Los parásitos pueden dividirse en tres grupos principales sobre la base de sus ciclos de vida: 1) los que no tienen huésped intermediario, 2) los que utilizan un huésped intermediario y 3) los que requieren dos o más huéspedes intermediarios.

Los parásitos que no tienen huésped intermediario se transmiten directamente entre los seres humanos (o entre los animales) a través de alimentos o agua contaminados por heces. Esto es cierto para la mayoría de los protozoos y para ciertos nematodos como *Enterobius vermicularis* y *Trichuris trichiura*. La transmisión interhumana ocurre por la transferencia de quistes o huevos que pueden sobrevivir en las condiciones ambientales externas y contaminan los alimentos o los suministros de agua. Los huevos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y las uncinarias requieren un período de maduración después de la eliminación por las heces en el ambiente antes de convertirse en infectantes. El ciclo vital de *Ascaris lumbricoides*, aunque sigue la vía fecal-oral sin necesidad de un huésped secundario, es más complejo porque después de la eclosión en el intestino delgado, las larvas ingeridas ingresan en la circulación a través de los linfáticos y pasan por los pulmones antes de ser deglutidas con las secreciones orales. El modo de infec-

ción de las uncinarias y de *Strongyloides stercoralis* no es a través de la vía fecal-oral, sino la penetración directa de la piel descubierta de larvas filariformes que se encuentran en el estiércol o en el suelo contaminado.

Los parásitos que precisan un huésped intermediario suelen involucrar un mamífero de gran tamaño, roedores, crustáceos o insectos vectores dentro de los cuales completan sus ciclos vitales, un proceso que puede ser simple o complejo. Por ejemplo, el intestino humano actúa como el huésped primario para los parásitos adultos de *Taenia solium* y *Taenia saginata*. El cerdo y la vaca, respectivamente, son huéspedes secundarios para estas tenias, cuando los adultos no habitan el intestino; en ellos, las larvas residen en el músculo esquelético. Los seres humanos se infectan mediante la ingestión de carne infestada, carne con cisticercosis. Por último, las larvas eclosionadas encuentran su camino hacia el intestino para madurar en parásitos adultos. La forma larvaria de ciertas tenias también puede causar una enfermedad en los seres humanos conocida como cisticercosis. Cuando se ingieren huevos de *Taenia solium*, por ejemplo, estas larvas de primer estadio pueden enquistarse dentro del hígado, el cerebro y otros órganos. La hidatidosis es un segundo ejemplo de enfermedad larvaria quística en los seres humanos, en la cual los cánidos, como huésped primario o definitivo, albergan la tenia *Echinococcus* en el intestino. En el ciclo vital normal de la hidatidosis, la oveja suele actuar como huésped secundario; en éste, tras la ingestión de huevos infectantes se forman las lesiones quísticas, sobre todo en el hígado y probablemente también en otros órganos. El ciclo vital del parásito se completa cuando perros y otros carnívoros ingieren vísceras de ovinos muertos infectados por la larva.

Los parásitos que implican a crustáceos e insectos siguen una serie compleja de estadios de desarrollo antes de que se libere la forma infectante. Por ejemplo, en el paludismo, los plasmodios sufren la gametogénesis sexual dentro del mosquito antes de que los esporozoítos infectantes sean inoculados de nuevo al huésped humano. Un ciclo vital similar es característico de otras infecciones parasitarias de la sangre, como tripanosomiasis, leishmaniasis y filariasis. Los parásitos que requieren dos huéspedes intermediarios (*Diphyllbothrium latum* y la mayoría de los trematodos) siguen ciclos vitales similares.

Los huevos eliminados por el parásito adulto que infectan al huésped primario eclosionan en un ambiente acuoso adecuado y liberan formas ciliadas que nadan libremente denominadas miracidios. Éstos son muy móviles y se desplazan con mucha rapidez (2 mm/s). Por la acción de fotorreceptores, receptores del tacto y quimiorreceptores, los miracidios son atraídos a su huésped caracol complementario. La adherencia tiene lugar en algunas horas porque su vida es muy breve. En su parte anterior tienen glándulas que segregan enzimas proteolíticas para atravesar el tegumento del caracol. La penetración en el caracol se produce en alrededor de 30 minutos, tiempo durante el cual el miracidio pierde su epitelio ciliado. Una vez en su interior, cada miracidio se redondea y forma el estadio de esporoquiste, en el cual tiene lugar la multiplicación en estructuras similares a quistes conocidas como redias. Por lo tanto, un único miracidio se multiplica en numerosas cercarias infecciosas que nadan libremente.

Las cercarias, de varias formas de acuerdo con la especie, cuando se liberan del caracol buscan e invaden la carne de crustáceos o peces, por la acción de enzimas producidas por diversas glándulas de penetración parabucal. Mediante la ingestión de las metacercarias contenidas en la carne de cangrejo o de pescado cruda o poco cocida también se infecta un segundo huésped.

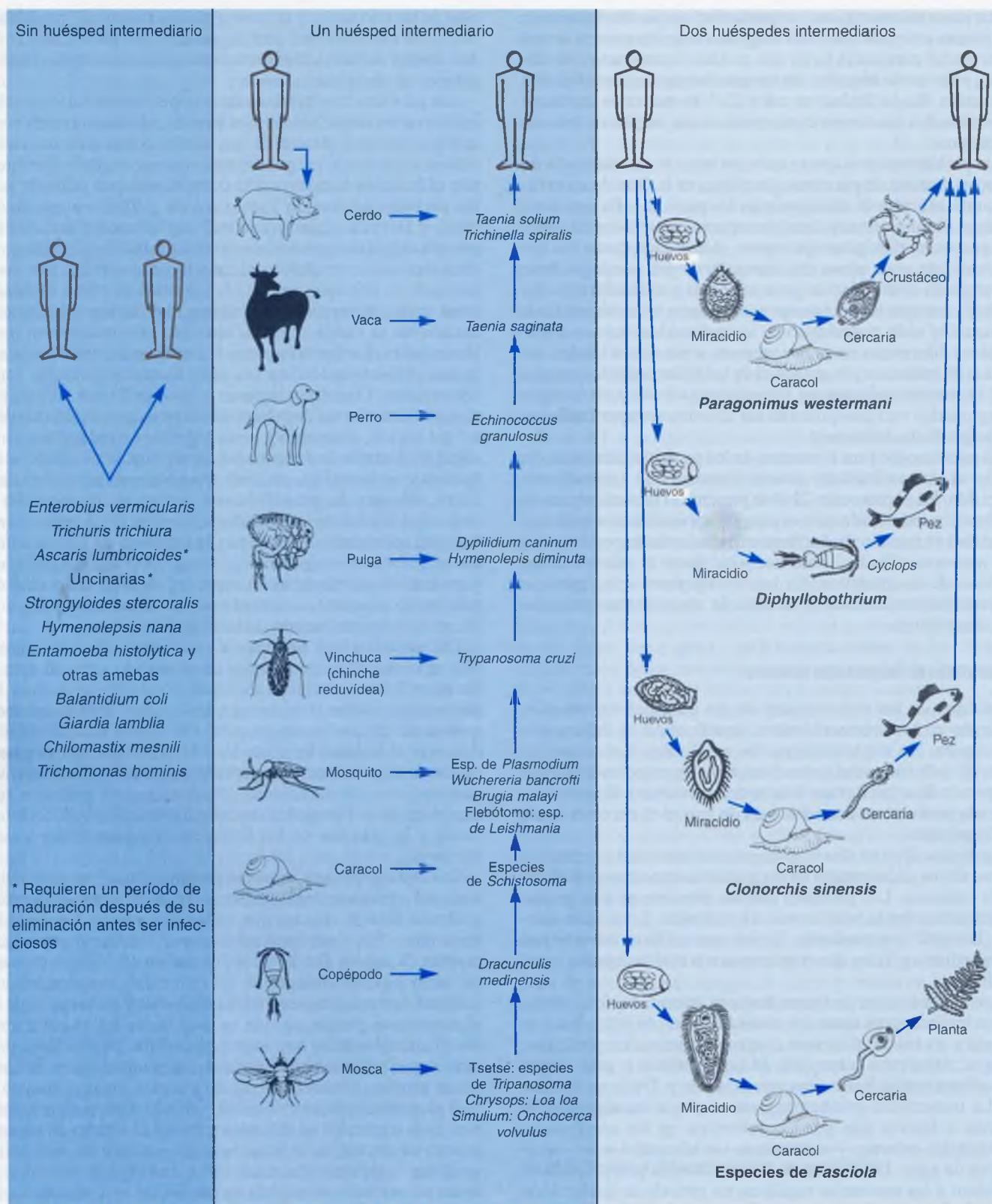


Figura 22-2 Esquema general de los ciclos vitales de parásitos de importancia para los seres humanos. Las especies de parásitos se dividen de acuerdo con su necesidad de ningún huésped intermediario, de uno o de dos. También se incluyen diagramas de los huéspedes intermediarios frecuentes.

En el ciclo vital de *Fasciola* y especies de *Fasciolopsis*, las cercarias se adhieren a las plantas acuáticas como metacercarias encapsuladas e inactivas. Los seres humanos se infectan al ingerir plantas acuáticas crudas o cocidas de modo deficiente sobre las cuales están adheridas estas metacercarias.

Protozoos intestinales

En la actualidad se reconocen cuatro amplios grupos de protozoos intestinales, como se mencionan a continuación: 1) las amebas, 2) los flagelados, 3) los ciliados y 4) los coccidios. La tarea de aprender las características diferenciales de estos protozoos es algo menor cuando se comprende que sólo algunas especies dentro de cada uno de estos grupos principales son de importancia médica. De acuerdo con la clasificación propuesta por Levine y cols.¹⁶³ los siguientes son los protozoos intestinales que presentaremos aquí:

Amebas

Entamoeba histolytica
(*Entamoeba hartmanni*)
(*Entamoeba dispar*)
Entamoeba coli
(*Entamoeba polecki*)
Iodamoeba bütschlii
Endolimax nana

Flagelados

Giardia lamblia
Chilomastix mesnili
*Dientamoeba fragilis**
Especies de *Trichomonas*

Ciliados

Balantidium coli

Coccidios

Especies de *Cryptosporidium*
Isospora belli
Especies de *Sarcocystis*
Especies de *Cyclospora*
Especies de *Microsporidium*

Amebas intestinales

Tres géneros de amebas pueden habitar el intestino de los seres humanos: *Entamoeba*, *Iodamoeba* y *Endolimax*. Los miembros de los últimos dos géneros, es decir, *Iodamoeba bütschlii* y *Endolimax nana*, suelen considerarse no patógenos. Desde la perspectiva del laboratorio es importante identificarlos de modo objetivo en las muestras de heces y no confundirlos con otros protozoos que pueden causar enfermedad. De las amebas, sólo

Entamoeba histolytica se considera potencialmente patógena para los seres humanos. Al comienzo de la capacitación, los estudiantes deben desarrollar un enfoque por el cual puedan identificar, sin dudas, este parásito cuando se observa en muestras de heces. La ameba *E. hartmanni* que "imita" a *Entamoeba histolytica* y la especie recientemente designada como *Entamoeba dispar*, que se describirá luego con más detalle, se han encontrado como no patógenas y de poca importancia clínica cuando se observan en muestras de heces.

AMEBIASIS Y ENTAMOEBA HISTOLYTICA

La disentería amebiana está causada por las cepas patógenas de *E. histolytica*. El organismo se transmite de modo directo por la vía fecal-oral a través de suministros de agua o alimentos contaminados, ya sea en forma directa por las deposiciones de las personas infectadas o indirecta por cucarachas o moscas que actúan como vectores mecánicos. Las mejoras en las medidas de higiene y las condiciones socioeconómicas, y las alteraciones en prácticas específicas, como el lavado de las manos, el control de las moscas, las mejoras en la calidad del agua y las instalaciones sanitarias son objetivos a corto y a largo plazo en los que lamentablemente fallan la mayoría de las áreas endémicas del mundo. Se estima que entre el 5% y el 50% de los individuos de áreas endémicas portan *Entamoeba histolytica* en el intestino. De éstos, el 10% manifestará la enfermedad intestinal disintérica e invasiva y el 0,5% presentará la enfermedad extraintestinal, con mayor frecuencia abscesos hepáticos. De estos últimos, entre el 2% y el 10% fallece. La tasa de mortalidad puede ascender al 70% en personas con colitis fulminante. Los síndromes clínicos asociados con infecciones por *E. histolytica* se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-1. El ciclo vital de *E. histolytica*, como prototipo de todas las amebas intestinales, se muestra en la figura 22-3.

Identificación por el laboratorio. Las formas parasitarias verdaderas deben diferenciarse de una diversidad de artefactos del fondo que se prestan a confusión y que pueden encontrarse en las preparaciones microscópicas en fresco y en los frotis de heces. Welsh²⁸⁵ indica que el diagnóstico correcto de amebiasis reside en las observaciones precisas del personal de laboratorio hábil y lamenta la alta frecuencia de excesos o defectos en la identificación de amebas en muestras de heces. Se citaron varios estudios que indican que hasta en un tercio de los laboratorios de los Estados Unidos y otros países, *E. histolytica* no se identificó de manera correcta; además, varios brotes de presunta amebiasis investigados por los CDC fueron alarmas falsas debido a errores en la identificación del laboratorio. Los granos de polen, los elementos vegetales digeridos de manera incompleta y las células somáticas derivadas del huésped están entre los artefactos que pueden prestarse a confusión. En la lámina en color 22-1 se ilustran varios de los artefactos encontrados con frecuencia.

En particular, los quistes amebianos deben diferenciarse de los leucocitos polimorfonucleares activos que presentan dos o más lóbulos; sin embargo, el citoplasma de los leucocitos es grueso sin evidencia de un cariosoma distintivo y la membrana nuclear es gruesa sin evidencia de cromatina adherida (lámina en color 22-2A). Los microscopistas pueden reducir las posibilidades de error asegurándose de que las estructuras parasitarias se identifican objetivamente antes de realizar una identificación positiva. Si existe alguna duda, se debe revisar y buscar formas más convincentes en la misma preparación, examinar preparaciones adicionales de la misma muestra o solicitar la recolección de muestras de heces nuevas.

* *Dientamoeba fragilis*, antes clasificada como una ameba, en la actualidad se considera un flagelado, específicamente en el género *Histomonas* o en el género *Trichomonas*, sobre la base de estudios inmunológicos y estructurales por microscopía electrónica en los últimos años. Como en la mayoría de los laboratorios clínicos se utiliza el microscopio óptico para examinar las muestras, el cambio actual en la clasificación de *Dientamoeba fragilis* es de valor más teórico que práctico. La tarea importante es aislar el organismo en pacientes con síntomas intestinales y realizar una identificación precisa.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-1 Amebiasis

Los síndromes mórbidos secundarios a la infección por *E. histolytica* han sido señalados por Guerrant.¹¹⁵ Casi todos los seres humanos infectados por *E. histolytica* (80-99%) son asintomáticos, determinado por la observación de quistes excretados en los exámenes de cribado fecales o de los datos de encuestas serológicas. Una mayoría de los que presentan síntomas tienen enfermedad limitada al aparato digestivo, luego de un período de incubación promedio de 1 a 4 semanas después de la infección. Las lesiones en el intestino grueso típicas se denominan úlceras en "botón" porque los trofozoítos que penetran a través de la mucosa son incapaces de digerir la musculatura de la pared intestinal y, por consiguiente, se extienden lateralmente a lo largo de la submucosa. (En la lámina en color 22-2D, se ilustran varios trofozoítos en la submucosa). Los síntomas de presentación habituales son dolor en la porción inferior del abdomen, fiebre de baja intensidad y diarrea sanguinolenta con tenesmo o sin él. El embarazo, la desnutrición, las enfermedades metabólicas de base y el tratamiento con corticosteroides predisponen a la enfermedad más grave. Las complicaciones son relativamente infrecuentes, aparecen en el 1% al 4% de los casos e incluyen perforación intestinal y peritonitis. Se han informado casos de amebomas paracecales que a veces forman una masa inflamatoria anular que simulan un carcinoma de colon.

La amebiasis extraintestinal sucede con frecuencia variable en diferentes regiones geográficas. En México, la enfermedad invasiva se manifiesta en uno de cada cinco individuos infectados, en comparación con sólo 1 de cada 100-1 000 en los Estados Unidos. El comienzo de los síntomas puede ser en el transcurso de días después del episodio agudo de disentería, o retrasarse meses o incluso años. El hígado es el órgano extraintestinal afectado con mayor frecuencia. Adams y McLeod³ informaron que hasta en el 50% de los casos de abscesos amebianos hepáticos falta el antecedente de amebiasis intestinal y no pueden detectarse trofozoítos ni quistes en las muestras de heces. Los síntomas son pérdida de peso, fiebre de baja intensidad, debilidad y sensación de malestar en el cuadrante superior derecho y dolor provocado a la palpación entre las costillas. La anemia, la leucocitosis y el aumento de las concentraciones de la fosfatasa alcalina son otros signos que apoyan el diagnóstico. Éste suele hacerse mediante la observación del defecto característico de gran tamaño y único en el lóbulo derecho observado en la gammagrafía hepática. Es infrecuente la extensión directa a la pleura o al pericardio, o la presencia de focos metastásicos en el cerebro, el pulmón o el riñón.

Una vez que se determina que la forma observada en una muestra de heces es realmente ameba, sea trofozoíto o quiste, hay que investigar si los núcleos tienen cromatina depositada en la membrana externa, lo que da el aspecto de un anillo teñido densamente (lámina en color 22-2B). Este anillo de cromatina es característico del núcleo tipo "*Entamoeba*". Los núcleos de amebas que pertenecen a otros géneros, *Iodamoeba* y *Endolimax*, carecen de esta disposición periférica de la cromatina y se asemejan más a una "bola en un hoyo" (lámina en color 22-2 I, J y K).

ENTAMOEBA HISTOLYTICA Y ENTAMOEBA COLI**Criterios microscópicos definitivos para la diferenciación entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli***

- Los trofozoítos de *E. histolytica* presentan una movilidad unidireccional, es decir, emiten pseudópodos a lo largo de un

único plano y realmente salen del borde del campo del foco cuando se observan en una preparación microscópica en fresco.

- Por otra parte, los trofozoítos de *Entamoeba coli* emiten pseudópodos en múltiples planos y se mueven sin rumbo en una dirección y luego en otra.
- Los trofozoítos de *E. histolytica* también tienen la capacidad singular de ingerir eritrocitos; es muy raro que los eritrocitos ingeridos se observen en los trofozoítos de *Entamoeba coli*. Gonzalez-Ruiz y cols.¹⁰⁴ hallaron que las cepas eritrofagocíticas de *E. histolytica* siempre muestran un patrón enzimático o zimodemo patógeno. Los autores concluyeron que la fagocitosis de eritrocitos es casi 100% específica para *Entamoeba histolytica* y cuando se observa en preparaciones en fresco de heces es pronóstico de infección con una cepa invasiva.
- Un quiste tipo *Entamoeba* que tiene más de cuatro núcleos descarta *E. histolytica* (lámina en color 22-2F).

Criterios microscópicos secundarios para la diferenciación entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli*. Todas las otras características de identificación entre estas dos amebas son secundarias, pueden ser variables y sólo conducen a una identificación presuntiva cuando se observan.

- Los trofozoítos y los quistes de *Entamoeba coli* (15-50 µm y 10-35 µm, respectivamente) en promedio son más grandes que los de *Entamoeba histolytica* (12-40 µm y 10-20 µm, respectivamente); sin embargo, hay suficiente superposición en el tamaño para simplificar la importancia de esta observación.
- Los cariosomas intranucleares de *E. histolytica*, si se observan en trofozoítos o en quistes, tienden a ser diminutos y se ubican en la región central (lámina en color 22-2B), a diferencia de los cariosomas relativamente más grandes y con localización excéntrica en *Entamoeba coli* (lámina en color 22-2E).
- El anillo de cromatina nuclear de *E. histolytica* está disperso de manera uniforme y se asemeja a cuentas (lámina en color 22-2B), a diferencia de la distribución borronada observada en *Entamoeba coli* (lámina en color 22-2E).
- El citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica* tiende a ser liso o finamente granular (debido a las poderosas enzimas proteolíticas que digieren por completo a las partículas fagocitadas) (lámina en color 22-2B), a diferencia del citoplasma "sucio" de los trofozoítos de *Entamoeba coli* (lámina en color 22-2E).
- Aunque las barras de los cuerpos cromatoides sólo se observan en el 10-15% de los quistes, cuando están presentes, en *E. histolytica* (y *E. hartmanni*) tienen extremos lisos y redondeados (lámina en color 22-2H) en contraste con el aspecto fragmentado y deshinchado de las observadas en los quistes de *Entamoeba coli* (lámina en color 22-2F).

Al combinar dos o más de estas características cuando se observan varias formas amebianas en una preparación microscópica en fresco, suele hacerse una identificación altamente presuntiva, si no definitiva.

La observación crítica de un núcleo tipo *Entamoeba* de una forma amebiana en una preparación microscópica también puede ser útil en otras dos situaciones. A menudo los prequistes de *E. histolytica* y *Entamoeba coli* (formas intermedias en la fase del ciclo vital cuando el trofozoíto comienza a enquistarse) forman vacuolas intracitoplasmáticas prominen-

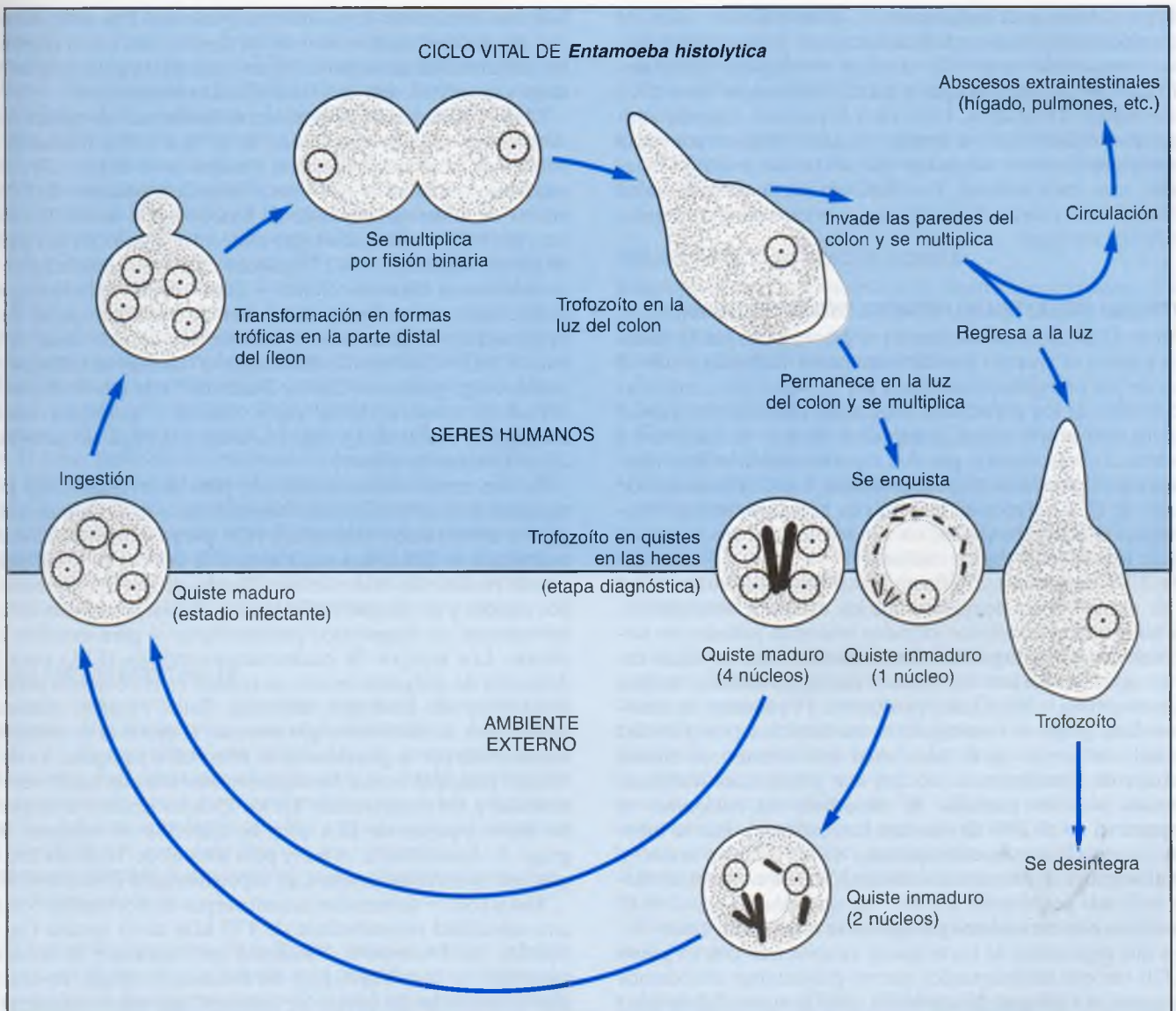


Figura 22-3 El ciclo vital de *Entamoeba histolytica* es simple y no requiere huéspedes intermediarios. Las formas quísticas resistentes se encuentran en el ambiente externo; cuando son ingeridas por un ser humano en alimentos o agua contaminados, se transforman en formas tróficas en el intestino y dan origen a los trofozoítos móviles y de vida libre. Estos trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal, llegar a la circulación y causar abscesos extraintestinales en varios órganos, en particular en el hígado.

tes, que simulan masas de glucógeno características de *Iodamoeba bütschlii* (lámina en color 22-21). *Entamoeba hartmanni* forma trofozoítos y quistes que son en promedio más pequeños, de 5-15 μm menor que los de *Endolimax nana*. De nuevo, la diferenciación de los núcleos tipo *Entamoeba* característicos de *E. histolytica* de la presentación en “bola en un hoyo” de *Endolimax nana* reducirá la confusión entre ambas especies. (En la lámina en color 22-2, compárense las fotografías B y K).

Entamoeba polecki es otro miembro del género *Entamoeba* que rara vez se encuentra en muestras de heces humanas, y se halla en particular en individuos que pueden estar en contacto estrecho con cerdos. Es necesaria gran experiencia para identificar de manera objetiva las formas microscópicas de este organismo. El trofozoíto se asemeja al de *Entamoeba coli* en tamaño, comparte el patrón lento de movilidad, la excentricidad del

cariosoma nuclear y el aspecto “sucio” del citoplasma. De modo típico los quistes tienen un solo núcleo (nunca más de dos) con un cariosoma pequeño, excéntrico y distribución fina y regular de la cromatina junto a la membrana nuclear. En el citoplasma pueden observarse masas pequeñas y múltiples de glucógeno que se tiñen con yodo. Un caso de infección humana se comunicó en un refugiado japonés.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE AMEBIASIS

Lotter y cols.¹⁷¹ demostraron métodos sensibles y específicos para el serodiagnóstico en la amebiasis invasiva, mediante técnicas de inmunotransferencia y ensayo inmunosorbente ligado a enzimas para detectar la proteína recombinante específica de la superficie de *E. histolytica* patógena. Cummins y cols.⁵⁰ utilizaron una prueba de aglutinación del látex rápida, no comer-

cial, para detectar el antígeno de *E. histolytica* en suero de pacientes con amebiasis extraintestinal, que proporcionó resultados comparables con otras técnicas serológicas estándares utilizadas en paralelo. Haque y cols.¹¹⁹ informaron hace poco que el equipo TechLab *E. histolytica* II permitió detectar antígeno sérico (Gal/GalNAc lectina) en casi todos los pacientes con absceso hepático amebiano que no habían recibido tratamiento con metronidazol. Los laboratorios locales de salud pública estatal y de los CDC brindan servicios para la comprobación del antígeno.

ENTAMOEBA HISTOLYTICA NO PATÓGENA: ENTAMOEBA DISPAR

Ya en 1925, Brumpt reconoció por primera vez que la disentería grave o el absceso hepático amebiano afectaban a sólo el 10% de los individuos infectados por *E. histolytica*, mientras que el 90% de los portadores intestinales permanecían asintomáticos, por lo que surgió la hipótesis de que las infecciones amebianas eran causadas por dos especies con la misma morfología pero con diferente patogenicidad.²² Así, la presencia de quistes de *E. histolytica* en muestras de heces no siempre revela la infección activa, lo que indica que sólo ciertas cepas pueden invadir los tejidos y causar citólisis.²⁴⁹

En 1978, Sargeant y Williams²³⁴ utilizaron electroforesis en gel de almidón para demostrar que los extractos obtenidos de amebas crecidas en cultivos axénicos presentan patrones de isoenzimas diferentes. Específicamente, la reactividad de cuatro enzimas: glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa y hexocinasa produjeron 18 patrones de zimodemo. Este grupo de investigadores encontró con posterioridad que sólo las cepas de *E. histolytica* que demuestran ciertos patrones de zimodemo se asocian con infecciones humanas. Además, sólo los patrones de zimodemo no patógenos se encontraron en el 20% de varones homosexuales que se atendían en una clínica de enfermedades de transmisión sexual y que albergaban *E. histolytica* intestinal.⁶ La demostración ulterior realizada por Weinke y cols.²⁸² de que sólo las cepas de *E. histolytica* con zimodemos patógenos se aislaron en cinco viajeros que regresaban de los trópicos, en contraste con un grupo de 320 varones homosexuales que no presentaban zimodemos patógenos ni síntomas de amebiasis, creó la necesidad de crear métodos en los cuales puedan diferenciarse las cepas patógenas de las no patógenas.

Durante la última parte de la década de 1980 y comienzos de la de 1990, muchos interrogantes permanecieron sin responder respecto de la patogenicidad de ciertas cepas de *E. histolytica*. Se consideró que la flora bacteriana autóctona y la capacidad de *E. histolytica* de modular su virulencia de acuerdo con las condiciones de cultivo desempeñaban alguna función.¹⁸⁵ Geurrant¹¹⁵ y Ravdin²²² describieron otros mecanismos de virulencia característicos de *E. histolytica* para causar enfermedad: 1) factores de adherencia químicamente definidos (adhesina específica de galactosa) que determinan si el organismo puede adherirse a la mucosa intestinal, 2) la secreción de citotoxinas, como hialuronidasa, tripsina, pepsina, gelatinasa y enzimas hidrolíticas para caseína, fibrina y hemoglobina y 3) la producción de enzimas proteolíticas. El huésped utiliza diversas defensas para protegerse contra la invasión por parásitos.²¹² Las proteasas pancreáticas, las sales biliares y las glucosidasas bacterianas pueden destruir la adhesina específica de galactosa de la superficie de las amebas y bloquear la adherencia. Las mucinas colónicas, producidas en respuesta al contacto de las células epiteliales por amebas, también pueden bloquear la adherencia mediante la unión del dominio de reconocimiento de

hidratos de carbono de la adhesina galactosa. Los seres humanos con enfermedades debilitantes, desnutridos o con respuestas inmunitarias defectuosas están particularmente propensos tanto a la enfermedad intestinal como extraintestinal.

Clark y Diamond⁴² determinaron finalmente el mecanismo subyacente de la patogenicidad de *E. histolytica* mediante el empleo de métodos moleculares basados en el análisis de polimorfismos estables de DNA para identificar patrones de DNA únicos en diferentes cepas de *E. histolytica*. A través de estos estudios basados en la biología molecular, junto con los realizados por Orozco y cols.,²⁰³ quienes clonaron, secuenciaron y caracterizaron diversos clones y cepas de *E. histolytica*, se pudo establecer que las diferencias en las cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* y la expresión de sus varias diferencias en los patrones de zimodemo se basaban en diferencias en su código genético. Clark y Diamond⁴² retuvieron de modo oficial el nombre de la cepa clásica y patógena como *Entamoeba histolytica* y denominaron a la cepa no patógena como *Entamoeba dispar*.²²

Se han creado técnicas eficaces para diferenciar estas dos especies. Las más utilizadas consisten en la detección de antígeno y los métodos basados en PCR para la amplificación de genes para el rRNA. Las pruebas para la detección de antígeno son de realización relativamente simple, proporcionan resultados rápidos y se adaptan mejor para su uso en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico parasitológico y para estudios de campo. Los equipos de enzimo-inmunoanálisis (EIA) para la detección de antígenos fecales se venden en el comercio para el diagnóstico de amebiasis intestinal. Estos estudios emplean anticuerpos monoclonales que detectan la proteína de adherencia inhibible por la galactosa de *E. histolytica* patógena. Su desventaja principal es que se requieren muestras de heces recién emitidas y sin conservantes. En los Estados Unidos se dispone de varios equipos de EIA para la detección de antígeno del grupo *E. histolytica/E. dispar*, pero sólo el de TechLab kit, al que nos referiremos después, es específico para *E. histolytica*.

Yau y cols.³⁰² desarrollaron anticuerpos monoclonales contra una subunidad recombinante de 170 kDa de la lectina Gal o GalNAc de *Entamoeba histolytica* que reconoce de manera específica *E. histolytica*, pero no *Entamoeba dispar* en muestras conservadas de heces. Se encontró que estos anticuerpos no reaccionan en forma cruzada con otros protozoos intestinales, como *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* y *Dientamoeba fragilis*. Haque y cols.¹²⁰ demostraron que el rendimiento del equipo para la detección de antígeno de *E. histolytica*, TechLab (Blacksburg, VA), destinado a identificar de modo específico *E. histolytica* y diferenciarlo de *E. dispar* en muestras de heces, era comparable respecto de la sensibilidad con el procedimiento de PCR anidada (*nested*) hecha en paralelo. Aunque en este momento también se cuenta con otros equipos para la detección de antígenos, sólo el de TechLab es específico para *E. histolytica*.

Otros investigadores encontraron que las pruebas de PCR son más sensibles que los procedimientos para la detección de antígenos en la identificación de *E. histolytica/dispar*. Katzwinkel-Wladarsch y cols.,¹⁴⁹ mediante un método de extracción simple de DNA y amplificación por PCR, pudieron detectar antígeno específico de *E. histolytica* directamente en muestras de heces que contienen tan poco como un trofozoito por miligramo de heces. Acuna-Soto y cols.² demostraron que las técnicas de PCR también pueden utilizarse para detectar antígeno de *E. histolytica* en muestras de heces fijadas con formaldehído. En los últimos tiempos, Blessmann y cols.,¹⁹ con una técnica de PCR en tiempo real, realizada con el sistema

LightCycler que emplea la detección de sondas marcadas con fluorescencia, pudieron detectar cantidades mínimas de 0,1 parásito por gramo de heces. Cabe destacar que la sensibilidad de este procedimiento de PCR indicó que tanto el examen microscópico de las muestras de heces como el cultivo, en particular, subestiman la presencia de infecciones por *E. histolytica*. Entre las desventajas de los procedimientos de PCR se mencionan el tiempo que insume la realización de la prueba, su relativa complejidad, la incomodidad para ejecutarlos, la necesidad de equipamiento especial y el costo relativamente elevado.

Por lo tanto, dado que hay un alto porcentaje de personas en las que se observan elementos morfológicos que se asemejan a *E. histolytica* en muestras de heces y que no requieren tratamiento, en el futuro habría que realizar el seguimiento de la detección de antígeno o de procedimientos de PCR para identificar de manera correcta el subgrupo de *E. dispar* no patógena. Los equipos de reactivos disponibles en la actualidad para el transporte de muestras a un laboratorio de referencia requieren el procesamiento de muestras de heces recién emitidas. Si no está indicado el tratamiento en casos en los que se identifican organismos *E. histolytica*/*dispar* en esas muestras, los pacientes deben al menos ser informados de que pueden portar organismos potencialmente virulentos y que, por consiguiente, se requiere tomar medidas preventivas. Cuando está indicado, el metronidazol (Flagyl®) es el tratamiento de elección.

OTRAS AMEBAS INTESTINALES

Como ya se mencionó, los otros protozoos intestinales encontrados con frecuencia, *Iodamoeba bütschlii* y *Endolimax nana*, no se consideran patógenos. Desde la perspectiva del laboratorio, es importante identificarlos de modo objetivo en las muestras de heces y no confundirlos con otros protozoos que pueden causar enfermedad. Por consiguiente, los criterios de identificación para cada uno son los siguientes.

***Iodamoeba bütschlii*.** Este protozoo puede identificarse mediante la demostración de:

- El trofozoíto, que varía de 6-25 μm , tiene un núcleo del tipo “bola en un hoyo”. Las formas más pequeñas son difíciles de distinguir de *Endolimax nana* y debe realizarse la búsqueda de los quistes más característicos. (Véase lámina en color 22-2I).
- El quiste, que varía de 6 a 15 μm , además del núcleo en “bola en un hoyo”, tiene una vacuola de glucógeno única, grande, que se tiñe positiva con yodo (la estructura a partir de la cual deriva el nombre del género). (Véase lámina en color 22-2J).
- Nota: los prequistes tempranos de *Entamoeba coli* y, con menor frecuencia, de *E. histolytica*, también pueden tener inclusiones citoplasmáticas de aspecto similar (lámina en color 22-2G). Sin embargo, puede observarse más de un núcleo, cada uno con un anillo de cromatina sobre la membrana nuclear, característica del denominado núcleo del tipo *Entamoeba*.

***Endolimax nana*.** Este protozoo puede sospecharse en el examen inicial por:

- Su tamaño relativamente pequeño, que varía de 5 a 8 μm .
- La observación de trofozoítos con movilidad lenta, con un núcleo único desprovisto de cromatina periférica y un cariosoma grande en “bola en un hoyo” (lámina en color 22-2K).
- Identificación de los quistes, que también son pequeños (5-14 μm) y presentan hasta cuatro núcleos, cada uno con cariosoma similar a un manchón. (Véase lámina en color 22-2L).

- *Entamoeba hartmanni*, aunque con las mismas variaciones de tamaño que *E. nana*, puede distinguirse sobre todo porque tanto el trofozoíto como los quistes tienen un núcleo de tipo *Entamoeba*, a diferencia del núcleo en “bola en un hoyo” de *E. nana*.
- Los quistes de *Entamoeba hartmanni* típicamente contienen una o más barras cromatóides con extremos redondeados y lisos (lámina en color 22-2H).

PROTOZOOS DE CLASIFICACIÓN INCIERTA

***Blastocystis hominis*.** Este protozoo, alguna vez considerado una levadura, fue clasificado hace poco como protozoo, específicamente en las amebas, sobre la base de las características descritas por Zierdt.³⁰⁷ El organismo:

- No tiene pared celular.
- Crece sólo en presencia de bacterias y no en medios de cultivos para hongos.
- Tiene preferencia por el pH alcalino y un ambiente levemente hipotónico.
- Se reproduce por fisión binaria y no por brotación.
- Extiende y retrae los pseudópodos e ingiere bacterias.
- Presenta una actividad óptima a 37 °C, no crece a 25 °C y es destruido a 4 °C.

Yet, Stenzel y Boreham²⁵⁸ señalaron que es escaso el conocimiento sobre su biología básica y existen controversias acerca de su taxonomía y patogenicidad. Desde el punto de vista morfológico se describieron tres formas (vacuolar, granular y ameboide), aunque también se observaron otras formas (quistica, avacuolar y multivacuolar). Se conoce poco sobre la bioquímica del organismo y en las células existen orgánulos y estructuras de función y composición desconocidas. Se han propuesto varios ciclos vitales, pero no han sido validados en forma experimental y no se ha definido la forma implicada en la transmisión.

Desde el punto de vista morfológico, las formas parasitarias de *B. hominis*:

- Aparecen como células esféricas de tamaño irregular, que varían de 5 a 15 μm de diámetro, aunque en ocasiones se hallan formas más pequeñas (lámina en color 22-2M).
- Tienen un cuerpo central con tinción homogénea (verde en las tinciones tricrómicas) que ocupa alrededor del 70% de la célula.
- Presentan material nuclear, disperso en fragmentos indefinidos entre el cuerpo central y la membrana externa o aparecen como una o dos masas alargadas en una distribución bipolar.

MacPherson y MacQueen¹⁷³ señalaron la variabilidad morfológica en el tamaño, la forma, los detalles nucleares y el cuerpo central característicos entre las células, que en cierta medida pueden determinar las diferencias en la incidencia de la detección de *B. hominis* en varios estudios de casos.

Sobre la base de los estudios iniciales realizados por Zierdt,³⁰⁷ otras publicaciones de mediados de la década de 1980^{90,161,269} se ofrecieron como evidencia de que *B. hominis* puede ser una causa de enfermedad gastrointestinal. Su naturaleza potencialmente patógena está apoyada por los casos de diarrea recurrente informados por Vannatta²⁶⁹ y Lebar.¹⁶¹ En este último estudio se observaron numerosas formas de *B. hominis* (5 por campo microscópico de bajo aumento) en muestras de heces donde los cultivos para patógenos bacterianos y las pruebas para particu-

las de rotavirus fueron negativos. Los síntomas remitieron cuando estos pacientes recibieron tratamiento contra los protozoos. La diarrea recurrente sin fiebre, los episodios de vómitos y dolor abdominal cólico han sido los síntomas principales.

Blastocystis hominis puede ser un patógeno cuando no se encuentra otro agente o cuando la cantidad de parásitos es elevada. García y cols.⁹¹ en una revisión de más de 6 000 muestras de heces, encontraron que 289 (4,8%) fueron positivas para *B. hominis* (en dos tercios de los casos fue el único parásito hallado). Dentro de este grupo, los síntomas gastrointestinales se notaron en 24 pacientes; casi todos presentaban enfermedad debilitante de base o estaban inmunosuprimidos. El cuadro clínico de *B. hominis* consiste en dolor abdominal inespecífico, diarrea acuosa, anorexia, vómitos y pérdida de peso. En raras oportunidades sucede una forma más invasiva de la enfermedad con hemorragia rectal. Antonelli y cols.⁹ describieron el caso de una niña de 10 años que fue internada por diarrea, dolor abdominal y fiebre. En sus heces se demostraron muchas formas de *B. hominis* y respondió de modo satisfactorio al tratamiento con metronidazol. Por esto, los autores citan este caso como otro más para admitir que *B. hominis* debe considerarse un patógeno humano.

Por el contrario, Markell y Udkow,¹⁷⁷ en un estudio de 32 personas con infección por *B. hominis*, en quienes se realizaron al menos seis exámenes de heces, encontraron que 27 tenían otros patógenos reconocidos: *E. histolytica*, *Giardia lamblia* o *Dientamoeba fragilis*. En todos estos casos, los síntomas remitieron con el tratamiento. En los cinco pacientes restantes en los que sólo se encontró *B. hominis*, el tratamiento con yodoquinol erradicó los protozoos, pero persistieron los síntomas más compatibles con síndrome de intestino irritable. Nagler y cols.,¹⁹² en un estudio de 12 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en quienes las muestras de heces fueron positivas para *B. hominis*, también concluyeron que éste no es un patógeno importante para esa entidad. Todos sus pacientes mejoraron con el tratamiento médico, tres con tratamiento con corticosteroides solos y uno con reposo intestinal sin medicación. Cinco pacientes no mejoraron con metronidazol, si bien cuatro respondieron a ciclos ulteriores de corticosteroides. Keystone y Kozarsky,¹⁵² mediante análisis de antígeno, isoenzima y DNA, indicaron que *Blastocystis hominis* puede ser más que un protozoo, con cepas virulentas y avirulentas identificadas. Estos hallazgos pueden determinar las diferencias en la virulencia como lo informaron varios investigadores.

Hasta que se acuerde el problema de la patogenicidad, los parasitólogos del laboratorio clínico deben indicar la detección de *B. hominis* en muestras de heces en el informe final. Debe hacerse alguna forma de cuantificación (esporádicos, escasos, moderada cantidad, numerosos); específicamente, la presencia de cinco o más células de *B. hominis* por campo de gran aumento se considera en la categoría de cantidad moderada a numerosa y así la informan la mayoría de los laboratorios. El médico debe evaluar si estos informes tienen importancia clínica y decidir si se trata al paciente sobre la base del cuadro clínico.

Flagelados intestinales

Como su nombre lo indica, todos los flagelados tienen un órgano para la movilidad, los flagelos, que actúa como medio de locomoción. Otras estructuras también sirven como parte integral del órgano locomotor, es decir, el cinetoplasto al cual se adhieren los flagelos, y el axostilo y los cuerpos parabasales. Por consiguiente, cuando se identifica cualquiera de estas

estructuras en una forma parasitaria, el parásito puede ser tentativamente agrupado con los flagelados. A diferencia de las amebas, que asumen varias formas, los flagelados son más rígidos y tienden a retener formas distintivas, una característica que suele ser útil en su identificación. *Giardia lamblia*, *Chilomastix mesnili*, *Trichomonas hominis* y *Dientamoeba fragilis* son las especies de flagelados observados con mayor frecuencia en las muestras de heces humanas remitidas para examen.

GIARDIA LAMBLIA

A finales de la década de 1980, *G. lamblia* se convirtió en el agente más importante de la enfermedad gastrointestinal parasitaria en los Estados Unidos²¹⁴ y ha llegado a ser un problema fundamental de salud pública mundial.²⁴³ Se encontró en el 3,8% de las 414 820 muestras de heces remitidas a los laboratorios de salud estatal de los Estados Unidos como parte de un estudio de vigilancia de las parasitosis intestinales de los CDC en 1976.³⁰ Se informaron a la Organización Mundial de la Salud más de 50 brotes transmitidos por el agua que afectaron a cerca de 20 000 personas. A pesar de los programas de vigilancia activa en muchos estados, la cantidad de casos de giardiasis informados por año se duplicó en los Estados Unidos desde 12 793 en 1992 hasta 27 778 casos en 1996.⁸⁹ Los casos por 100 000 habitantes estatales variaron de 0,9 a 42,3, con 10 estados que informaron > 20 casos/100 000 habitantes. El estado de Nueva York informó la cantidad máxima de casos totales: 3 673 o 14,5% de todos los casos y Vermont informó la tasa de incidencia máxima de 42,3/100 000 habitantes.

La alta prevalencia de giardiasis es un problema mundial, con áreas endémicas informadas en Inglaterra, Rusia, varios países de Europa del Este y muchas áreas costeras del Mediterráneo.²⁴³ *Giardia lamblia* se encontró en el 10% de los niños que residen en los orfanatos Ain-Shams y El-Mowassa de El Cairo,²³⁷ la giardiasis fue la enfermedad parasitaria más común (11,63%) entre los musulmanes que vuelven de la peregrinación anual "Haj y Omra" a la Mecca.

En la figura 22-4 se muestra el ciclo vital de *Giardia lamblia*, representante de los flagelados intestinales.

Los síndromes clínicos asociados con infecciones por *Giardia lamblia* se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-2.

Giardia lamblia no es difícil de identificar en las preparaciones microscópicas de muestras fecales. Las características principales para la identificación son:

Trofozoíto

- Varía entre 9 y 21 μm de largo por 5-15 μm de ancho, tiene simetría bilateral y dos núcleos, uno de cada lado de un axostilo central (lo que le da el aspecto de "facies simiana"). (Lámina en color 22-20).
- El citoplasma es finamente granular. Dos cuerpos parabasales medianos, que simulan un "bigote", se ubican a cada lado del axostilo. Los discos suctorios ocupan la mitad de la superficie ventral.
- Retiene la movilidad en la luz intestinal y los organismos se adhieren a la superficie de las células epiteliales (lámina en color 22-2N).
- En preparaciones en fresco, tiene una movilidad elegante como "hojas que caen", una característica útil para la identificación, que lo diferencia de *C. mesnili*, que es más lento, con movimientos más rígidos y de *T. hominis*, con un movimiento rápido, entrecortado y como un dardo.

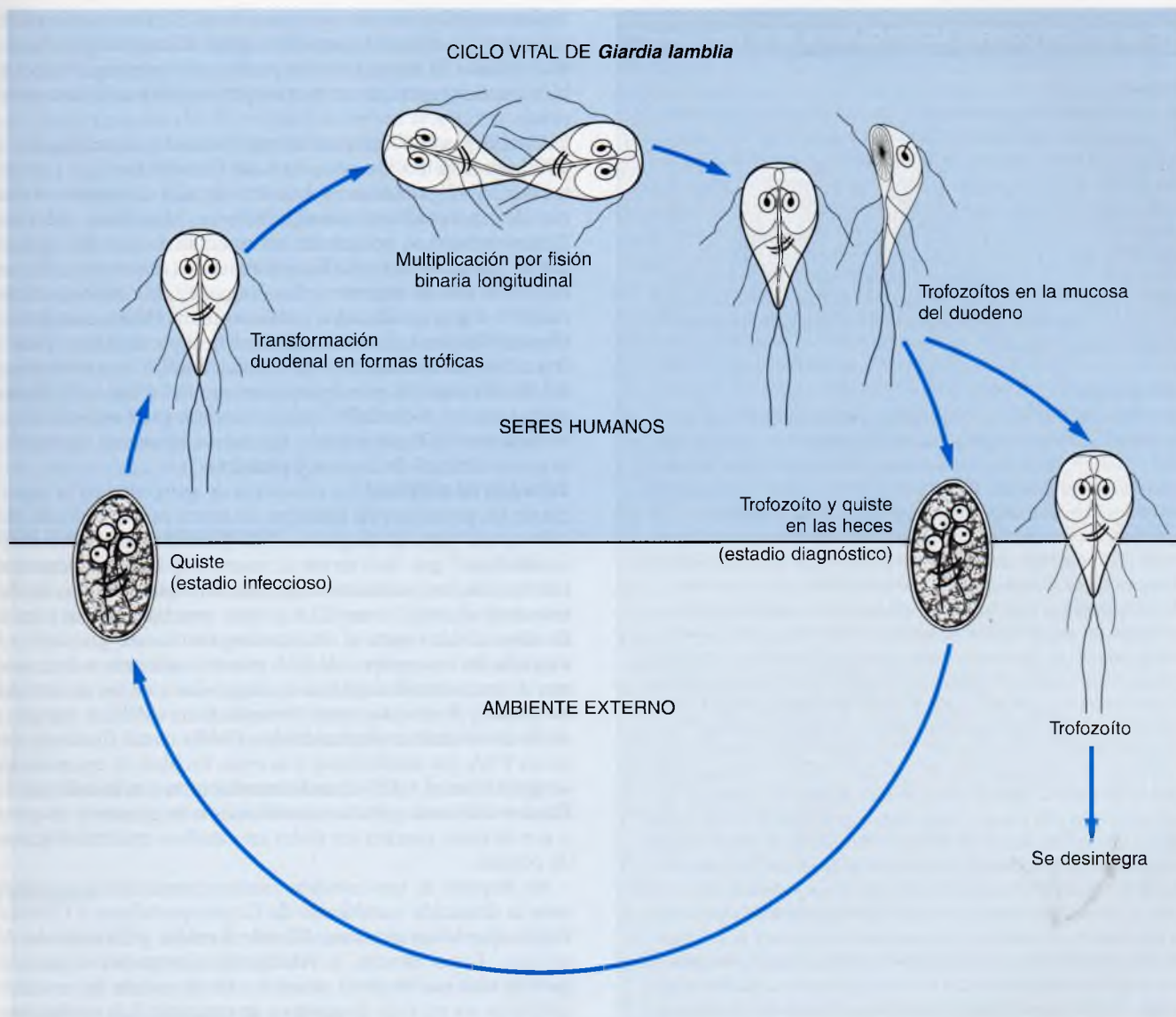


Figura 22-4 El ciclo vital de *Giardia lamblia* también se completa de modo simple por la vía de transmisión fecal-oral; los quistes proporcionan una supervivencia a largo plazo en el ambiente externo en condiciones adversas. Los quistes suelen encontrarse en corrientes y pozos de sistemas cloacales controlados de manera inadecuada y con frecuencia se encuentran contaminadas las corrientes montañosas río abajo desde áreas residenciales. Los seres humanos se infectan al ingerir agua o alimentos frescos mal lavados y contaminados con heces. En el intestino humano, la multiplicación de los trofozoítos es por fisión binaria. Los trofozoítos y los quistes se eliminan por las heces para completar su ciclo vital.

Quiste

- Mide de 8 a 12 μm y presenta un contorno ovalado; puede estar levemente teñido con bilis.
- Cuando madura, tiene cuatro núcleos, con un cariosoma pequeño colocado de modo excéntrico.
- No tiene cromatina periférica sobre la membrana nuclear.
- Tiene un espacio claro por debajo de la pared delgada del quiste, lo que produce un efecto de “halo” fácil de reconocer (lámina en color 22-2P).
- Tiene fibrillas longitudinales mal definidas y cuatro cuerpos medianos.

Dada la eliminación irregular de los protozoos en las heces, pueden requerirse varias muestras obtenidas en días no sucesi-

vos para establecer un diagnóstico en casos sospechosos, en particular en la enfermedad crónica. En un estudio publicado por Heymans y cols.¹³¹ el 53% de los pacientes tuvieron síntomas atribuibles a giardiasis de 6 meses o más de duración. El rendimiento puede mejorarse mediante la preparación de frotis teñidos de concentrados de muestras fecales, dado que los protozoos a menudo se pasan por alto cuando se realizan procedimientos en fresco con solución fisiológica.^{95,246} Heymans y cols.¹³¹ también encontraron que la “prueba fecal triple” (el examen de tres muestras de heces en días no consecutivos) tuvo una sensibilidad del 95,7% para detectar los protozoos en casos conocidos de giardiasis. Estos se encontraron sólo en 3 de 109 biopsias duodenales en pacientes cuyos exámenes de heces eran negativos (tasa de falsos negativos de 2,8%). De manera similar, McHenry y cols.¹⁸⁴ hallaron sólo 1 resultado positivo

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-2 Giardiasis²⁹²**Síntomas**

Giardia lamblia es una causa conocida de diarrea aguda, dolor abdominal y, en algunos casos, síntomas generales, como pérdida de peso y lasitud. En los casos crónicos puede experimentarse malabsorción y esteatorrea que simulan el esprue. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual *G. lamblia* causa la enfermedad. La oclusión física de la mucosa, la desconjugación de las sales biliares, la producción de enterotoxina, la liberación de prostaglandina y la lesión de los bordes en cepillo de las células epiteliales de la mucosa son diversas hipótesis analizadas por Smith y Wolfe.²⁵³ Los fármacos de elección en el tratamiento de la giardiasis cuando está clínicamente indicado son la quinacrina (Atabrine®) o el metronidazol (Flagyl®).

Epidemiología

Casi todas las infecciones son esporádicas, contraídas después de la exposición a alimentos o agua contaminados en diversas circunstancias. Smith y Wolfe²⁵³ han citado brotes transmitidos por el agua en regiones tan diversas como Colorado, Rusia y Nueva York y entre campistas en el oeste de los Estados Unidos. En el seguimiento de un brote en Aspen/Snowmass, Lapham y cols.¹⁶⁰ hallaron sólo dos casos de giardiasis entre 225 visitantes, una tasa mucho menor que la informada durante el brote ya citado. Brotes más recientes transmitidos por el agua han sido informados por Fraser y Cooke⁸⁶ en individuos que bebieron de suministros de agua municipal no filtrada en Dunedin, Nueva Zelanda; en un suministro de agua comunitaria clorada en Pencticon, Columbia Británica;¹⁸⁸ entre niños de edad preescolar que bebieron de suministros de agua escolar en Lesotho;⁷⁸ y por el uso de un tobogán de agua de un hotel nuevo que fue limpiado con bromuro y filtración por arena.¹⁰⁹

Aunque Holtan¹³⁸ y Starko y cols.²⁵⁵ han citado a los campistas como un grupo de alto riesgo para contraer giardiasis, Welch²⁸⁴ encontró este riesgo como mínimo, basado en una revisión reciente de 104 de los trabajos publicados más actuales relacionados con el agua de campo como fuente potencial para adquirir la infección. El autor puso mayor énfasis en la observación cuidadosa de las técnicas de lavado de las manos sobre la purificación del agua para disminuir el riesgo de infección. Existe la posibilidad zoonótica de que la giardiasis también sea transmitida por animales domésticos, como terneros y corderos (y tal vez también por roedores silvestres), los que pueden actuar como reservorios. En el pasado también se colocó a los niños que asisten a guarderías en el grupo de alto riesgo de contraer giardiasis, evidenciado por tres brotes pasados informados en Wisconsin,²⁶¹ con tasas de ataque del 47%, 17% y 37% respectivamente, y en el sur de Ontario, Canadá,²⁹⁴ donde casi el 10% de los niños entre los 2 y los 5 años de edad albergaban quistes de *Giardia lamblia*.

en 144 aspirados duodenales en pacientes con síntomas gastrointestinales inespecíficos. La conclusión a la que puede arribarse es que no se necesitan procedimientos extraordinarios para establecer el diagnóstico ante exámenes de heces negativos.

En casos en que la sospecha es alta pero no se ha establecido el diagnóstico, la prueba del hilo es una alternativa a los procedimientos de aspiración o biopsia duodenal.¹⁴⁸ El dispositivo consiste en una cápsula pesada que contiene gelatina y un hilo de sutura firmemente enrollado (disponible como "Enterotest" de Hedeco, Mountain View, CA). La cápsula se ingiere y el extremo del hilo se pega al lado de la mejilla. Después de casi 5 horas el hilo se retira y el material adherente se separa sobre la superficie de uno o más portaobjetos. Una pequeña cantidad de material puede mezclarse con una o dos gotas de solución fisio-

lógica; se aplica un cubreobjetos y la muestra se examina directamente para evaluar la presencia de las formas diagnósticas. Si el resultado de la preparación en fresco resulta equívoco, también puede prepararse un portaobjetos teñido en forma permanente.

García y cols.⁹³ informaron sensibilidad y especificidad del 100% en la detección de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras fecales, utilizando el sistema de inmunofluorescencia directa Merifluor (Meridian Diagnostics). Los quistes de las especies de *Giardia* aparecen como formas ovales con fluorescencia de color verde manzana, de 11-14 µm de diámetro; los ooquistes de *Cryptosporidium* miden 4-6 µm de diámetro y muestran una fluorescencia verde manzana brillante. Los autores citan la capacidad de revisar los frotis con poco aumento y de detectar formas en concentraciones bajas como las principales ventajas del sistema de fluorescencia directa. No es infrecuente encontrar protozoos por el procedimiento de fluorescencia que no se observan mediante el examen habitual de huevos y parásitos.

Detección de antígenos. La detección de antígenos en la superficie de los protozoos en muestras de heces es la prueba de elección actual para el diagnóstico de giardiasis y provee mayor sensibilidad que las técnicas microscópicas más comunes. Existen catorce productos comerciales (cuatro estudios de fluorescencia directa, once EIA y tres pruebas rápidas) en los Estados Unidos para el inmunodiagnóstico de giardiasis. La mayoría de los equipos de EIA pueden utilizarse sobre muestras de heces recién emitidas o congeladas y en las conservadas en formol, mertiolate-yodo-formaldehído (MIF) y acetato de sodio-ácido acético-formaldehído (SAF) como fijadores, pero no en PVA. La sensibilidad y la especificidad de estos equipos se aproximan al 100% cuando se comparan con la microscopia. Pueden utilizarse para la cuantificación de quistes y ooquistes y por lo tanto pueden ser útiles en estudios epidemiológicos y de control.

Se dispone de tres estudios inmunocromatográficos rápidos para la detección combinada de *Cryptosporidium* y *Giardia* o *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. Éstos ofrecen la ventaja del tiempo breve necesario para la realización de la prueba y la obtención de resultados múltiples en un solo dispositivo de reacción. Las evaluaciones iniciales indican sensibilidad y especificidad comparables con las de las pruebas ya existentes.

A comienzos de la década de 1990 el diagnóstico de giardiasis se establecía por el empleo de métodos inmunológicos para detectar directamente antígeno de *Giardia lamblia* en muestras fecales.¹⁵⁷ Los estudios inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA) que utilizan anticuerpos improntas contra una variedad de antígenos de *Giardia* constituyen la técnica utilizada con mayor frecuencia. Knisley y cols.,¹⁵⁷ con el empleo de antisueros de conejo y de cabra luego de la inmunización con trofozoítos de *Giardia*, informaron sensibilidades del 92% y el 87% y especificidades del 87% y el 91%, respectivamente. Carlson y cols.²⁹ comunicaron una correlación del 97% entre el enzimoimmunoanálisis y el examen microscópico directo en 353 muestras de seres humanos en los Estados Unidos. Stibbs,²⁵⁹ mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis con captura de antígeno con anticuerpos monoclonales para la detección de antígeno de *Giardia lamblia* en muestras de heces humanas también encontró una correlación del 97% con los exámenes microscópicos, incluso las muestras fijadas con formaldehído (la absorbancia realmente aumentó en 20 de 26 muestras positivas de *G. lamblia* probadas, ya sea fijadas con formaldehído o sin fijar).

Rostoff y cols.²³⁰ evaluaron un enzoinmunoanálisis comercial (ProSpecT/Giardia; Alexon, Mountain View, CA) que detecta antígeno específico 65 de *Giardia* (GAS 65). Las 93 muestras obtenidas en pacientes sintomáticos y muestras de heces positivas para O y P de giardias dieron resultados visuales y espectrofotométricos intensamente positivos. De las 232 muestras recolectadas al azar, 6 muestras O y P negativas dieron resultados por EIA positivos. La evidencia clínica de que estos seis pacientes en efecto tenían giardiasis era firme. Tomando en consideración estos resultados, la prueba de EIA mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100%. Scheffler y Van Etta²³⁹ también demostraron que la detección de antígeno es altamente sensible y específica cuando se realiza sobre muestras de heces conservadas con formaldehído. El equipo ProSpecT/Giardia tiene una sensibilidad del 95%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 99,5% y un valor predictivo negativo del 100% en relación con la microscopia convencional en el estudio de 223 muestras de heces conservadas con formaldehído.

OTROS FLAGELADOS INTESTINALES

***Chilomastix mesnili*.** *Chilomastix mesnili* es un flagelado de distribución cosmopolita, que se encuentra con mayor frecuencia en personas que viven en climas cálidos. Se lo considera no patógeno y no se requiere tratamiento cuando se encuentra en muestras fecales. Las infecciones se adquieren a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados con heces; las mejoras en la higiene personal y en los servicios sanitarios son fundamentales para reducir la incidencia de la infección.

Identificación por el laboratorio. La clave para la identificación de formas observadas en muestras fecales consiste en la detección de:

Trofozoítos

- Son piriformes, miden de 6 a 24 μm de longitud y 4 a 8 μm de ancho (lámina en color 22-3A).
- Tienen un núcleo grande y único ubicado inmediatamente por debajo de la membrana externa.
- Tienen un citostoma prominente adyacente al núcleo.
- Tienen tres flagelos anteriores inmediatamente adyacentes al núcleo, que a menudo son difíciles de visualizar, pero se observan mejor reduciendo la cantidad de luz del condensador y ajustando el foco.

Quistes

- Presentan forma de pera o de limón y su tamaño varía de 6 a 10 μm de largo por 4 a 6 μm de ancho (lámina en color 22-3B).
- Tienen un botón hialino característico en uno de los lados (lámina en color 22-3C).
- Tienen un núcleo único con un pequeño cariosoma central.
- De manera característica tienen un citostoma curvo, que aparece como un “bastón con un extremo en forma de gancho” que es diagnóstico cuando se observa.

***Dientamoeba fragilis*.** *Dientamoeba fragilis* se clasifica ahora como un flagelado,³⁰⁰ aun cuando los flagelos no se observan en el microscopio óptico. En la práctica, este protozoo puede aparecer como un trofozoito amebiano, más que como flagelado en las preparaciones microscópicas en fresco.

Dientamoeba fragilis causa un síndrome caracterizado por diarrea persistente, dolor abdominal, inapetencia y pérdida de peso, flatulencia y prurito anal.²⁸⁹ Los microbiólogos en los laboratorios clínicos deben conocer que *D. fragilis* se aísla en muestras de heces cada vez con mayor frecuencia; se ha informado en el 1,4% y el 19% de las muestras remitidas para examen de rutina y en hasta el 47% de poblaciones definidas, como en los internos en instituciones mentales.³⁰⁰ También se ha informado una alta prevalencia entre ciertos grupos de indígenas que residen en Arizona. En algunos ámbitos, la identificación de *D. fragilis* en muestras de heces es tan frecuente como *Giardia lamblia*; de hecho, en los laboratorios donde se identifica *G. lamblia* está indicado realizar una revisión de los métodos de recolección y diagnósticos para la exclusión de *D. fragilis*. Como el citoplasma es muy frágil, *Dientamoeba fragilis* puede ser difícil de identificar en las preparaciones en fresco y se requiere una preparación con tinción permanente para evaluar los detalles morfológicos.

Grendon y cols.¹¹⁰ advierten que la falta del empleo de las técnicas recomendadas para la fijación y la tinción permanente de las heces prácticamente impide la identificación de *D. fragilis*. Para aumentar la probabilidad, recomiendan con firmeza que todas las heces remitidas para el examen sean fijadas en alcohol polivinílico, acetato de sodio-ácido acético-formaldehído o en el fijador de Schaudinn y que todas las muestras, cualquiera que sea la consistencia, sean teñidas antes del examen microscópico. Chan y cols.³⁴ utilizaron de manera satisfactoria una prueba de inmunofluorescencia indirecta para mejorar la detección de *D. fragilis* en muestras conservadas de heces y sugirieron, además, que el desarrollo de técnicas de ELISA para antígenos de *D. fragilis* en muestras fecales podría mejorar su detección.

Identificación por el laboratorio. La identificación de *D. fragilis* se realiza en preparaciones fecales mediante la observación del trofozoito. No se ha identificado el estadio de quiste. Las características morfológicas diagnósticas son:

- El aspecto de una forma “ameboide” y asimétrica, que mide de 5 a 12 μm .
- La presencia de dos núcleos (lámina en color 22-3D). Alrededor del 20% de las formas presentan un núcleo único y puede ser difícil diferenciarlo de los trofozoítos de *Endolimax nana*. La observación de todo el frotis suele revelar las formas diagnósticas con núcleos dobles más características.
- Cariosomas prominentes que están fragmentados en cuatro a ocho gránulos (difícil de observar en la mayoría de las preparaciones teñidas).
- Seudópodos claros, con lóbulos relativamente amplios que determinan la movilidad cuando se observan en preparaciones en fresco.

Como *D. fragilis* no presenta un estado de quiste identificable, la transmisión directa de un huésped a otro por los alimentos y el agua es menos probable. La incidencia nueve veces mayor de *D. fragilis* en pacientes con infección por oxiuros sugiere que los huevos de *Enterobius vermicularis* pueden estar infectados por el flagelado y actúa como el principal vector para el contagio a los seres humanos. Esta posibilidad puede también explicar que casi el 50% de los casos informados de dientamebiasis ocurren en pacientes menores de 20 años. Los fármacos de elección en el tratamiento de los casos sintomáticos son la tetraciclina y el metronidazol.

Trichomonas hominis. *Trichomonas hominis* se ha encontrado en todo el mundo. Aunque aislado en muestras de heces diarreicas, no se considera patógeno. Puede ser algo más difícil identificarlo en forma definitiva en preparaciones teñidas porque los trofozoitos son frágiles y no se tiñen bien. No presenta estadio de quiste.

Identificación por el laboratorio. La identificación se realiza mediante la detección de los trofozoitos, que presentan las siguientes características:

- Miden de 7 a 15 μm de largo y de 4 a 7 μm de ancho, con una forma de lágrima y tienen un núcleo único situado en la parte anterior (que está levemente desplazado por la membrana externa, lo que ayuda a diferenciarlos de *Chilomastix mesnili*) (lámina en color 22-3E).
- Tienen una membrana ondulante que se extiende a todo lo largo del parásito (en teoría sirve como una característica útil para diferenciarlo de *Trichomonas vaginalis*, en el cual la membrana ondulante se extiende sólo en la mitad de distancia del cuerpo). En la práctica esto es discutible, ya que las membranas ondulantes no se observan en los frotis teñidos de manera habitual con las tinciones tricrómicas; en realidad se requieren preparaciones de cultivos anaerobios.
- En preparaciones en fresco, presentan una movilidad rotatoria, algo rígida, por la acción de un flagelo único ubicado a lo largo de la membrana ondulante que se extiende en la longitud completa del cuerpo del parásito, a diferencia de *Trichomonas vaginalis*, en que sólo se extiende en la mitad de su cuerpo.
- Las formas típicas observadas en muestras de heces con más probabilidad corresponden a *T. hominis*, aunque en las mujeres *T. vaginalis* puede observarse como contaminante de algunas preparaciones.

Ciliados: *Balantidium coli*

Balantidium coli es el único miembro de los ciliados que se sabe que infecta a los seres humanos. El modo de transmisión es por medio de la vía fecal-oral y no se requiere huésped intermediario para completar el ciclo vital, el cual se muestra en la figura 22-5.

Aunque *Balantidium coli* se encuentra sobre todo en los porcinos y con menor frecuencia en otros animales, tiene distribución mundial. La balantidiosis humana tiene una prevalencia mayor en los sitios de cría y matanza de cerdos.⁹⁵ Son infrecuentes los informes de infección, pero la mayoría provienen de América Latina, el Lejano Oriente y Nueva Guinea. La infestación en seres humanos no suele ser invasiva, es asintomática y autolimitada. En pacientes debilitados con una gran cantidad de trofozoitos, puede manifestarse disentería sangui-nolenta, deshidratación intensa o, en casos raros, la muerte. En la lámina en color 22-3F se observan varios trofozoitos de *B. coli* que invaden la submucosa del intestino. Esta microfotografía se preparó de un caso mortal de infección por *Balantidium*. En casos aislados de autopsias se observaron úlceras intestinales, linfadenitis mesentérica y raras veces extensión extraintestinal a hígado, pulmón y otros órganos.¹⁵⁶ La tetraciclina o, de manera alternativa, el diiodohidroxi-quina o el metronidazol, son los fármacos de elección en los casos de infecciones sintomáticas.

Identificación por el laboratorio. Suele ser fácil de reconocer *Balantidium coli* en muestras de heces por su gran tamaño (100 μm o más de diámetro). Las características diagnósticas adicionales son:

Trofozoito

- Una membrana externa cubierta en toda su circunferencia por cilios cortos y delicados.
- Un macronúcleo grande, con forma de riñón (más visible en preparaciones teñidas con yodo) (lámina en color 22-3G).
- Un micronúcleo pequeño y esférico adyacente al macronúcleo.
- Movilidad rotatoria, lenta, cuando se observa en preparaciones en fresco.

Quiste

- Forma esférica a elipsoidal, de 50 a 65 μm .
- Un macronúcleo único con forma de riñón, dentro del cual hay un micronúcleo pequeño y esférico (lámina en color 22-3H).
- En el citoplasma persisten vacuolas pequeñas.
- Los cilios están retraídos dentro de la pared gruesa y resistente del quiste.

COCCIDIOS

Coccidia, un subgrupo de protozoos dentro del subfilo *Sporozoa*, son parásitos tisulares estrictos con estadios sexuales y asexuales en sus ciclos vitales. A este grupo pertenecen los parásitos sanguíneos del paludismo, las especies de *Plasmodium*, los protozoos tisulares *Toxoplasma gondii* y los coccidios intestinales *Isospora belli*, especies de *Cryptosporidium*, especies de *Cyclospora* y especies de *Sarcocystis*.

El ciclo vital de la mayoría de los coccidios requiere un huésped intermediario externo, como gato, bovinos u otros animales, en los cuales se lleva a cabo la esporogénesis y la formación del ooquiste. El ciclo vital de *Isospora belli* difiere sólo en que ambos estadios de la gametogénesis, sexual y asexual, puede realizarse en el huésped humano sin necesidad de un segundo huésped. El ciclo vital de *Isospora belli*, como representativo de los coccidios, se muestra en la figura 22-6.

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Los criptosporidios son protozoos coccidios diminutos que se los ha conocido asociados con enterocolitis en diversos animales domésticos, como terneros, cerdos y pollos.⁸ Con la diseminación del SIDA en la década de 1980, la criptosporidiosis evolucionó como una enfermedad infecciosa emergente nueva.^{51,196} La detección de especies de *Cryptosporidium* o *Isospora belli* en pacientes en quienes no se sospechaba SIDA condujo a la comprobación de infección por el HIV. Los seres humanos se infectan ya sea por el contacto directo con animales infectados o por la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces. La transmisión por agua es muy problemática para las especies de *Cryptosporidium* porque los ooquistes no se eliminan por la cloración y puede persistir en suministros de agua después del tratamiento.²⁵² Dos brotes importantes de gastroenteritis y enfermedad diarreica se han informado en los últimos tiempos: uno en Milwaukee,¹² que afectó a 300 000 personas, el otro en Carroll County, Georgia,¹²⁴ con una estimación de 90 000 casos documentados de gastroenteritis aguda. El único factor de riesgo colectivo determinado en cada uno de estos brotes fue la exposición a un suministro de agua pública, filtrada y clorada según las normas de la *Environmental Protection Agency* (Oficina de Protección Ambiental) de los Estados Unidos.

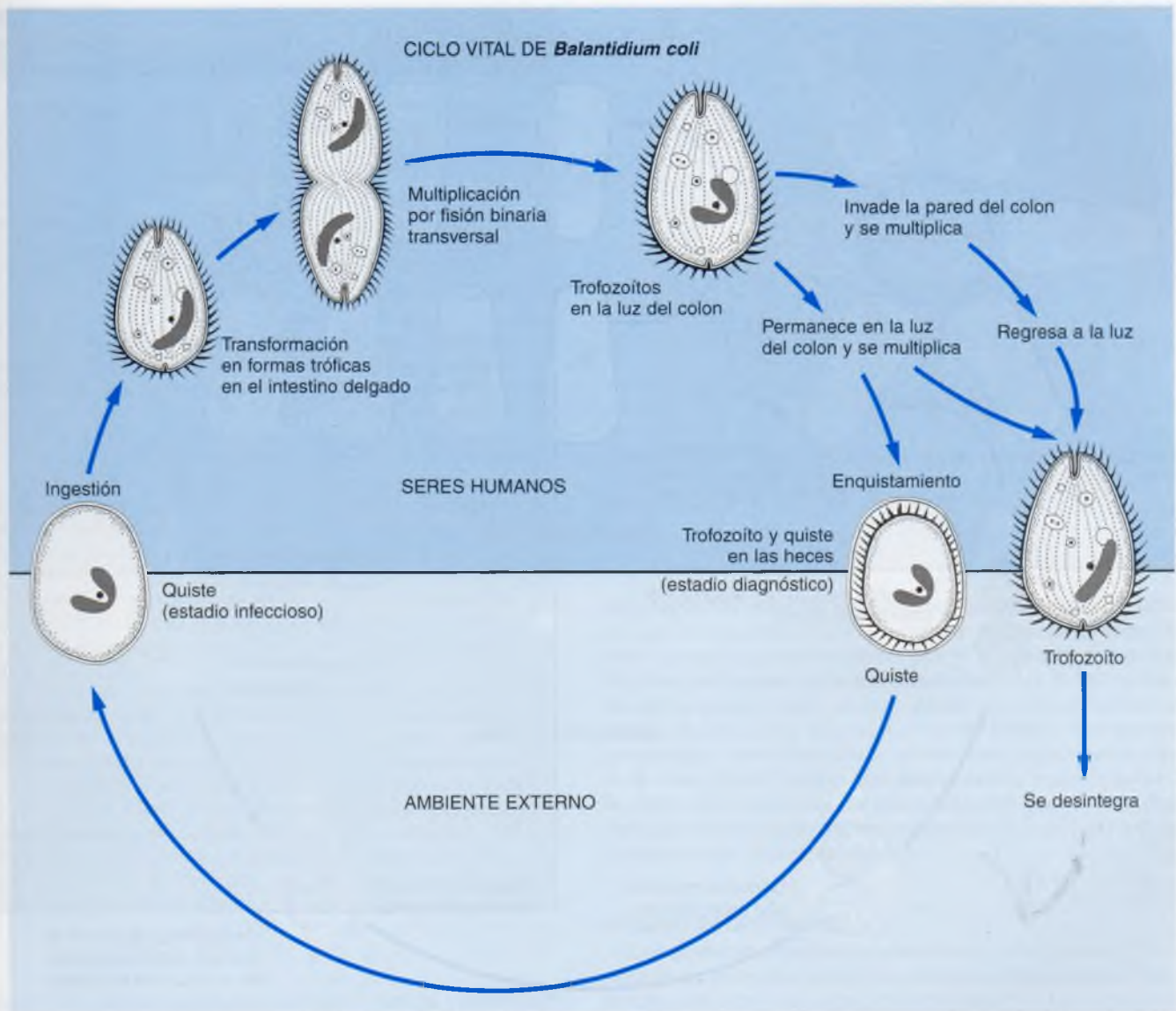


Figura 22-5 El ciclo vital de *Balantidium coli* es simple y no requiere huésped intermediario. Los huevos se eliminan por las heces al ambiente externo, maduran en el suelo en condiciones ideales y se tornan infectantes. Después de la ingestión de alimentos o agua contaminados con huevos, el protozoo se libera en el intestino delgado y luego se multiplica por fisión binaria; los trofozoitos pasan a la luz del colon donde residen. Con el enquistamiento, los quistes vuelven a eliminarse por las heces para completar el ciclo vital.

Durante todas las etapas del desarrollo el protozoo está limitado a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino. Por lo tanto, el diagnóstico puede realizarse en cortes del intestino delgado teñidos con hematoxilina y eosina (H-E) mediante la observación de ooquistes diminutos, a menudo en cantidades enormes, adheridos a la superficie de las células epiteliales que recubren las vellosidades (véase lámina en color 22-4A). Los ooquistes tienen una predisposición a adherirse al borde en cepillo de las células epiteliales con pérdida o degeneración de las microvellosidades en la zona de adherencia.¹⁹⁶ La pérdida de las microvellosidades puede causar deficiencias en la digestión, malabsorción y diarrea, que conforman el síndrome clínico. Las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-3.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico suele hacerse por la identificación de los ooquistes en muestras fecales. Presentan las siguientes características:

- Miden de 5 a 6 μm de diámetro, son ovoides a esféricos y aparecen muy refringentes cuando se observan en las preparaciones por flotación (fig. 22-7).
- En el interior pueden observarse pequeños gránulos o, con microscopía con contraste de fase, hasta cuatro esporozoítos finos con forma de lazo en cada ooquiste.^{51,196}
- Aparecen como ooquistes esféricos, teñidos de rojo, homogéneos, de 4 a 6 μm de diámetro, cuando se observan en preparaciones de heces teñidas para ácido-alcohol resistencia (lámina en color 22-4B).

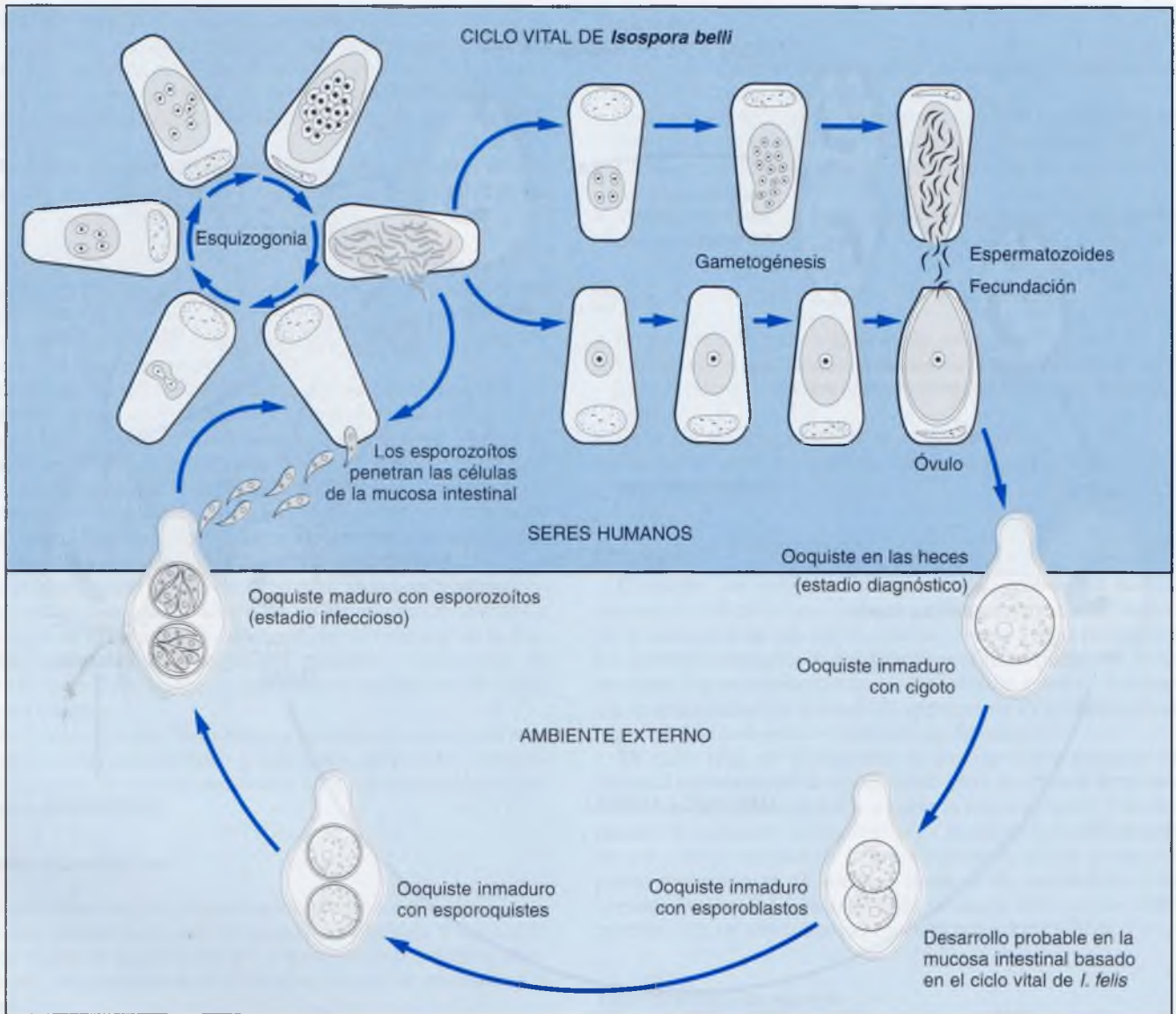


Figura 22-6 Ciclo vital de *Isospora belli*. Los ooquistes inmaduros que contienen un esporoquiste se eliminan al medio externo por las heces. En condiciones ambientales ideales, el ooquiste madura y desarrolla dos esporozoítos que actúan como formas infecciosas. Con la ingestión de los ooquistes infectantes en alimentos o agua contaminados por un huésped humano, se liberan los esporozoítos maduros de las células intestinales. En el proceso de gametogénesis se forman gametocitos masculinos y femeninos. Después de la fecundación del gametocito femenino por el masculino liberado del esporozoíto se forma un ooquiste de pared gruesa. La liberación de estos ooquistes inmaduros en el ambiente externo completa el ciclo vital.

Notas del laboratorio. En el caso de infecciones con gran cantidad de parásitos, las técnicas de concentración habituales para el aislamiento de huevos y parásitos en la mayoría de los laboratorios son adecuadas para los ooquistes de *Cryptosporidium*. En el caso de infecciones leves se recomienda el método de flotación con azúcar de Sheather y puede realizarse como lo describe Garza⁹⁸ (recuadro 22-4).

Es de uso habitual una técnica modificada de concentración con formol-acetato de etilo (FEA) para detectar ooquistes de criptosporidiosis en muestras de heces. Luego del procedimiento habitual de FEA, el sedimento aparece en capas y flota sobre una solución salina hipertónica para separar los parásitos de los detritos de las heces. Esta técnica mostró ser la mejora más sig-

nificativa en el aislamiento de ooquistes en muestras de heces sólidas y no grasas.

La tinción para ácido-alcohol resistencia modificada puede utilizarse para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en frotis secados al aire y fijados con metanol improntas directamente de una muestra fecal.⁹⁸ La tinción con carbolfucsina se aplica al frotis de la misma manera que la técnica habitual para ácido-alcohol resistencia; sin embargo, se utiliza H_2SO_4 al 1% como decolorante en lugar del alcohol-ácido. Los ooquistes aparecen rosados a rojos contra el fondo verde claro del colorante de contraste.

Para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras fecales existen varios equipos comerciales de inmunoanálisis.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-3 *Cryptosporidiosis*

El síndrome clínico de criptosporidiosis consiste en diarrea acuosa tipo cólera o mucosa, gastroenteritis persistente con grados variados de vómitos y cólicos abdominales, malabsorción y fiebre de baja intensidad. En los pacientes inmunocompetentes, el síndrome es autolimitado, con síntomas que disminuyen en 7 a 14 días. Sin embargo, la criptosporidiosis en los pacientes con SIDA es muy problemática por la prolongada y progresiva gravedad de la diarrea acuosa, que puede durar meses. En estos pacientes, el tratamiento debe ser enérgico, sobre todo si el recuento de linfocitos CD4 disminuye por debajo de 200 por milímetro cúbico.

Los ooquistes aparecen en las heces entre los 7 y los 28 días de la infección, con un período de incubación medio de 7,2 días. En un estudio de 84 niños con diarrea relacionada con *Cryptosporidium*, Stehr-Green y cols.²⁵⁶ encontraron que la eliminación de ooquistes varió de 8 a más de 50 días, sin relación entre la duración de la eliminación y la gravedad de la diarrea. Por otra parte, Shepherd y cols.²⁴⁴ en un estudio de 49 pacientes, encontraron que la mayoría dejaba de eliminar ooquistes por las heces alrededor de los 20 días, con síntomas relacionados con la eliminación en 25 de los 49 casos. Por lo tanto, la duración de la diarrea y el comienzo y el tiempo de eliminación de los ooquistes dependen de cada paciente.¹⁴⁷ En el pasado, los regímenes terapéuticos resultaban en gran parte poco satisfactorios en los pacientes con SIDA, debido tal vez a la vacuola parasitófora singular que se forma dentro de la célula huésped que protege al parásito de los fármacos antimicrobianos.¹¹¹

En la actualidad, el tratamiento con azitromicina,²⁸⁷ nitazoxanida,⁷² y paromomicina⁸¹ resultó ser promisorio en ensayos clínicos separados. El tratamiento ideal en pacientes infectados por criptosporidiosis y con SIDA también implica el restablecimiento de la función inmunitaria con la terapéutica antirretroviral altamente activa.⁴³ Navin y Juraneck¹⁹⁶ publicaron una excelente revisión clásica de los aspectos clínicos, epidemiológicos y parasitarios de la criptosporidiosis y, más recientemente, Whittner y cols.²⁸⁷ establecieron las relaciones en los pacientes con SIDA.

lisis. En un estudio comparativo reciente, García y Shimizu⁹⁴ encontraron una sensibilidad del 98-99% y una especificidad del 100% en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* utilizando los equipos de EIA ProSpecT (Alexon), y el Meridian Premier *Cryptosporidium* y el Meridian MERIFLUOR *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostics). Esto ratifica resultados similares a los publicados por Kehl y cols.,¹⁵⁰ quienes encontraron que el ensayo Vue *Cryptosporidium* (Seardyn, Indianápolis, EN), el ensayo de microtitulación ProSpecT *Cryptosporidium* y el equipo Merifluor *Cryptosporidium* mencionado antes eran igualmente sensibles y específicos para la detección de oosporas de *Cryptosporidium*, aunque en su experiencia, el procedimiento de inmunofluorescencia fue más fácil para leer y requería menos tiempo de tarea para el técnico.

La sensibilidad y la especificidad extremas de los diversos métodos de PCR para los ooquistes de *Cryptosporidium* determinan que sean bastante atractivos, en particular en el análisis del agua para consumo humano. Estos estudios de PCR pueden detectar hasta un ooquiste en una muestra, lo que los hace más sensibles que el análisis microscópico de los frotis teñidos para ácido-alcohol resistencia.^{88,189} Sin embargo, la sensibilidad de los métodos de PCR es reducida en las muestras conservadas con solución de formaldehído al 10% en buffer, en especial si los tiempos de fijación son prolongados. La sensibilidad tam-

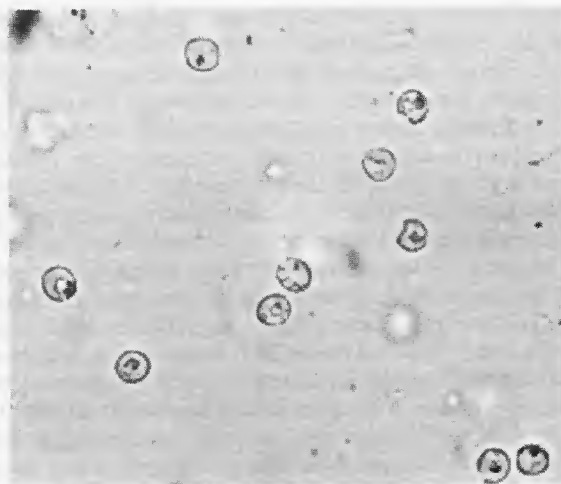


Figura 22-7 Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* como se observan en una preparación por flotación en muestras de heces (aumento original 1280x). (Cortesía de Bruce C. Anderson).

bién puede ser reducida en el examen de muestras congeladas, ya que los ooquistes pueden romperse durante la descongelación. La detección de ooquistes por PCR también puede estar afectada por numerosas sustancias encontradas en las muestras de heces, para lo cual se han ideado técnicas especiales de extracción de ácidos nucleicos.³⁰⁶ Estas técnicas son bastante complejas y están limitadas a laboratorios de referencia especializados. Clark⁴³ realizó una actualización reciente sobre la biología, el diagnóstico, los procedimientos para la identificación por el laboratorio (incluso inmunoanálisis y PCR) y el tratamiento de la criptosporidiosis.

CYCLOSPORA CAYETANENSIS

Los organismos incluidos actualmente en el género *Cyclospora* en un comienzo se los consideraba cianobacterias u organismos similares a las algas azul verdosas.^{166,204} Las especies de *Cyclospora* presentan características morfológicas semejantes

Recuadro 22-4 Técnica de flotación de Sheather para el aislamiento de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras fecales

1. Se hace una suspensión densa de heces en solución fisiológica y se filtra a través de una gasa en un tubo de centrifuga hasta la mitad de su volumen.
2. Agregar un volumen igual de solución de azúcar de Sheather (500 g de sacarosa, 320 mL de agua destilada y 615 g de fenol fundido) para que la superficie del líquido quede levemente por encima de la parte superior del tubo. Mezclar con suavidad con el palillo de un aplicador.
3. Colocar un cubreobjetos de 18 o de 22 mm² sobre la superficie de la suspensión y dejarlo durante 45 minutos.
4. Retirar con cuidado el cubreobjetos y colocarlo sobre un portaobjetos. Observar con microscopia de contraste de fase para evaluar los ooquistes esféricos de 5 µm de diámetro y muy refringentes (fig. 22-7).⁹⁶

a las especies de *Isospora* y *Cryptosporidium parvum*, salvo que tienen dos esporoquistes por ooquiste y dos esporozoítos por esporoquiste (*Isospora belli* tiene dos esporoquistes por ooquiste y cuatro esporozoítos por esporoquiste; las especies de *Cryptosporidium* tienen cuatro esporozoítos “desnudos” o no enquistados por ooquiste). La especie se denominó *Cyclospora cayetanensis* en honor de la Universidad Peruana Cayetano Heredia de Lima, Perú, la institución donde se realizó gran parte de la investigación epidemiológica y taxonómica original.

En muestras de heces no concentradas y sin teñir, los ooquistes de las especies de *Cyclospora* no presentan refringencia, son esféricos u ovals, con cuerpos algo rugosos, miden 8 a 10 µm de diámetro (casi el doble del tamaño de los ooquistes de las especies de *Cryptosporidium*), con una agrupación interna de glóbulos unidos a la membrana.¹⁷ Son ácido-alcohol resistentes y se tiñen de color rosa pálido o rosa rojizo con estructuras internas más oscuras (lámina en color 22-4C). Es posible que las células más viejas no se tiñan. Los ooquistes se tiñen de rojo anaranjado con safranina; no se tiñen con hematoxilina férrica, metenamina argéntica de Grocott-Gomori, yodo ni ácido peryódico de Schiff (PAS).¹⁶⁶ Los ooquistes tienen fluorescencia propia verde intensa (filtro de excitación de 450-490 DM) o azul intenso (filtro de excitación de 365 DM) con epifluorescencia. Los directores y supervisores de los laboratorios de microbiología deben decidir si las muestras de heces serán examinadas de manera habitual para la presencia de *Cryptosporidium* y *Cyclospora*. En los ámbitos donde se reciben muestras de heces de muchos pacientes con SIDA, se recomienda realizar de rutina preparaciones teñidas para ácido-alcohol resistencia de los frotis fecales.

El ciclo vital, aunque no comprendido en su totalidad, se considera similar al de las especies de *Cryptosporidium*. Los esporozoítos se exquistan a partir de los ooquistes en el tubo digestivo enseguida después de su ingestión por alimentos o agua contaminados e ingresan en las células epiteliales del intestino delgado. Se desconoce el mecanismo que causa la diarrea; la endoscopia revela eritema moderado a intenso de la porción distal del duodeno. Las biopsias de duodeno y yeyuno revelan vellosidades yeyunales romas, atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas de grado variable. La ausencia de leucocitos y eritrocitos fecales indica que el proceso no es invasivo; la alteración de la absorción de la D-xilosa implica un síndrome típico de malabsorción.

La enfermedad suele seguir a la ingestión de agua y es más frecuente en los meses templados del verano. También se ha implicado la leche en polvo diluida con agua antes de su consumo.²⁹⁷ En un brote en el Cook County Hospital de Chicago, la diarrea afectó al personal médico y a los empleados en una habitación luego de fallar la bomba de agua del lugar.²⁹⁶ La enfermedad relacionada con *Cyclospora* suele manifestarse como “diarrea del viajero”, con varias citas en la bibliografía de diarrea en viajeros que regresan de Haití, México, Guatemala, Puerto Rico, Marruecos, Camboya, Pakistán, India, las islas Salomón y en particular Nepal.^{136,218} Específicamente, los brotes en los Estados Unidos y Canadá durante los meses de la primavera de 1996 y 1997 se relacionaron con la ingestión de frambuesa importada de Guatemala.¹²⁸

El período de incubación es de 2 a 7 días. El comienzo de la diarrea puede ser abrupto (68% de los casos) o gradual (32%).²⁴⁰ La diarrea acuosa, que es autolimitada en los pacientes inmunocompetentes (rara vez tiene una duración mayor de 12 días), puede acompañarse por náuseas, cólicos abdominales, fatiga y malestar general. En los pacientes inmunosuprimidos, en especial en los pacientes con SIDA, que con frecuencia están infec-

tados, la diarrea puede prolongarse y durar de 4 a 6 semanas; puede simular al esprue tropical y asociarse con enfermedad biliar. En 450 pacientes con SIDA, Pappe y cols.²⁰⁴ encontraron especies de *Cryptosporidium* en las muestras de heces de 135 (30%), *Isospora belli* en el 12%, *Cyclospora* en el 11%, *Giardia lamblia* en el 3% y *Entamoeba histolytica* en el 1%.

La farmacoterapia específica tiene eficacia limitada. La asociación de trimetoprim y sulfametoxazol administrada por vía oral resultó eficaz en el tratamiento de algunos casos; en otros se utilizaron metronidazol, norfloxacin, quinacrina, ácido nalidixico y furoato de diloxanida con éxito variable.²⁰⁴ En los pacientes con SIDA, el tratamiento suele estar limitado a medidas de apoyo con hidratación y suplementos nutricionales, aunque Pappe y cols.²⁰⁴ establecieron que trimetoprim-sulfametoxazol resultó eficaz en algunos casos, en especial cuando se indicaron dosis mayores. En un estudio realizado en Nepal, la eliminación de ooquistes y la desaparición de los síntomas sucedieron después de 7 días de tratamiento.¹³⁶

ISOSPORA BELLI

La isosporiasis, una enfermedad caracterizada por diarrea y malabsorción, antes sólo se la encontraba en raras oportunidades y se la consideraba de importancia clínica limitada. En algunos casos puede experimentarse una enfermedad grave, en la cual se observan concentraciones elevadas de protozoos en el intestino. En casos prolongados puede haber fiebre, cefalea, esteatorrea y pérdida de peso; en infecciones abrumadoras se informaron muertes debidas a pérdidas de agua y al desequilibrio electrolítico. La enfermedad puede persistir durante meses, en particular en los pacientes con SIDA, en que se aísla *Isospora belli* con frecuencia creciente como una de las causas del síndrome diarreico. García⁹⁶ informó varios casos de enfermedad intestinal y extraintestinal debilitantes en pacientes coinfectados con SIDA e *Isospora belli*, y concluyó con la recomendación de que los médicos consideren este parásito en los pacientes con SIDA que han inmigrado o viajado a América Latina o que son hispanicos nacidos en los Estados Unidos, sobre todo si también son adultos jóvenes. Además, se recomienda que los pacientes con SIDA que viajan a América Latina y otros países en vías de desarrollo sean advertidos de la transmisión por agua y alimentos de *I. belli* y se considere la posibilidad de la farmacoprofilaxis. El fármaco de elección es trimetoprim-sulfametoxazol; la pirimetamina es una alternativa.

Las infecciones humanas por *I. belli* difieren de las de otros coccidios en que las formas sexual y asexual habitan en el intestino humano y no se requiere un segundo huésped para completar el ciclo vital. La transmisión interhumana ocurre después de la ingestión de los ooquistes infectantes en los alimentos o el agua contaminados por heces; por esto, la enfermedad no es una zoonosis. Los ooquistes son las formas diagnósticas observadas en las muestras fecales humanas; miden de 25 a 30 µm de diámetro, con una pared lisa y delgada y son inmóviles. Los ooquistes inmaduros contienen un esporoquiste único (lámina en color 22-4E); lo más típico en muestras fecales es la observación de ooquistes maduros que contienen dos esporoquistes (lámina en color 22-4F).

ESPECIES DE SARCOCYSTIS

Las especies de *Sarcocystis* utilizan dos mamíferos para las fases sexual y asexual de sus ciclos vitales. Los seres humanos pueden actuar como huésped intermediario o definitivo. Como huésped definitivo, las personas se infectan por la ingestión de

carne de vaca o de cerdo cocida de manera deficiente; el ciclo sexual del organismo se realiza en la porción subepitelial de la mucosa del intestino delgado. Las infecciones intestinales se asocian con *S. hominis* o *S. suis* (antes *Isospora hominis*) y a menudo son asintomáticas, pero en ocasiones causa un síndrome diarreico similar al producido por *Isospora belli*. Las formas diagnósticas en muestras de heces son ooquistes ovales que miden entre 10 y 20 μm . Contienen dos esporoquistes, con un aspecto similar a los de *I. belli*. También pueden observarse esporoquistes únicos de 13 a 17 μm .

Como huésped intermediario, que sucede cuando los seres humanos ingieren de modo inadvertido ooquistes provenientes de otras fuentes animales contaminadas con heces, se desarrollan sarcoquistes en la musculatura esquelética y pueden verse en biopsias de músculo esquelético, o se han observado en músculo esquelético en autopsias,¹⁵ donde se visualizan estos sarcoquistes con un tamaño de 100 $\times$ 300 μm (lámina en color 22-4G). Esta forma suele ser asintomática, aunque en casos raros se informaron polimiositis y eosinofilia. Más recientemente, Arness y cols.¹⁰ comunicaron un brote de miositis eosinófila aguda entre 15 hombres de un equipo militar estadounidense que trabajaban en las zonas rurales de Malasia. En siete soldados se observaron grados variables de fiebre, mialgias, broncoespasmos, erupciones pruriginosas fugaces, linfadenopatía transitoria y nódulos subcutáneos; todos estos síntomas son comunes para sarcocistosis. Las alteraciones del laboratorio incluían eosinofilia, aumento de la velocidad de eritrosedimentación y concentraciones elevadas de creatinina en el músculo. Las especies de *Sarcocystis* se aislaron en una muestra de biopsia de músculo esquelético obtenida del caso inicial. Los síntomas persistieron en algunos soldados durante 5 años. En estos casos prolongados se observó en la histología miositis crónica, fasciculitis y mionecrosis con calcificación.

Filo *Microsporium*: especies de *Microsporidium*

Los microsporidios son parásitos intracelulares estrictos lo suficientemente particulares para ser clasificados en un filo separado: *Microspora*.¹⁶³ La característica singular de los miembros de este filo es la producción de esporas que contienen un mecanismo de extrusión tubular complejo por el cual el material infeccioso, "esporoplasma", se inyecta en las células huésped. Esto sucede después de la ingestión por el huésped, estimulado por cambios en el pH y en la concentración iónica del contenido intestinal. El túbulo enrollado se evierte y penetra en la célula huésped.

Alrededor de 80 géneros y más de 700 especies se incluyen en este grupo "comodín", que en conjunto se denomina *Microsporidium* y que afecta sobre todo a huéspedes no humanos de importancia comercial, como insectos, peces, roedores de laboratorio, conejos, animales para uso en peletería y primates.²³ Son eucariontes verdaderos (quizá se originan como una rama temprana de los eucariontes), con núcleo, membrana nuclear y una serie de membranas intracitoplasmáticas. Dentro del filo hay varios géneros, de los cuales sólo cuatro causan enfermedad en los seres humanos: *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora* y *Enterocytozoon*. Un quinto género recién denominado *Septata* se encontró que está estrechamente relacionado con *Enterocytozoon* y ya no pertenece a la categoría de un género separado. La diferenciación de especies es casi imposible mediante la microscopia óptica.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de microsporidiosis puede realizarse por la identificación de las esporas de los microsporidios en cortes histológicos incluidos en parafina.

Aunque pueden observarse en cortes teñidos con H-E, se visualizan mejor en cortes teñidos con PAS, sales argénticas (GMS), ácido-alcohol resistencia o Giemsa. Las esporas aparecen dentro de los enterocitos intestinales, ubicados de modo característico entre el núcleo de la célula y la luz del intestino. En las preparaciones teñidas con PAS, puede observarse un gránulo PAS positivo en el extremo anterior de cada espora. Aparecen como puntos oscuros cuando se tiñen con Giemsa. En el trabajo de García se encuentran varias microfotografías que muestran estas esporas.⁹⁶

La microscopia electrónica sigue siendo el método de referencia. La identificación de las esporas con un tubo polar es característica de todos los géneros. Los miembros del género *Encephalitozoon* están encerrados en una vesícula limitante, similar a un fagosoma, producida por el huésped. Las especies de *Enterocytozoon* y de *Nosema* se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped sin una vesícula limitante; las especies de *Nosema* se diferencian porque tienen núcleos pareados colindantes.²³

El diagnóstico de laboratorio se realiza con mayor frecuencia en la sección de parasitología clínica mediante la demostración de esporas en preparaciones teñidas de muestras fecales. Presentan las siguientes características:

- Las esporas son diminutas y miden de 1,5-2,5 $\times$ 2,5-4 μm .
- Presentan una forma oval o cilíndrica, con paredes gruesas que determinan la resistencia a las condiciones ambientales y son difíciles de teñir.
- Una banda transversal y rosa en la mitad de la célula es la característica distintiva para la identificación (lámina en color 22-4H).
- Las esporas se tiñen de manera deficiente con H-E, pero pueden visualizarse mejor con técnicas de Gram, ácido-alcohol resistencia, PAS, Giemsa y una tinción tricrómica modificada.
- Son grampositivas y ácido-alcohol resistentes; en las tinciones con PAS se observa un gránulo anterior PAS-positivo.
- La tinción ideada por Weber y cols.²⁷⁹ puede ser muy recomendada para la detección de las esporas de los microsporidios en aspirados duodenales y en heces (recuadro 22-5).

DeGirolami y cols.⁶⁰ hallaron que la tinción tricrómica modificada de Weber y las tinciones fluorocrómicas Uvitex 2B mostraron una sensibilidad igual y elevada cuando se compararon con las biopsias duodenales para la detección de esporas de microsporidios en frotis de material de biopsia de aspirados duodenales provenientes de 43 pacientes. Ryan y cols.²³² describieron una tinción modificada en la cual se disminuye la concentración de ácido fosfotúngstico a 0,25 g/dL y se utiliza azul de anilina en lugar de verde rápido (*fast green*) como colorante de contraste. Cada procedimiento de tinción requiere 90 minutos y la selección entre la tinción de Weber y de Ryan depende de la preferencia personal. Kokoskin y cols.¹⁵⁸ encontraron que la realización de la tinción a la temperatura de 50 °C y la disminución del tiempo a 10 minutos produjeron una tinción más profunda y más fácil de interpretar. Como las esporas de microsporidios son muy pequeñas y pueden semejarse a células bacterianas o de levaduras muy pequeñas, siempre es necesario realizar un control positivo cuando se efectúa cualquiera de estas tinciones.

Aunque todas las especies de microsporidios pueden causar infecciones diseminadas y pueden encontrarse en diversos órganos, como hígado, riñón y cerebro, *Enterocytozoon bienstei* es la especie que tiende a infectar de modo preferencial a

Recuadro 22-5 Tinción de Weber para la detección de esporas de microsporidios en heces y aspirados duodenales²⁸⁰

1. Preparar los portaobjetos para el examen por microscopía óptica de heces tomando una alícuota de 10 µL de heces líquidas sin concentrar, con formaldehído al 10% (relación 12:3), esparcida finamente en un área de 45 × 25 mm.
2. Fijar los frotis en metanol durante 5 minutos.
3. Teñir durante 90 minutos con la tinción cromotrópica de Weber.
Para preparar el colorante, mezclar:

Cromótopo 2R (Harleco, Gibbstown, NJ)	6,00 g
Colorante (Allied Chemical & Dye, New York)	0,15 g
Ácido fosfotúngstico	0,70 g

 Permitir que estos ingredientes reposen ("maduren") durante 30 minutos en 3 mL de ácido acético glacial. Luego mezclar con 100 mL de agua destilada.
4. Después de la tinción, enjuagar el portaobjetos con ácido alcohol (4,5 mL de ácido acético y 995,5 mL de alcohol etílico al 90%) durante 10 segundos y enjuagar brevemente con alcohol al 95%.
5. Deshidratar en forma sucesiva los frotis en alcohol al 95% durante 5 minutos alcohol al 100% durante 10 minutos Hemo-De (sustituto de xileno, Fisher Scientific) durante 10 minutos.
6. Examinar 100 campos con objetivo de inmersión por cada portaobjetos, durante alrededor de 10 minutos. Buscar las pequeñas esporas cilíndricas de 1-4 µm, que se tiñen de rosa a rojo brillante.

los enterocitos en la mucosa del intestino delgado, en especial en los pacientes con SIDA.⁸⁵ Sin embargo, varios informes de casos, según la revisión de Pol y cols.,²¹⁶ indican que *E. bienewsi* puede colonizar el epitelio del conducto biliar que conduce a la colangitis. La prevalencia estimada de la infección intestinal por microsporidios en pacientes con SIDA suele ser del 12%,¹⁵⁸ o incluso mayor si se utilizan técnicas especiales, como citocentrifugación, detección con anticuerpos fluorescentes y serología. *Encephalitozoon cuniculi* se asocia con mayor frecuencia con la infección diseminada, con predilección para infectar el cerebro y los riñones. *Nosema corneum* se encontró en varios casos de queratoconjuntivitis;³² sin embargo, *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* también se aislaron en la córnea y la conjuntiva en pacientes con SIDA y queratoconjuntivitis.⁶⁷ La conjuntivitis, la escleritis, la sensación de cuerpo extraño y la visión borrosa son síntomas de presentación comunes.

El personal con experiencia puede identificar las esporas intracitoplasmáticas diminutas (2 µm de diámetro) características en cortes de tejido teñidos en biopsias intestinales. Las esporas se demuestran mejor mediante las tinciones de Gram modificadas por Brown-Brenn o Brown-Hopps para tejidos o de improntas teñidas con Giemsa. Los protozoos también pueden observarse en cortes semidelgados incluidos en plástico teñidos con azul de metileno-azul II con fucsina básica o azul de toluidina como colorantes de contraste.²³ Cuando se utilizan estas tinciones siempre deben prepararse en paralelo portaobjetos como control positivo. Las esporas también se han demostrado en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la orina por microscopía óptica de fluorescencia. Cuando el personal del laboratorio comienza a utilizar las diversas técnicas descritas y se familiariza con la morfología de las especies de

Microsporidium en la microscopía óptica, la prevalencia de las infecciones aumenta en forma evidente y la probabilidad de subdiagnóstico es menor.

Aldras y cols.⁵ demostraron la superioridad de la detección de esporas de microsporidios en las heces de pacientes con SIDA en tinciones de inmunofluorescencia indirecta, mediante el empleo de antisueros policlonales contra *E. cuniculi* y *E. hellem* y anticuerpos monoclonales contra *E. hellem*.

En los laboratorios de investigación existen varias técnicas para la detección no microscópica de esporas de microsporidios en la espera del momento en que pueda simplificarse el diagnóstico de laboratorio. Zierdt y cols.³⁰⁸ utilizaron diversos antisueros policlonales de ratón y de conejo contra las esporas de *E. cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* en una prueba indirecta con anticuerpos fluorescentes para identificar de modo satisfactorio esporas de microsporidios en 11 de 12 muestras fecales, además de utilizarlos en la detección de antígeno en líquidos de colon y duodenal y en preparaciones de biopsia por impronta de duodeno. Franzen y cols.⁸⁵ utilizaron con éxito amplificación del DNA de microsporidios por PCR en seis muestras de biopsia duodenal que se sabía que eran positivas para detectar el fragmento específico de 353 pares de bases de DNA de *Enterocytozoon bienewsi*. Los autores sugirieron que la PCR puede ser un enfoque útil para diagnosticar microsporidiosis en pacientes infectados por el HIV. De hecho, los CDC consideran que el diagnóstico molecular con cebadores para PCR específicos de especie es el método de referencia para la identificación de especies de microsporidios.⁵⁴ Se ha encontrado que los métodos de PCR utilizados en los laboratorios de los CDC no amplifican en forma cruzada con otras 20 especies no patógenas de *Microsporidium*.

El tratamiento eficaz para la microsporidiosis es limitado. El tratamiento de las infecciones intestinales debidas a *Enterocytozoon bienewsi* con pirimetamina, metronidazol o trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) puede obtener buenos resultados. De Groote y cols.⁶¹ informaron el tratamiento exitoso de un paciente con SIDA con albendazol, un caso en el cual la PCR se utilizó para proporcionar el diagnóstico precoz. Para una revisión global de las infecciones humanas por microsporidios, que incluye 250 referencias, véase Weber y cols.,²⁸⁰ quienes introducen varias técnicas diagnósticas nuevas que "facilitarán estudios futuros sobre incidencia, factores de riesgo, orígenes de la infección, modos de transmisión, manifestaciones clínicas, patogenia y tratamiento de este patógeno emergente".

Nematodos

Los nematodos son helmintos cilíndricos; los adultos se caracterizan por un cuerpo algo aguzado, con músculos orientados en sentido longitudinal y un esófago triradiado. Las especies de nematodos intestinales que con mayor frecuencia infectan a los seres humanos son:

Ascaris lumbricoides

Trichuris trichiura

Uncinarias:

Necator americanus

Ancylostoma duodenale

Strongyloides stercoralis

Enterobius vermicularis

Capillaria philippinensis

Especies de *Trichostrongylus*

Se estima que alrededor de 3,2 mil millones de personas están infectadas por nematodos intestinales en el mundo.^{25,35} La magnitud de estas cifras refleja la morbilidad considerable secundaria a los efectos de estos parásitos y la elevada probabilidad de que los laboratorios clínicos detecten una o más de estas formas parasitarias en los exámenes habituales de muestras de heces.

En este grupo de helmintos los ciclos vitales varían en complejidad y modos de infección. Estos nematodos no tienen huésped intermediario, como se muestra en la figura 22-8; sin embargo, la mayoría requiere una fase fuera del huésped huma-

no para que los huevos evolucionen a una forma infecciosa. El huevo es un gameto maduro producido por las hembras adultas que residen en el intestino y es expulsado por las heces. Éste es el estadio de reposo, que sirve como forma diagnóstica, infecciosa o ambas. Los huevos de la mayoría de las especies de nematodos requieren etapas intermediarias de desarrollo en el ambiente externo en una forma larvaria y a menudo infecciosa, de acuerdo con la temperatura, la humedad y la naturaleza del suelo en el cual se eliminan. En este capítulo se incluyen esquemas de los ciclos vitales con notas explicativas para varias de las especies de nematodos.

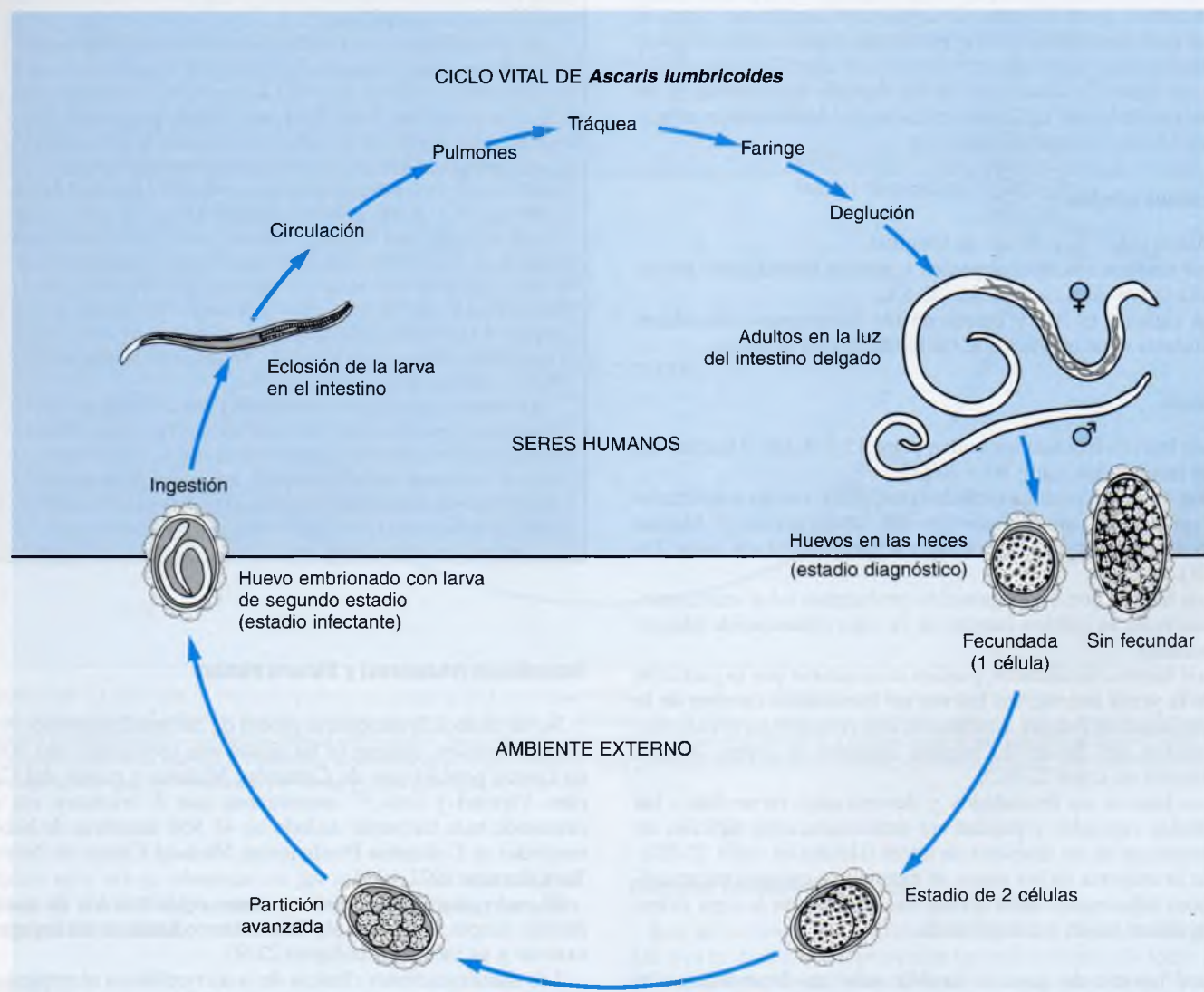


Figura 22-8 Ciclo vital de *Ascaris lumbricoides*. El ciclo vital no involucra un huésped intermediario externo. Es algo complejo y requiere un período para la maduración del huevo en el ambiente externo y una fase migratoria larvaria transpulmonar en los seres humanos que pueden causar síntomas asmáticos transitorios en las infecciones con gran cantidad de parásitos. Los huevos fecundados que son eliminados por las heces al suelo requieren 2 a 3 semanas en condiciones ideales de humedad y temperatura para evolucionar desde el estadio inicial de dos células a la partición avanzada y el estadio embrionado final e infectante. Cuando un huésped humano ingiere alimentos o agua contaminados con huevos infectantes, en el intestino emergen las formas larvarias e ingresan en la circulación. Después de su pasaje a través de los capilares pulmonares, las larvas pasan a los alvéolos pulmonares y con la tos ascienden y son digeridas. En el intestino maduran en parásitos adultos machos o hembras, donde permanecen limitados a la luz o migran hacia diversos conductos u orificios. Las hembras grávidas depositan una gran cantidad de huevos que son eliminados por las heces para completar el ciclo vital.

Ascariasis y *Ascaris lumbricoides*

Se estima que *Ascaris lumbricoides* afecta a cerca del 25%, o mil millones, de la población mundial.²⁵ La prevalencia máxima se observa en personas desnutridas que residen en países en vías de desarrollo. Las regiones con tratamientos modernos de agua y desechos cloacales tienen una incidencia baja de la enfermedad. En la figura 22-8 se esquematiza el ciclo vital de *Ascaris lumbricoides*, representativo de los nematodos como grupo.

Las manifestaciones clínicas de la ascariasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-4.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de la ascariasis se efectúa mediante la observación de los parásitos adultos cuando salen por los orificios del cuerpo, in situ en el intestino, o en sistemas de conductos contiguos, como el biliar o el pancreático (como puede observarse en la cirugía o en la autopsia). Con mayor frecuencia, la identificación se realiza mediante la detección de los huevos característicos en muestras de heces. Las características de identificación principales de *Ascaris lumbricoides* son:

Parásitos adultos

- Miden entre 15 y 35 cm de longitud.
- Los machos son más pequeños y pueden identificarse por su cola curva (lámina en color 22-5A).
- La cutícula es lisa y carece de las estriaciones musculares anulares características de las lombrices de la tierra.

Huevos

- Los huevos fecundados miden entre 45 y 60 μm y los huevos no fecundados, entre 90 $\times$ 40 μm .
- Son amarillo castaño (teñidos con bilis), ovales o esféricos y presentan una cáscara gruesa, transparente y hialina recubierta por una capa albuminoide (lámina en color 22-5B).
- Los huevos con una exposición prolongada a las secreciones pancreáticas pueden carecer de la capa albuminoide (decorificados).
- Los huevos fecundados pueden reconocerse por la partición de la yema interna; los huevos no fecundados carecen de la organización interna. Los huevos embrionados en los últimos estadios del desarrollo pueden contener la forma larvaria (lámina en color 22-5C).
- Los huevos no fecundados y decorificados recuerdan a las células vegetales y pueden ser extremadamente difíciles de reconocer en las muestras de heces (lámina en color 22-5D). En la mayoría de los casos, el examen de campos microscópicos adicionales suele revelar los huevos con la capa externa albuminoide y mamelonada.

Los huevos de *Ascaris lumbricoides* no fecundados son demasiado pesados para flotar en el procedimiento de flotación con sulfato de cinc y suelen pasarse por alto si no se examina también el sedimento. La presencia de huevos no fecundados sólo en las muestras de heces puede indicar infección con un único parásito hembra. Una hembra adulta de *Ascaris lumbricoides* produce cerca de 200 000 huevos por día; por consiguiente, la cuantificación de huevos en muestras fecales mediante el recuento de huevos, un procedimiento valioso para evaluar la magnitud de las infecciones por uncinarias, no siempre refleja la cantidad de parásitos.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-4 Ascariasis

Los pacientes con infecciones leves pueden ser asintomáticos. En las infecciones intestinales con gran cantidad de parásitos, los síntomas frecuentes son dolor abdominal, malestar y diarrea. En contraposición con las uncinarias, en las que el requisito previo para la presencia de enfermedad es la abundante cantidad de parásitos, la infestación intestinal humana por *A. lumbricoides* puede ser importante sólo con un gusano, debido a su gran tamaño. Los parásitos adultos tienen la propensión de migrar y deambular en el interior de los conductos biliares, el conducto pancreático o la luz del apéndice o, en raras oportunidades, penetran el intestino. Maddern y cols.¹⁴ informaron un caso mortal de pancreatitis en el cual un único *Ascaris lumbricoides* se encontraba impactado dentro de la ampolla de Vater. La apendicitis, la pancreatitis, la obstrucción biliar y la formación de absceso hepático son posibles complicaciones, incluso en las infecciones leves.¹¹⁸

Esta propensión de *Ascaris* de deambular desde la luz del intestino, en particular durante el tratamiento con fármacos, es una de las razones por las cuales los ciclos inadecuados o incompletos de tratamiento pueden ser muy peligrosos. En las infecciones intensas, los parásitos adultos pueden salir del recto o ser expectorados. La obstrucción intestinal, la intususcepción, el vólvulo o la perforación intestinal son posibles complicaciones de la infección intensa. La obstrucción intestinal sucede en alrededor de 2 de cada 1 000 individuos infectados; causa una mortalidad de 6 por cada 100 000 niños.²⁶⁴ Baird y cols.¹³ publicaron un caso mortal de ascariasis en una niña sudafricana de raza negra de 2 años en la que se eliminó en la autopsia un conglomerado de 796 *Ascaris lumbricoides* que pesaba 550 g. La causa de la muerte fue la torsión y la gangrena del íleon por la gran cantidad de parásitos. También se hallaron parásitos en el estómago, el esófago, los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, y la vesícula biliar.

El tratamiento se realiza con mebendazol (Vermox®), que se administra como comprimidos masticables de 100 mg. Los efectos colaterales incluyen dolor abdominal y diarrea, en especial si la infección es intensa y se eliminan muchos gusanos. El empleo de este fármaco está contraindicado durante el embarazo. Hay pocos indicios sobre la utilidad de los fármacos durante el estadio de migración de las larvas.⁹⁶

Tricocefalosis (trichuriasis) y *Trichuris trichiura*

No se conoce la incidencia global de las infecciones por *Trichuris trichiura*, aunque se ha citado una prevalencia del 90% en ciertas poblaciones de Camerún, Malasia y países del Caribe. Vermud y cols.,²⁷² encontraron que *T. trichiura* era el nematodo más frecuente aislado en 41 958 muestras de heces remitidas al Columbia-Presbyterian Medical Center en Nueva York durante 1971-1984.

El ciclo vital de *Trichuris trichiura* sigue una vía de transmisión simple fecal-oral sin fase intermediaria en un huésped externo y se ilustra en la figura 22-9.

Las manifestaciones clínicas de la tricocefalosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-5.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de la tricocefalosis suele realizarse mediante la observación de los huevos con forma de barril característicos en muestras fecales. Los adultos miden de 30 a 50 mm de longitud; en promedio, los machos son algo más pequeños. Éstos pueden reconocerse por su extremidad caudal larga y delgada que forma una espiral de 360°, de la cual proviene la denominación informal de “lombriz látigo”. En las infecciones intestinales, la cabeza está clavada en la mucosa del intestino grueso; por consiguiente, los

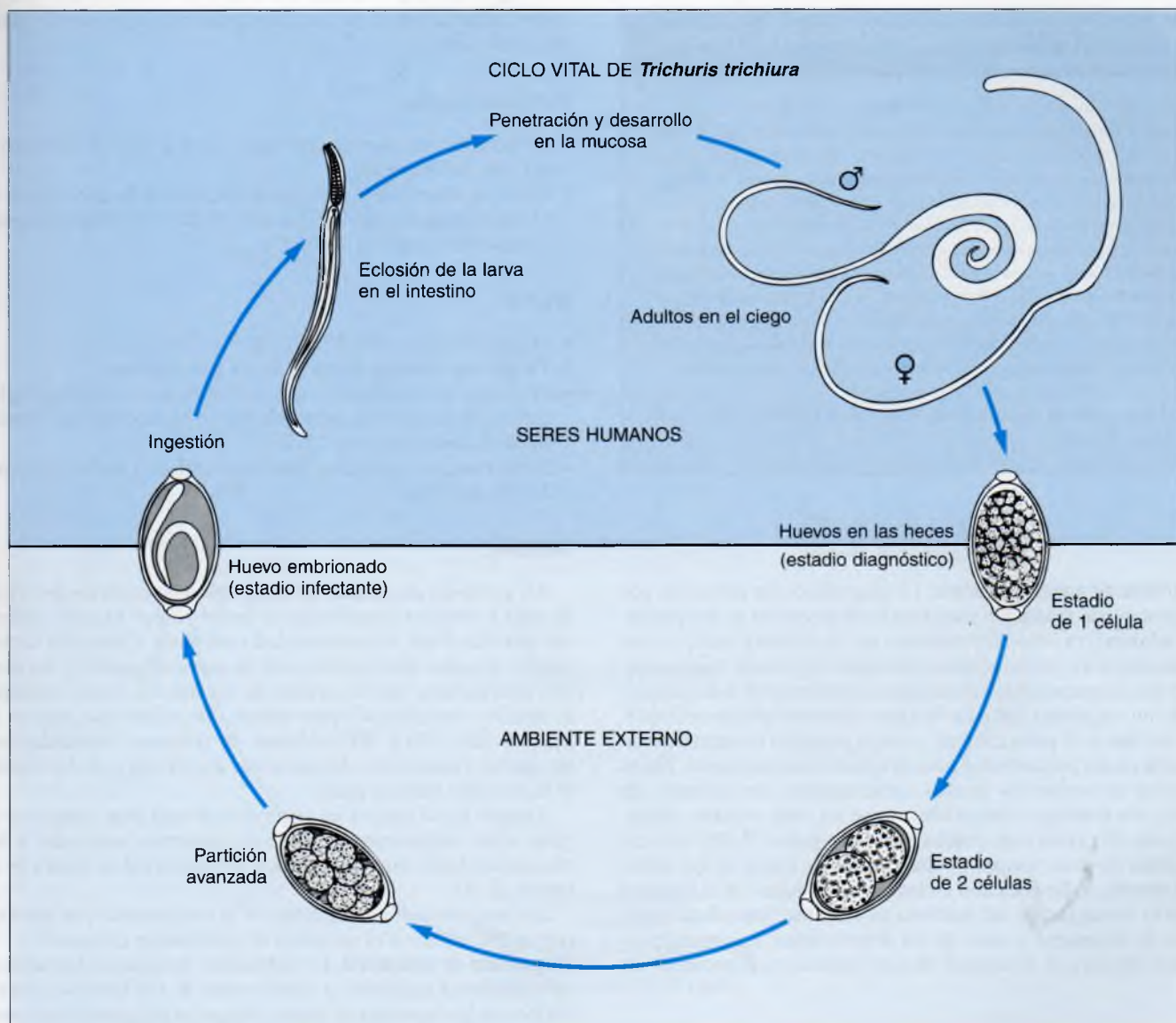


Figura 22-9 El ciclo vital de *Trichuris trichiura* es similar al de *Ascaris lumbricoides*, salvo que no presenta el estadio larvario circulatorio. Los huevos, después de la eliminación en el ambiente externo, también requieren un período de alrededor de 21 días en condiciones favorables antes de que se vuelvan infectantes. Cuando el huésped humano ingiere los huevos embrionados, las larvas eclosionan en el intestino. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con *Ascaris*, estas larvas penetran sólo en la mucosa del intestino, sobre todo en el ciego, donde se fijan y evolucionan a parásitos adultos, machos y hembras. Las hembras grávidas depositan huevos que son eliminados por las heces para completar el ciclo vital.

adultos rara vez se observan en las muestras de heces. En la lámina en color 22-5E se muestra una fotografía con aumento de un parásito adulto.

Huevos

- Miden alrededor de $54 \times 22 \mu\text{m}$.
- Están entre las formas que se reconocen con más facilidad en las preparaciones microscópicas por su forma de barril característica y los “tapones” polares hialinos, convexos y refringentes en cada extremo (lámina en color 22-5F).
- Estos huevos pueden confundirse sólo con los de *Capillaria philippinensis*; sin embargo, sus tapones polares son menos prominentes, son aplanados y la cáscara es más gruesa y estriada (lámina en color 22-5P).

Enterobius vermicularis (oxiuros)

Las infecciones por “oxiuros” se conocen desde la antigüedad y es probable que representen las más comunes de todas las infecciones por nematodos. Una frase bien conocida es “Usted puede haber tenido una infección cuando era niño; o, si no, es probable que la adquiera cuando tenga niños”. El ciclo vital de *Enterobius vermicularis* es bastante simple, no requiere un huésped externo y la principal vía es la fecal-oral a través de la transmisión interhumana directa mano-boca, similar a la de las amebas intestinales. En la mayoría de los casos, los huevos ya han madurado en el momento de su detección en muestras de heces o en las preparaciones provenientes de la piel perianal. En estas muestras suelen observarse larvas bien desarrolladas y muy infecciosas.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-5 Tricocefalosis (trichuriasis)

En las infecciones leves, los pacientes suelen ser asintomáticos. Los parásitos adultos habitan en el intestino grueso. En las infecciones intensas puede haber diarrea, disentería y malestar abdominal debidos en gran medida al daño mecánico de la mucosa intestinal. La anemia, la restricción del crecimiento y la filtración intestinal se identificaron como consecuencias predecibles de la infección intensa y pueden servir como indicio de la magnitud de la infestación.⁴⁴ También se observaron grados variables de malabsorción y como la diarrea tiende a ser acuosa, las alteraciones del equilibrio del sodio y del potasio pueden constituir un problema. El prolapso rectal en los niños es una de las complicaciones de la infección intensa por *Trichuris*.²⁷³ Como los parásitos adultos son visibles a simple vista como corpúsculos diminutos, su presencia da una apariencia en "pastel de coco" a este prolapso.

El tratamiento de elección es con mebendazol, en comprimidos masticables de 100 mg.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de infección por oxiuros puede realizarse mediante la observación de los parásitos adultos, ya sea directamente en el esfínter anal, o por microscopia en preparaciones con cinta engomada transparente. Estas preparaciones se realizan al presionar el lado pegajoso de un segmento corto de la cinta sobre los pliegues alrededor del ano o la piel perineal, y luego pegando la superficie de la cinta en un portaobjetos para el estudio microscópico. No es habitual encontrar los huevos característicos en muestras de heces; sin embargo, suelen observarse en estas mismas preparaciones con cinta engomada (lámina en color 22-4F). El rendimiento de estas formas de diagnóstico es mejor en los niños si la prueba se lleva a cabo en las primeras horas de la mañana cuando la migración del parásito es máxima, inmediatamente antes de levantarse y antes de las deposiciones. Las manifestaciones clínicas de la enterobiasis se ilustran en el recuadro de

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-6 Enterobiasis

Los parásitos adultos residen en el ciego y el recto. En ocasiones, el diagnóstico se realiza mediante la observación de los parásitos en preparaciones histológicas teñidas del apéndice u otras porciones del intestino. Los síntomas aparecen cuando la hembra grávida deposita los huevos en los pliegues de la piel perianal durante las últimas horas de la noche. El prurito anal nocturno es el síntoma de presentación habitual debido a la irritación causada por los huevos depositados. Las infecciones son más frecuentes en los niños y las mujeres, que son más propensos a la infección que los hombres. En las infecciones con gran cantidad de parásitos puede haber vaginitis con secreción mucosa o uretritis en las mujeres jóvenes.⁹⁶ El nerviosismo, el insomnio y las pesadillas son otros síntomas de presentación.

El pamoato de pirantelo o el mebendazol, este último en una dosis única de 100 mg en forma de cápsulas masticables, constituyen los tratamientos de elección. Como las infecciones pueden recidivar, suele ser necesario repetir el tratamiento después de 1 o 2 semanas si los síntomas reaparecen.

correlación clínica 22-6. Las características útiles para la identificación son:

Parásitos adultos

- La hembra adulta mide alrededor de 8 a 13 mm de largo × 0,4 mm de diámetro.
- Puede reconocerse por la expansión alar de la cutícula en el extremo anterior (lámina en color 22-5G) y la cola larga puntiaguda (en forma de "alfiler").

Huevos

- Miden alrededor de 30 × 50 µm.
- Tienen una cáscara delgada, lisa y transparente.
- Presentan un contorno oval y asimétrico, con un lado aplastado, que simula una pelota de fútbol americano algo desinflada (Lámina en color 22-5F).
- Suele contener una larva bien desarrollada (lámina en color 22-5F, derecha).

Uncinarias

Ancylostoma duodenale es la especie de uncinarias del Viejo Mundo y *Necator americanus* es la del Nuevo Mundo, definidas por las áreas de enfermedad endémica. Como los ciclos vitales de estas dos especies son en esencia iguales y no pueden diferenciarse por el aspecto de sus huevos, suele utilizarse el término "uncinarias" para ambas. Se estima que hay en el mundo entre 700 y 900 millones de personas infectadas por uncinarias (sobre todo *Ancylostoma duodenale*), de las cuales el 0,2% sufre anemia grave.

Aunque no se precisa un segundo huésped para completar el ciclo vital, importantes diferencias mantienen separadas a las uncinarias de los otros nematodos. El ciclo vital se ilustra en la figura 22-10.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad por uncinarias se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-7.

Diagnóstico de laboratorio. Lo habitual es realizar el diagnóstico de laboratorio mediante la observación de los huevos característicos en las muestras de heces, aunque el diagnóstico en raras ocasiones puede hacerse por la observación de parásitos adultos en el intestino cuando están fijados a la cubierta mucosa y no son eliminados por las heces. Es importante identificar los huevos de las uncinarias en muestras de heces y tal vez realizar un recuento, ya que la enfermedad potencialmente grave puede asociarse con las infecciones intensas por este nematodo. Los huevos de *A. duodenale* y *N. americanus* son idénticos y tampoco pueden diferenciarse de los de *Strongyloides stercoralis*.

Parásitos adultos

- Miden hasta 1,5 cm de longitud y residen en la parte superior del intestino, donde se adhieren con firmeza a la mucosa por la acción penetrante de las partes cortantes de la cápsula bucal.
- La observación de la cápsula bucal puede servir para diferenciar ambas especies.
 - *Ancylostoma duodenale* tiene dos pares de dientes quitinosos (lámina en color 22-5I).
 - *Necator americanus* se fija mediante un par de láminas cortantes (lámina en color 22-5J).
- Los machos se distinguen por su bolsa copulatriz posterior, con aspecto deshinchado.

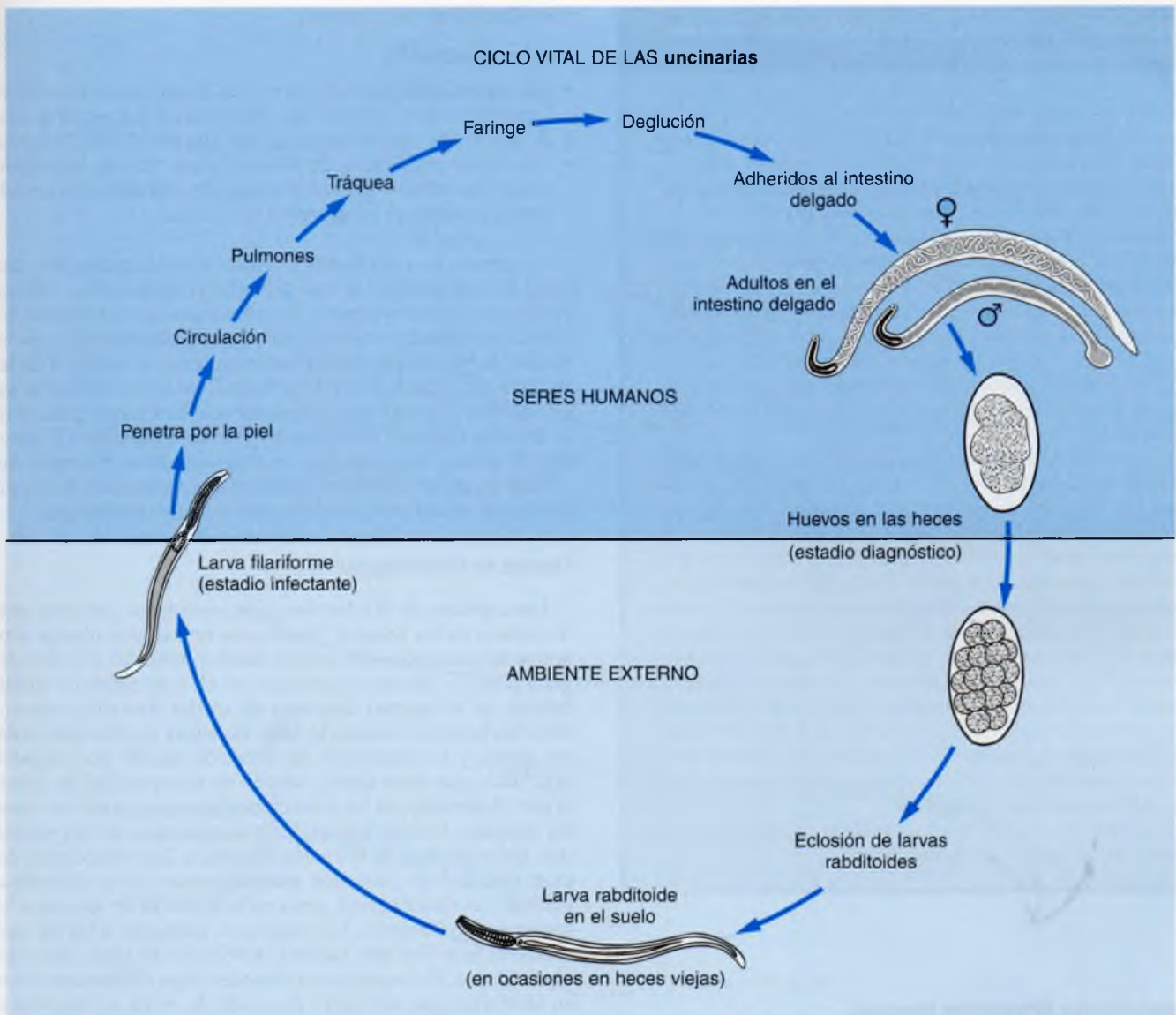


Figura 22-10 Ciclo vital de las uncinarias. Los huevos de las uncinarias suelen eliminarse por las heces en estadios tempranos de partición de las hembras grávidas. En alrededor de 24 horas en el suelo y en condiciones ideales de temperatura y humedad, los huevos eclosionan en el primer estadio larvario, la larva rabditoide de vida libre. Cerca de 5 a 7 días después, la larva rabditoide se transforma en la larva filariforme del tercer estadio, la forma infectante para los seres humanos. De acuerdo con la temperatura y la humedad del suelo, la larva filariforme puede permanecer infectante hasta 6 semanas. Los seres humanos se infectan por la penetración de la larva filariforme que entra en contacto con la piel, ya sea de las manos cuando se excava en el suelo infestado por la larva, o de los pies cuando se camina sin calzado en el suelo contaminado con heces humanas. De manera similar a lo que sucede con *Ascaris*, las larvas de uncinarias también penetran la mucosa intestinal, ingresan en la circulación, rompen los alvéolos pulmonares, ascienden con la tos y son deglutidas. Estas larvas “procesadas” de nuevo excavan en la mucosa intestinal, donde evolucionan a parásitos adultos machos y hembras. Estos parásitos adultos permanecen firmemente adheridos a la mucosa ya sea mediante las láminas cortantes o los pares de dientes según la especie, mientras se aprovechan de un aporte constante de sangre del huésped. Las hembras depositan grandes cantidades de huevos que se eliminan por las heces para completar el ciclo vital.

Huevos

- Miden alrededor de $60 \times 40 \mu\text{m}$ y son perfectamente ovales.
- Las cáscaras son delgadas, lisas, transparentes y sin pigmentación.
- Las células de la yema se retraen y dejan un espacio claro debajo de la cáscara (lámina en color 22-5K).

Larvas rabditoides

- A diferencia de las especies de *Strongyloides* en las cuales los huevos eclosionan mientras aún están en el intestino y se

observan en preparaciones microscópicas en fresco de muestras fecales, las larvas rabditoides de uncinarias rara vez están presentes.

- Las larvas rabditoides de las uncinarias tienen una cavidad bucal larga (lámina en color 22-5L, izquierda), una característica que las distingue de *Strongyloides stercoralis*. Los huevos de uncinarias rara vez eclosionan dentro del intestino.
- Las larvas rabditoides de *Strongyloides stercoralis* tienen una cavidad bucal corta (véase lámina en color 22-5L, derecha).

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-7 Infecciones por uncinarias

Los síntomas pueden aparecer en relación con los diversos estadios del ciclo de vida. Las infecciones de la piel pueden experimentarse en los sitios de penetración de las larvas filariformes, en especial cuando los seres humanos se infectan por especies de uncinarias no humanas que afectan de modo habitual a otros animales ("prurito del suelo").²⁷³ El síndrome de Loeffler en los pulmones y la eosinofilia suelen observarse durante la etapa migratoria de la larva pulmonar. Las uncinarias hembras adultas producen sólo 2 500 a 5 000 huevos por día; por lo tanto, el recuento de huevos fecales puede reflejar el número de uncinarias adultas y, a su vez, indica la gravedad de la infección. La presencia de más de 2 000 huevos de uncinarias por mililitro de heces en las mujeres y los niños, y más de 5 000 por mililitro en los hombres suele asociarse con anemia. García⁹⁶ describe las técnicas para el recuento de los huevos.

En las infecciones intensas de 500 o más parásitos, el huésped podría perder el equivalente de 1/4 a 1/2 L de sangre por semana, lo que causa una anemia hipocrómica grave por deficiencia de hierro e hiperplasia eritroide acentuada de la médula ósea, que a su vez puede conducir a la osteoporosis y la formación de quistes óseos. Las complicaciones de las infecciones graves pueden ser debilidad, fatiga, restricción del crecimiento, edema periférico e insuficiencia cardíaca congestiva. De importancia fundamental en todo el mundo es la falta de desarrollo mental por la hipoxia asociada con la anemia en millones de niños infectados por uncinarias.¹⁵⁸ La diarrea, el dolor abdominal y las náuseas son manifestaciones de la fase intestinal de la infección. Kelley y cols.¹⁵¹ informaron que las infecciones por uncinarias se desarrollaron en 35 de 684 soldados que participaron en las operaciones militares de Granada; en su mayoría se asociaron con exposición al suelo cerca de los hogares donde las condiciones sanitarias eran mínimas.

Se recomienda el tratamiento con mebendazol, en comprimidos masticables, 100 mg cada 12 horas durante 3 días.

Estrongiloidiasis y *Strongyloides stercoralis*

Las peculiaridades en el ciclo vital separan a las infecciones por *Strongyloides stercoralis* de las de los otros nematodos. Por ejemplo, el diagnóstico de laboratorio de estrongiloidiasis suele realizarse mediante la observación de las larvas rabditoides móviles más que de los huevos en muestras de heces (lámina en color 22-5M). El ciclo vital se ilustra en la figura 22-11.

La magnitud mundial de la estrongiloidiasis es similar a la de la prevalencia de las infecciones por uncinarias, con una estimación en alza de 800 millones de personas infectadas, que afecta hasta el 10% de la población en algunas regiones. La incidencia de la infección en cualquier región dada es muy irregular ya que las larvas filariformes requieren considerable humedad y crecen mejor donde el nivel freático es elevado. En los Estados Unidos, la estrongiloidiasis es endémica en las regiones rurales del sur y del sudeste, con 3% a 5% de las personas infectadas en algunas regiones.²⁷³ Las infecciones también tienen alta prevalencia en los internados en instituciones mentales y prisiones y en los inmigrantes que antes residieron en regiones tropicales endémicas. Las manifestaciones clínicas de la estrongiloidiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-8.

Identificación por el laboratorio**Larvas rabditoides**

- Las larvas rabditoides de uncinarias tienen una cavidad bucal larga (lámina en color 22-5L, izquierda), a diferencia de la de *S. stercoralis*, que es corta (lámina en color 22-5L, derecha).
- Las larvas rabditoides de *Strongyloides stercoralis* también tienen un esbozo genital prominente ubicado aproximadamente a un tercio de distancia de la cola.

A menudo las infecciones crónicas se asocian con poca cantidad de organismos, lo que dificulta el diagnóstico objetivo. Puede necesitarse el examen de varias muestras de heces en días sucesivos o puede estar indicado el procedimiento de concentración de Baermann. En este procedimiento, se induce a las larvas activas a migrar fuera de la masa fecal en un recipiente con agua a través de una malla de alambre cubierta con gasa, como lo describe García.⁹⁶ DeKaminsky,⁶³ en un estudio de 427 muestras de heces, encontró que se diagnosticaron 33 casos más cuando se utilizó la técnica de Baermann modificada y otros 28 casos más cuando se utilizó el cultivo en placas con agar.

Especies de *Trichostrongylus*

Las especies de *Trichostrongylus*, detectadas con muy poca frecuencia en los Estados Unidos, son nematodos adultos similares a las uncinarias que residen en el epitelio del intestino delgado con sus cabezas incrustadas en él. Los parásitos adultos habitan en el aparato digestivo de ovejas, bovinos, cabras y otros herbívoros. Aunque la larva de tercer estadio yace sobre los pastos y la vegetación, la infección sucede por ingestión oral, dado que estas larvas carecen de la capacidad de invadir la piel. Asimismo, en las infecciones humanas, como no tienen las cápsulas bucales especiales características de las uncinarias, no se produce la filtración de sangre. Las infecciones con gran cantidad de parásitos pueden causar dolor abdominal, diarrea y eosinofilia leve, pero en la mayoría de los casos los síntomas son mínimos. Los huevos se asemejan a los de uncinarias, si bien son más largos (78-98 × 40-50 µm), con extremos afilados. Es importante reconocer estas diferencias sutiles en la morfología del huevo de modo de evitar el diagnóstico incorrecto de infección por uncinarias. El tratamiento recomendado es tiabendazol, en dosis de 25 mg/kg cada 12 horas durante 2 días.

Capillaria philippinensis

Capillaria philippinensis es un nematodo extremadamente pequeño; los adultos miden de 1,5 a 3,9 mm de longitud y el ancho varía de 5 µm en su cabeza filamentososa a 30 µm en la parte media del cuerpo. Después de considerable investigación para hallar los huéspedes reservorios, en la actualidad se considera que las aves que se alimentan de peces son los huéspedes naturales dentro del ciclo vital pez-ave.⁴⁷ Los seres humanos se infectan cuando comen carne de pescado poco cocida.

La enfermedad es endémica en las Filipinas, Tailandia y regiones adyacentes al mar de la China meridional. Los hábitos de alimentación locales incluyen la ingestión de órganos crudos de animales y el uso de los jugos intestinales de los animales para sazonar arroz y otros productos comestibles, y comer cangrejos y pequeños peces de agua dulce sin cocinar, que se considera una delicadeza en muchas poblaciones indígenas. La infección por *C. philippinensis* siempre causa enfermedad y puede conducir a la muerte si no se trata. Desde 1967 hasta

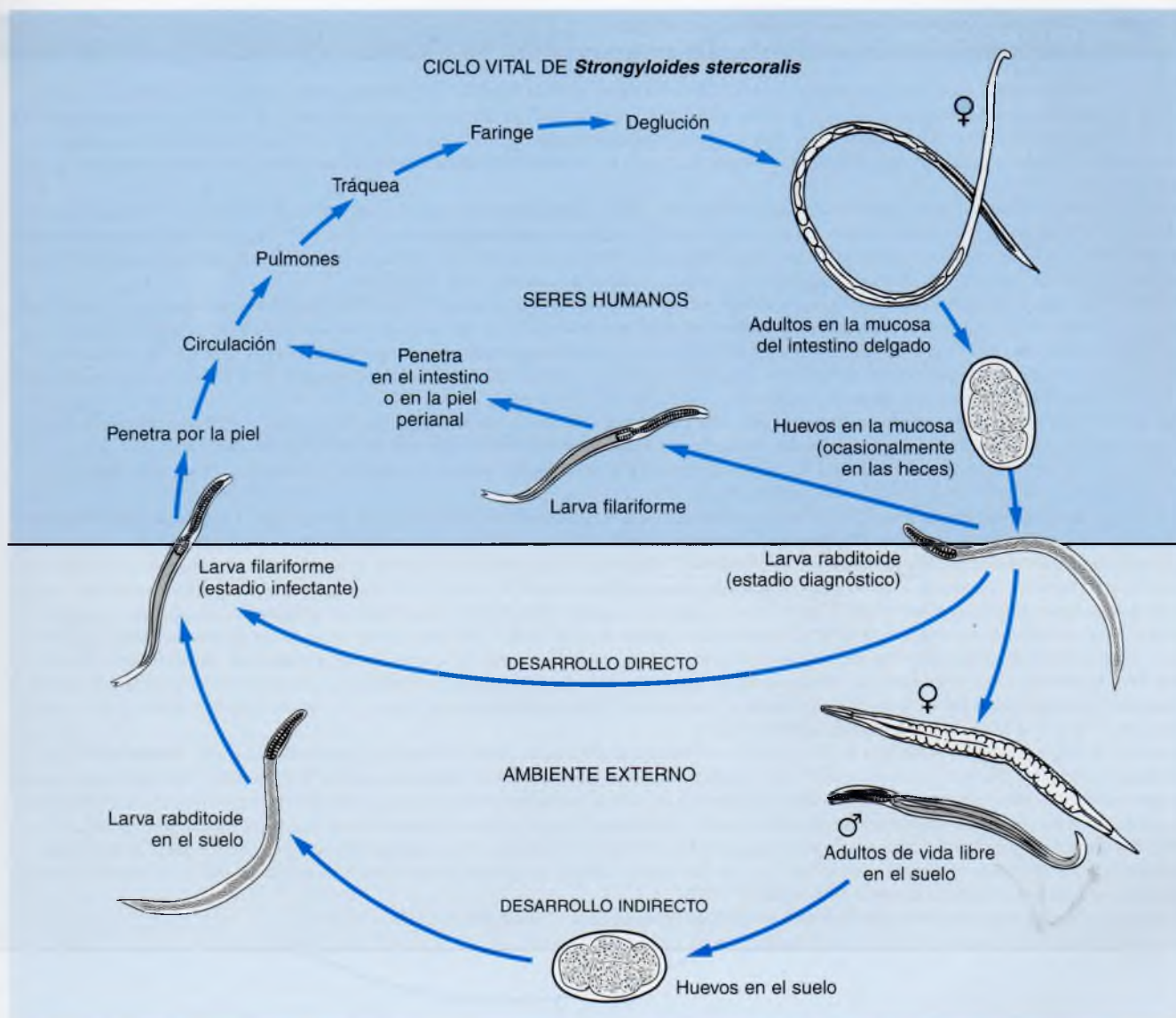


Figura 22-11 Ciclo vital de *Strongyloides stercoralis*. El ciclo vital de *Strongyloides stercoralis* es similar al de las uncinarias, excepto que la mayoría de los huevos eclosionan en larvas rhabditoides mientras se encuentran en la luz intestinal. En los pacientes que presentan una pérdida de la inmunidad, las larvas rhabditoides pueden emerger de nuevo en larvas filariformes dentro de la luz intestinal, a partir de la cual pueden invadir directamente la mucosa, lo que produce una reinfección diseminada. En casos de enfermedad diarreica, los huevos, indistinguibles de los de uncinarias, se observan en ocasiones en las heces. En condiciones ideales de humedad y temperatura en el ambiente externo, las larvas rhabditoides mudan y rápidamente se transforman en larvas filariformes infectantes. Los seres humanos se infectan por penetración de las larvas filariformes en la piel por el contacto directo. La migración de estas larvas invasivas en la circulación es similar a la de las uncinarias que por último evolucionan a parásitos adultos en el intestino.

1990, se documentaron 1 884 casos confirmados de capilaria-sis intestinal, de los cuales 110 fueron mortales.⁴⁷

El comienzo gradual con dolor abdominal, ruidos de borbo-teo en el estómago y diarrea intermitente en un período de 4 a 8 semanas es el cuadro clínico de presentación habitual. También se observa con frecuencia enteropatía perdedora de proteínas grave, malabsorción de grasa y azúcares, y excreción disminuida de la xilosa. Puede haber pérdida de líquidos y alteraciones del equilibrio electrolítico caracterizadas por concen-traciones bajas de potasio, sodio y calcio plasmáticos. Hay concen-traciones elevadas de IgE y bajas de IgG, IgM e IgA. En los casos mortales se observó infección intensa en el yeyuno, hígado-graso y vacuolización del citoplasma de las células del túbu-

lo contorneado proximal del riñón con depósito citoplasmá-tico intenso de pigmento lipocrómico. En los cortes histológicos de intestino delgado se observó atrofia focal de la mucosa en los sitios de invasión del organismo.⁴⁷

Identificación por el laboratorio

- Sobre la base del examen de las heces, este parásito puede confundirse con *Trichuris trichiura* porque los huevos tienen un aspecto similar.
- Los huevos de *C. philippinensis* tienen extremos, poseen tapones polares menos notorios y una cáscara estriada y gruesa (lámina en color 22-5P).

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-8 Strongiloidiasis

La puerta de entrada cutánea puede presentar dermatitis crónica leve con irritación local y prurito.³⁷ El verdadero prurito característico de las infecciones cutáneas por uncinarias por lo general no sucede. Sin embargo, Leighton y MacSween¹⁶² informaron el caso de una mujer de 74 años con un antecedente de 65 años de erupciones similares a las urticarianas. Por último, estos síntomas se correlacionaron con la persistencia a largo plazo de hiperinfección por strongiloidiasis. Gordon y cols.¹⁰⁶ también realizaron el diagnóstico de strongiloidiasis diseminada a través del reconocimiento de la larva filariforme en biopsias de piel.

Las manifestaciones intestinales de las infecciones por strongiloides varían desde síntomas casi nulos en las infecciones leves hasta la enfermedad intestinal necrosante grave en las infecciones intensas. En algunos pacientes los síntomas pueden sugerir úlcera péptica; en otros, la afección del intestino delgado puede simular en las radiografías la enfermedad de Crohn. Bhatt y cols.¹⁸ publicaron un caso de hemorragia gastrointestinal alta masiva que afectó a un inmigrante africano de raza negra de 29 años, causada por una infección intensa del duodeno por *S. stercoralis*.

Con una dosis infectante intensa puede producirse la enfermedad pulmonar sugestiva de neumonía de Loeffler, manifestada por sibilancias y eosinofilia; o en casos de síndrome por hiperinfección, que se describirá más adelante en este capítulo, pueden aparecer neumonía verdadera, tos y disnea. Harris y cols.¹²³ comunicaron dos casos de strongiloidiasis diseminada en los cuales el diagnóstico se había hecho por la observación de larvas en el esputo. Los autores sugirieron que en los pacientes inmunosuprimidos en quienes se desarrolla neumonía no bacteriana, en especial ante la presencia de eosinofilia, se deben controlar muestras de heces y de esputo para determinar la infección por *S. stercoralis*.

La corticoterapia a largo plazo también puede predisponer a las infecciones diseminadas por *Strongyloides*. Chu y cols.³⁹ describieron un caso de neumonía en un hombre de 65 años con enfermedad pulmonar obstructiva crónica dependiente de esteroides. Las larvas rabditoides de *Strongyloides* se detectaron en una muestra de esputo expectorado. En general, la neumonitis causada por las larvas del nematodo es transitoria y se caracteriza por tos y fiebre; en los casos más graves, se observan dolor torácico, disnea y hemoptisis.

Los huéspedes inmunodeprimidos presentan una vulnerabilidad particular a las infecciones diseminadas por *Strongyloides*. La propensión de los huevos a eclosionar con rapidez y producir larvas filariformes intrainstestinales (lámina en color 22-5N) convierte a los pacientes en vulnerables a la autoinfección, lo que causa un cuadro conocido como síndrome por hiperinfección.¹⁴³ Purtilo y cols.,²²⁰ después de observar la ausencia de respuesta de tejido granulomatoso frente a las larvas en la autopsia de varios casos mortales de strongiloidiasis, concluyeron que es necesario el sistema inmunitario mediado por células intacto para mantener controlado al organismo. Una vez que la inmunidad se compromete o anula, es probable que en pacientes que albergan el parásito suceda la hiperinfección por invasión directa de la mucosa intestinal (lámina en color 22-5O) con diseminación de las larvas a muchos órganos y tejidos. Genta⁹⁹ ofreció el argumento alternativo de que los corticosteroides, en lugar de actuar a través de la supresión de la inmunidad, pueden hacerlo directamente sobre el parásito como "hormonas que estimulan la muda" que promueven de modo directo la proliferación del organismo, lo que determina que la enfermedad diseminada sea la principal posibilidad. Aunque el síndrome de hiperinfección por *Strongyloides* no se ha asociado de manera específica con la positividad del HIV y el SIDA, se han informado algunos casos.¹²¹

Los seres humanos pueden ser portadores de *S. stercoralis* con infestación subclínica durante muchos años tras el contacto inicial. Por esta razón los pacientes en quienes se desarrolla la strongiloidiasis diseminada no necesitan haber tenido una exposición reciente. Klein y cols.¹⁵⁵ reiteran la necesidad de examinar muestras de heces para strongiloidiasis antes de tratar con un ciclo de tratamiento inmunosupresor a los pacientes que viven en áreas endémicas. Los receptores de trasplantes de órganos representan otro grupo de alto riesgo en los que se deben realizar exámenes de heces para detectar larvas de *Strongyloides* antes de comenzar el tratamiento inmunosupresor.⁵⁶ El síndrome de hiperinfección se complica aún más por el mayor riesgo de desarrollar sepsis por microorganismos gramnegativos, debido tal vez a que las bacterias intestinales pueden invadir a través de soluciones de continuidad de la mucosa producidas por la penetración de las larvas de *Strongyloides*.

El régimen terapéutico de elección es el tiabendazol, en dosis de 25 mg/kg cada 12 horas durante 2 días.

- El error en la identificación puede conducir a una enfermedad innecesaria o incluso a la muerte, ya que los casos de *C. philippinensis* suelen progresar si no se tratan.

Cestodos

Los cestodos son una subclase de helmintos que comprenden las tenias verdaderas, con un escólex y una serie de segmentos del cuerpo hermafroditas, que producen huevos denominados proglótides. Los cestodos de importancia humana que se describen son:

Taenia saginata
Taenia solium
Diphyllobothrium latum
Hymenolepis nana
Hymenolepis diminuta
Dipylidium caninum

El cuerpo de un cestodo adulto o tenia, conocido como estróbil, consta de dos partes: el escólex y los proglótides (lámina en color 22-6A). El escólex es la parte anterior con ganchos o

ventosas, por los que el parásito se adhiere y se fija a la mucosa intestinal. La corona del escólex, denominada rostelo, puede tener ganchos (armada) (lámina en color 22-6B) o estar desprovista de ellos y ser lisa (desarmada). Estas diferencias morfológicas son útiles para establecer la identificación de la especie.

La porción principal del cuerpo de una tenia está compuesta por una larga serie de segmentos denominados proglótides. Cada proglótide tiene las estructuras reproductivas masculinas y femeninas, las ramificaciones uterinas, las que están repletas de huevos cuando maduran (lámina en color 22-6C). Los huevos son eliminados por las heces, donde se observan en preparaciones microscópicas en fresco para establecer el diagnóstico de laboratorio. Las diferencias sutiles de tamaño, forma y estructuras internas de los proglótides sirven como ayuda para establecer la identificación de especie.

Con excepción de *Hymenolepis nana*, en el cual puede haber transmisión interhumana de las infecciones a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces que contienen los huevos infectantes, los ciclos vitales de los cestodos requieren uno o más huéspedes intermediarios para llevar a cabo los estadios de desarrollo larvarios. En la figura 22-12 se ilustra el ciclo vital de *Taenia solium*.

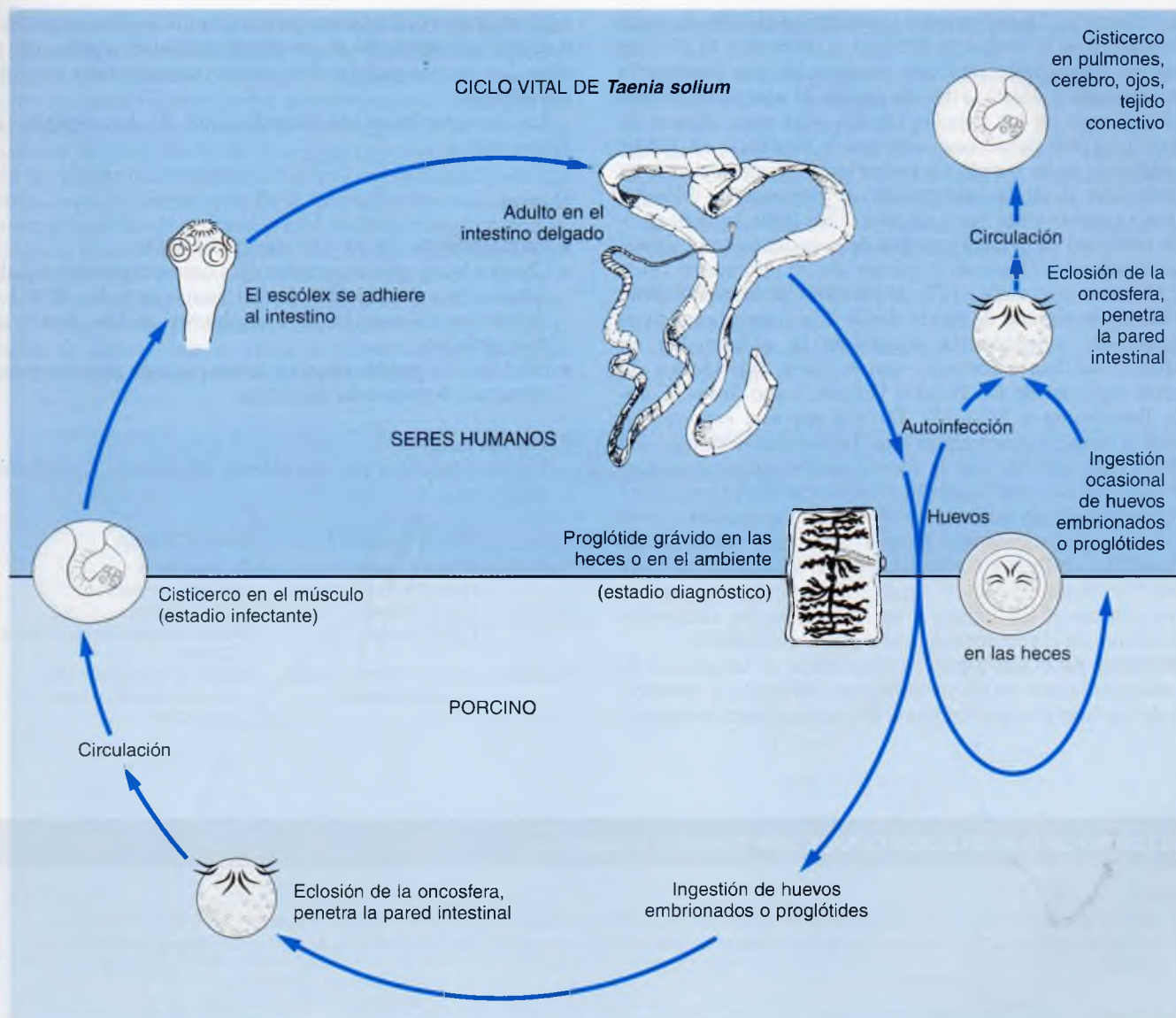


Figura 22-12 Ciclo vital de *Taenia solium*. Un ser humano infectado con una tenia intestinal elimina con las heces proglótidos o huevos maduros al ambiente externo, donde el suelo, el agua y la materia vegetativa se contaminan con las heces. En el caso de *Taenia solium*, los huevos embrionados son ingeridos por un cerdo; en su intestino eclosiona la oncosfera y penetra la mucosa. Las larvas liberadas ingresan en la circulación y migran hasta el músculo esquelético para enquistarse en la forma de un quiste similar a una vejiga denominado cisticerco. Con la ingestión de carne de cerdo infestada por cisticerco por un ser humano confiado, el escólex se evagina en el intestino y se adhiere a la mucosa intestinal. La tenia crece a través de la proliferación de cientos de proglótidos hasta que alcanza una longitud de varios metros. Los huevos y los proglótidos se liberan de nuevo a la luz intestinal y se eliminan por las heces para completar el ciclo vital.

Taenia solium y *Taenia saginata*

Las infecciones por tenias se conocen desde la época bíblica y su conocimiento primitivo puede relacionarse con la prohibición del judaísmo de ingerir cerdo. La diferenciación entre *Taenia saginata* y *Taenia solium* es más que un ejercicio académico. Como ya se mencionó, los seres humanos adquieren las infecciones intestinales de una tenia adulta por la ingestión de carne de cerdo (*T. solium*) o de vaca (*T. saginata*) poco cocida que contiene la larva (lámina en color 22-6D). Las infecciones intestinales por las tenias adultas de estas dos especies ocasionan síntomas similares en los seres humanos, como se describe más adelante. Sin embargo, éstos pueden actuar también

como huéspedes intermediarios si ingieren los huevos de *T. solium*. En este caso, la larva viaja por la circulación, con una propensión a alojarse en el cerebro en lugar de hacerlo en el músculo esquelético, lo que causa una enfermedad conocida como cisticercosis (lámina en color 22-6E). El personal de laboratorio debe ser cuidadoso cuando manipula los proglótidos de *T. solium* cargados de huevos para evitar la transmisión inadvertida mano-boca. La cisticercosis humana no sucede con *T. saginata*; sin embargo, como la identidad verdadera no se conoce de inmediato, debe tenerse mucho cuidado cuando se manipula cualquier proglótide.

La cisticercosis tiene una prevalencia elevada en México y América Latina, donde se estima que hay cerca de 350 000 per-

sonas infectadas. La enfermedad se detectó en el 2-3% de casos de autopsias en la ciudad de México, y determina el 25% de todas las masas intracraneanas encontradas por tomografía computarizada.²¹⁷ Hasta la década pasada, la neurocisticercosis era infrecuente en los Estados Unidos (sólo unos cientos de casos registrados desde que comenzó la vigilancia en 1957); sin embargo, se ha notado un aumento destacado reciente, en paralelo con el de la inmigración de personas de México, América Central y del Sur y de Asia.⁴⁵ En 1989, la cisticercosis se convirtió en una enfermedad de comunicación obligatoria en California.⁷⁶ Durante el primer año se informaron cerca de 134 casos, casi todos (117) de personas de origen hispano que habían inmigrado de países donde *T. solium* es endémica. Además de la incidencia mayor de la enfermedad en California, se han informado varios casos individuales de diversas regiones de los Estados Unidos, como Texas, Colorado, Pensilvania y Misuri.¹⁸³ Tal vez por esta experiencia, Roman y cols.²²⁷ propusieron que la neurocisticercosis sea declarada una enfermedad de comunicación obligatoria internacional. Diversas publicaciones recientes reflejan tasas elevadas de incidencia de cisticercosis sintomática en muchas regiones del mundo, ejemplificadas por áreas endémicas de las comunidades andinas y en Burundi, como lo informaron Cruz y cols.⁴⁸ y Newell y cols.,¹⁹⁸ respectivamente. Las manifestaciones clínicas de las teniasis y las infecciones por cisticercos se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-9.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por tenias suele hacerse mediante la observación de los huevos característicos en preparaciones microscó-

picas en fresco de las heces; para la identificación de especie se requiere la observación de los parásitos adultos o porciones de ellos. Los huevos para las dos especies presentan una morfología idéntica.

Las características de identificación de las especies de *Taenia* son:

Huevos

- Forma esférica, de $30 \times 45 \mu\text{m}$ de diámetro.
- Cáscara lisa y gruesa característica con estriaciones radiales (lámina en color 22-6H). En la lámina en color 22-6G se muestra una fotografía de estos huevos in situ dentro del útero grávido.
- En el interior pueden observarse tres pares de ganchos en una estructura denominada oncosfera.

Parásitos adultos

Las características por las cuales se diferencian *T. saginata* y *T. solium* son:

	TAENIA SAGINATA	TAENIA SOLIUM
Estróbilo:	4-10 m de largo Hasta 2 000 proglótides	2-4 m de largo 800-1000 proglótides
Escólex:	Cuatro ventosas Rostelo inerme	Cuatro ventosas Rostelo armado (lámina en color 22-6B)
Proglótide:	Más de 13 ramificaciones uterinas laterales	Menos de 13 ramificaciones uterinas laterales (lámina en color 22-6C)

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-9 Teniasis y cisticercosis

Teniasis

Los síntomas intestinales suelen ser insignificantes. La eliminación de proglótides en las heces puede ser el primer indicio de enfermedad. Puede experimentarse dolor epigástrico, sensación vaga de malestar abdominal, nerviosismo y aumento del apetito. La pérdida de peso es mínima y la eosinofilia suele ser moderada.

Cisticercosis

Cisticercosis se refiere al desarrollo de formas larvianas enquistadas extraintestinales de *T. solium* en diversos órganos tras la ingestión de huevos grávidos en alimentos o agua contaminados con heces. Aunque casi todos los casos humanos son causados por *T. solium*, otras especies de tenias animales pueden, en raras ocasiones, producir también cisticercos con morfología similar. El sistema nervioso central está afectado en el 60% a 96% de los pacientes, un cuadro conocido como neurocisticercosis (lámina en color 22-6E). La mayoría de los pacientes con neurocisticercosis presentan más de un quiste y en un caso se observaron 200 en la autopsia.¹⁸³

Los síntomas presentan variaciones entre los pacientes. Las lesiones en la corteza cerebral pueden causar convulsiones o trastornos neurológicos localizados. Con frecuencia se observan parálisis de los nervios craneales que afectan sobre todo al quinto y al séptimo, y reflejos anormales. La cisticercosis es la causa identificada con mayor frecuencia de epilepsia en adultos jóvenes que viven en áreas endémicas y es la única manifestación en hasta la tercera parte de los casos.²³⁶ Las convulsiones focales aparecen en hasta las tres cuartas partes de los infectados. Los quistes cerebrales intraventriculares pueden obstruir el flujo de líquido cefalorraquídeo, lo que conduce a síntomas de hipertensión intracraneana aguda (cefalea, vértigos, náuseas, vómitos, edema de papila y trastornos visuales); los cambios de la personalidad y del estado mental se presentan en el 40% de los pacientes.¹⁸³

Las larvas invasivas (oncosferas) son sensibles a los anticuerpos circulantes y al complemento en el huésped humano;²⁸⁶ sin embargo, títulos importantes sólo se forman después que las larvas se han transformado en metacestodos resistentes a los anticuerpos. De hecho, el anticuerpo puede unirse al parásito por medio de los receptores Fc, al que pueden utilizar como fuente de proteína. La taeniaestatina y otras moléculas del parásito pueden interferir en la proliferación de los linfocitos y la función de los macrófagos, por lo tanto se paraliza la respuesta inmunitaria celular. Herrera y cols.¹²⁷ informaron un aumento de tumores cerebrales y procesos malignos de la sangre asociado con cisticercosis, relacionados tal vez con la posible inducción de daño del DNA en las células que rodean los cisticercos y de una respuesta inflamatoria persistente.

El praziquantel y el albendazol han sido ampliamente probados y utilizados con éxito para el tratamiento de la neurocisticercosis, por lo general en combinación con corticosteroides.²⁷⁸ En un esfuerzo masivo reciente para tratar la cisticercosis en una comunidad rural de México (dosis únicas de praziquantel de 5 mg/kg), la teniasis humana se redujo el 56% y las convulsiones de comienzo tardío, el 70% en un período de 42 meses.²³⁶ En este mismo estudio, las concentraciones de anticuerpos contra el cisticercos se redujeron en los seres humanos el 75% y en los cerdos tratados, el 55%. Se han desarrollado vacunas contra la hidatidosis que emplean antígenos recombinantes y en estudios experimentales en ovejas se halló que inducen una protección mayor del 90% cuando se exponen a la enfermedad, lo que alienta la investigación de una probable vacuna para su empleo también en seres humanos.¹⁶⁵

Chapman y cols.³⁶ han creado una sonda de DNA específica de especie que diferencia los huevos de *T. solium* de los de *T. saginata*. Estos autores describen el aislamiento y la caracterización de clones recombinantes que contienen secuencias repetitivas de DNA (una secuencia de 158 pb) para *T. solium* y una secuencia no relacionada de *T. saginata* que codifica una porción del gen de la citocromo *c* oxidasa I mitocondrial, cada una hibrida específicamente con DNA genómico de cualquiera de las especies. Cuando esta sonda esté al alcance en el comercio, existirá la posibilidad de realizar una prueba diagnóstica rápida, sensible y no invasiva para la detección de huevos de *T. solium*. Por medio de los CDC se dispone de pruebas serológicas de hemaglutinación indirecta para la confirmación del diagnóstico de cisticercosis en casos de sospecha. Los títulos de 1:64 o mayores suelen indicar infección activa.

Diphyllobothrium latum: tenia gigante de los peces

D. latum, la tenia gigante de los peces, utiliza dos huéspedes intermediarios en el desarrollo de sus formas larvarias. Las áreas endémicas incluyen las regiones de los lagos claros y fríos de Escandinavia, norte de Europa, norte de Japón, región superior del Oeste Medio de los Estados Unidos, Canadá y Alaska. La figura 22-13 es una ilustración del ciclo vital.

Las manifestaciones clínicas de la difilobotriasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-10.

Identificación por el laboratorio

Parásito adulto

Aunque los proglótidos rara vez se eliminan por las heces, son característicos.

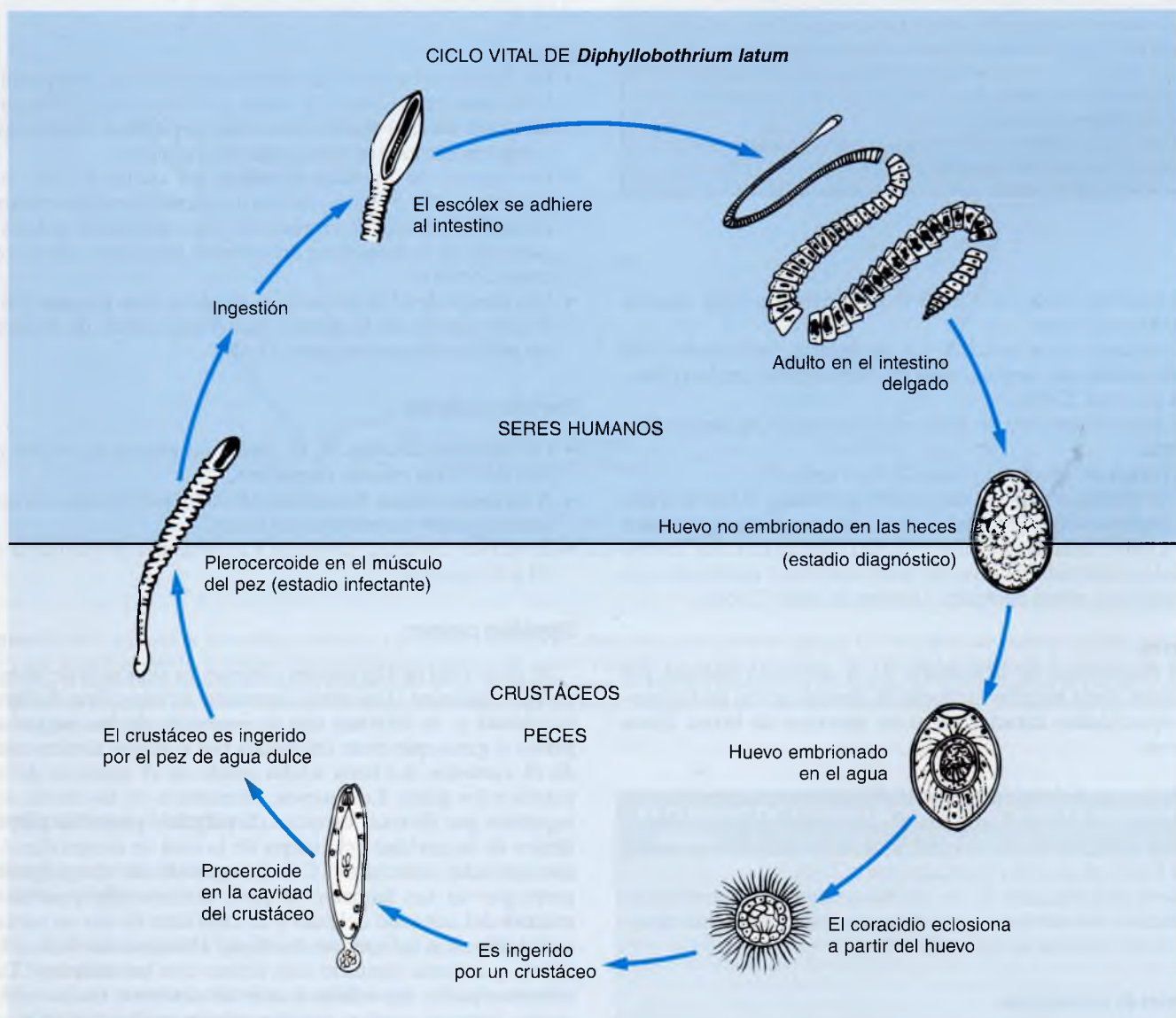


Figura 22-13 El ciclo vital de *Diphyllobothrium latum* comprende dos huéspedes intermediarios. Los huevos no embrionados son eliminados con las heces provenientes de un ser humano infectado en un estuario de agua dulce, sufren la embriogénesis durante un período de varios días y eclosionan liberando un coracidio de vida acuática. A su vez, estos coracidios son ingeridos por crustáceos (copépodos o *Cyclops*), en cuyo interior se desarrollan las larvas procercoide. Los copépodos constituyen una de las principales fuentes de alimentos para una diversidad de peces de agua dulce en Norteamérica. Tras la ingestión del copépodo por el pez, se desarrollan las larvas plerocercoides del parásito (esparzano) dentro de la carne del pez. Los seres humanos ingieren estas larvas plerocercoides en pescados crudos o deficientemente cocidos donde evolucionan a parásitos adultos en el intestino. Con la maduración, los huevos del parásito adulto son eliminados por las heces para completar el ciclo vital.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-10 Difilobotriasis

Los pacientes pueden albergar el parásito adulto hasta 20 años. Los síntomas intestinales son mínimos. Los parásitos adultos grandes pueden causar obstrucción intestinal mecánica, acompañada por dolor abdominal y diarrea. En una minoría de pacientes infectados por *D. latum*, en especial en el norte de Europa y específicamente en Finlandia, no es infrecuente la anemia megaloblástica secundaria a la deficiencia de vitamina B12 por competición selectiva del parásito por esta vitamina esencial.

Los seres humanos también pueden infectarse por las larvas plerocercoides de las tenias difilobotrioides estrechamente relacionadas con *D. latum*, que causa una infección conocida como esparganosis. Los parásitos adultos se encuentran en perros y gatos; la forma larvaria se desarrolla en los seres humanos tras la ingestión de copépodos o carne cruda de anfibios y reptiles infectados por la larva. Las larvas plerocercoides (espargano) se desarrollan en nódulos pruriginosos en los tejidos subcutáneos en un período de meses. La eosinofilia de sangre periférica es un indicio inespecífico de la posibilidad de esparganosis; sin embargo, las larvas características deben demostrarse en los nódulos subcutáneos antes de realizar un diagnóstico definitivo.

Una única dosis de 2 g de niclosamida o hasta 10 mg/kg de praziquantel son los regímenes terapéuticos de elección.

- El estróbilo mide de 3 a 10 m de longitud y tiene más de 3 000 proglótides.
- De manera característica, los segmentos individuales son más anchos que largos (*latum* en latín significa ancho) (lámina en color 22-6I).
- El escólex rara vez se aísla en las muestras de heces. Presenta:
 - Forma de almendra y mide 2-3 × 1 mm.
 - Se distingue por sus dos surcos profundos dorsoventrales (*bothria* = fosa [botrios], demarcados por pliegues similares a labios laterales (*phyllon* = hojas) (lámina en color 22-6J).
- Cada proglótide incluye un útero enrollado indefinido que forma una roseta compacta (lámina en color 22-6K).

Huevos

El diagnóstico de laboratorio de la infección humana por *D. latum* suele hacerse mediante la identificación de los huevos operculados característicos en muestras de heces. Estos huevos:

- Miden alrededor de 55-75 × 40-55 µm y son alargados.
- Tienen una cáscara lisa con un opérculo no prominente y poco evidente en un extremo y un engrosamiento en forma de botón en el otro (lámina en color 22-6L).
- Puede diferenciarse de los de *Paragonimus westermani* (se describe más adelante), que tiene un opérculo saliente característico (lámina en color 22-7P).

Especies de *Hymenolepis*

Hymenolepis nana, conocida como tenia enana, tiene distribución mundial y es una de las causas más graves de infecciones por cestodos en los seres humanos, en especial en los niños. Por el contrario, *Hymenolepis diminuta* es sobre todo un parásito de las ratas y los ratones y se lo encuentra con poca frecuencia en los seres humanos. Varias especies de artrópodos

(p. ej., gorgojos), que albergan las formas larvarias infectantes, pueden actuar como huéspedes intermediarios. En la lámina en color 22-6F se ilustra una fotografía de un cisticerco de *Hymenolepis* como aparece dentro del insecto. Los seres humanos se infectan a través de la ingestión de estos insectos infectados con las larvas. Este huésped intermediario no es imprescindible para la transmisión interhumana de *Hymenolepis nana*. Es más común que los seres humanos se infecten por la ingestión de alimentos o agua contaminada con huéspedes de *Hymenolepis*. En la figura 22-14 se ilustra el ciclo vital de *Hymenolepis diminuta*.

Las manifestaciones clínicas de himenolepiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-11.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *Hymenolepis* suele realizarse mediante la detección microscópica de los huevos característicos en fresco o en frotis teñidos de muestras fecales.

Huevos

- Los huevos presentan una morfología distintiva que permite la diferenciación entre *H. nana* y *H. diminuta*. Cada uno tiene una cáscara externa lisa y una membrana interna, que contienen el embrión hexacanto (seis ganchos).
- Los huevos de *H. nana* presentan un contorno oval, son pequeños (47 × 57 µm) y tienen un par de filamentos polares característicos que se originan de engrosamientos polares a cada lado de la membrana del embrión hexacanto (lámina en color 22-6M).
- Los huevos de *H. diminuta* son esféricos, más grandes (58 × 86 µm) que los de *H. nana* y están desprovistos de filamentos polares (lámina en color 22-6N).

Parásitos adultos

- Los parásitos adultos de *H. nana* son pequeños, miden no más de 3,7 cm cuando es maduro.
- A menudo simulan filamentos de moco; por lo tanto, no suelen observarse en muestras de heces.
- El escólex diminuto sobresale y es armado con una hilera de 20 a 30 ganchos.

Dipylidium caninum

El ciclo vital de *Dipylidium caninum* es similar al de *Hymenolepis diminuta*. Los seres humanos actúan como huésped accidental y se infectan tras la ingestión de las pulgas de perros o gatos que están infectadas por la forma cisticercoide de *D. caninum*. La tenia adulta reside en el intestino de los perros o los gatos. Los huevos, eliminados en las heces, son ingeridos por diversas especies de pulgas o piojos de perros, dentro de la cavidad del cuerpo de la cual se desarrollan los cisticercoides infectantes. Con la ingestión de una pulga del perro por un ser humano, la larva cisticercoide penetra la mucosa del intestino delgado y se convierte in situ en parásitos adultos. Las infecciones humanas afectan sobre todo a los niños, que tienen contacto más íntimo con las mascotas. Los síntomas suelen ser mínimos o están ausentes. En las infecciones intensas pueden experimentarse grados variables de trastornos de la digestión, pérdida del apetito y sensación vaga de malestar abdominal.

El praziquantel es el tratamiento de elección; la niclosamida también es eficaz. La infección humana puede prevenirse manteniendo sin tenias ni pulgas a los perros y los gatos que son mascotas de las casas.

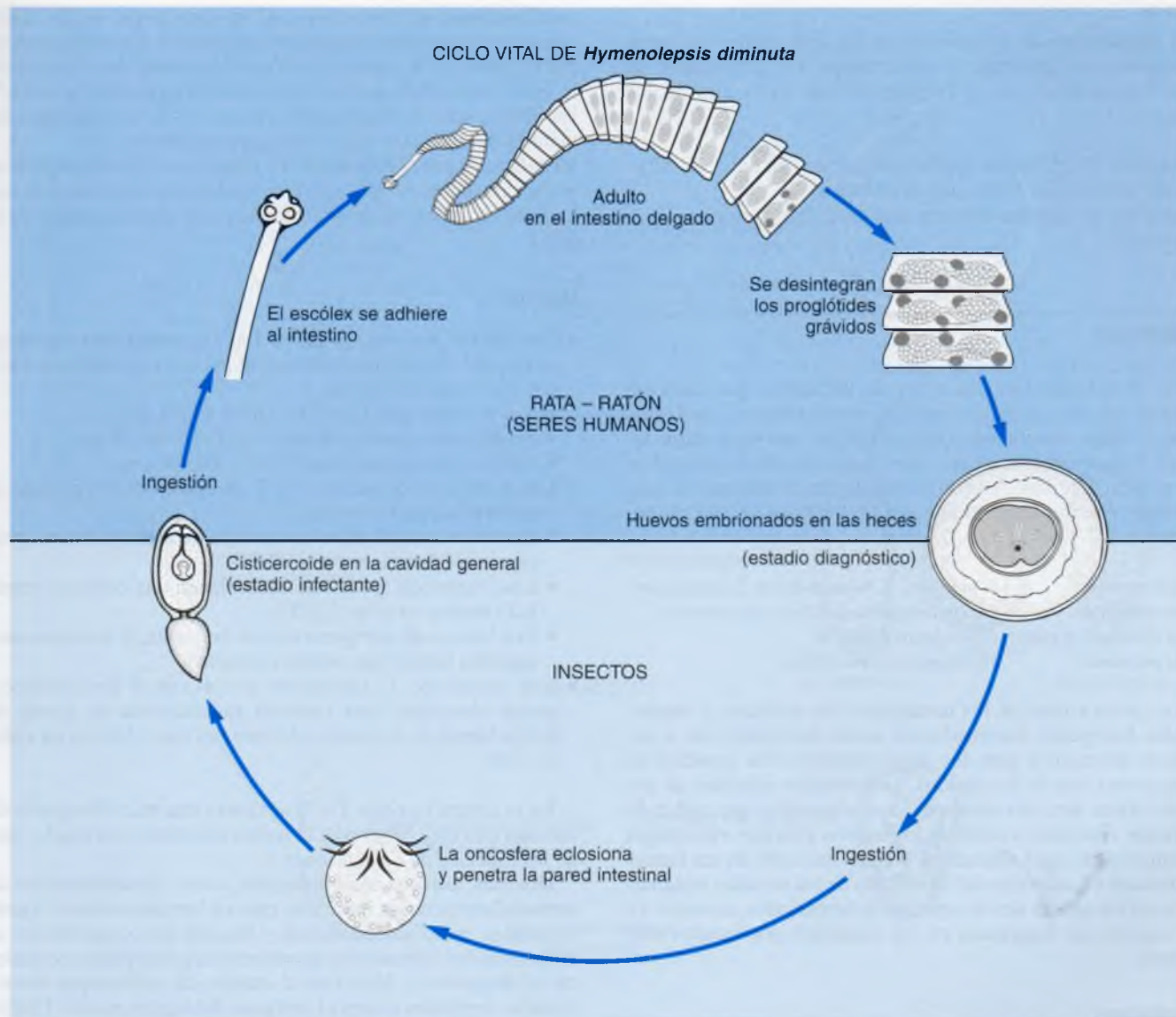
CICLO VITAL DE *Hymenolepis diminuta*

Figura 22-14 Ciclo vital de *Hymenolepis diminuta*. Los huevos embrionados, eliminados en el suelo o el agua por las heces de un ser humano infectado son ingeridos a su vez por un insecto. Eclosiona una oncosfera en el intestino del insecto y penetra por la pared intestinal. En la cavidad se desarrolla el cisticercoide infectante. Con la ingestión accidental del insecto infectado por un ser humano las larvas se liberan y penetran las vellosidades de la parte superior del intestino delgado. El escólex se adhiere a la mucosa intestinal, donde se desarrolla el parásito adulto. Cuando madura, libera huevos embrionados de los proglótidos grávidos y se eliminan por las heces para completar el ciclo vital.

Identificación por el laboratorio

Huevos (paquetes de huevos)
Parásito adulto

- El estróbilo varía de 15 a 70 cm de longitud y tiene de 60 a 175 proglótidos.
- El escólex presenta una forma romboidal, con un rostelo cónico, retráctil y armado.
- El proglótide mide de $12 \times 2,7$ mm y se caracteriza por tener doble polo genital (*Dipylidium*) (lámina en color 22-600).
- El proglótide puede separarse del estróbilo y migrar sólo o como cadenas cortas desde el ano de gatos y perros, lo que da el aspecto de granos de arroz diminutos cuando se depositan en el suelo.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-11 Himenolepiasis

A diferencia de lo que sucede en las infecciones por las especies de *Taenia* y *Diphyllobothrium*, en las cuales lo más habitual es que sólo un parásito habite el intestino, puede haber hasta 1 000 *H. nana*. Los síntomas en las infecciones leves pueden estar ausentes o limitados a un dolor abdominal bajo difuso y heces blandas. En las infecciones intensas puede observarse anorexia, dolor abdominal, diarrea, cefalea, nerviosismo y prurito. La eosinofilia periférica es leve a moderada (4-16%). La autoinfección, en las cuales los huevos eclosionan en el intestino y reinfectan por medio del ciclo de vida normal descrito en el texto, puede producir una enorme carga de parásitos que pueden causar complicaciones graves en los pacientes inmunosuprimidos.

El tratamiento de elección es niclosamida, 2 g por día durante 7 días en los adultos, y 1 g de dosis inicial, seguida de 500 mg por día durante 6 días en los niños.

Huevos

El diagnóstico de laboratorio en las infecciones humanas suele realizarse mediante la observación de los paquetes de huevos característicos en la microscopía, cada uno de los cuales:

- Contiene 15-25 huevos globulares (lámina en color 22-6P).
- Cada huevo mide 35-60 μm de diámetro.
- Cada huevo también contiene una oncosfera con seis ganchos.

Trematodos

Los trematodos son una clase de helmintos que incluyen aquellos que son parásitos para los seres humanos. Presentan forma de hoja, son planos y hermafroditas, salvo los esquistosomas y tienen dos ventosas: una oral, a través de la cual se abre el tubo digestivo, y la otra ventral, para la adherencia. Los trematodos de importancia humana presentados en este capítulo son:

Esquistosomas:	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i>
Duelas hepáticas:	<i>Fasciola hepatica</i> y <i>Clonorchis sinensis</i>
Duela intestinal gigante:	<i>Fasciolopsis buski</i>
Duela pulmonar:	<i>Paragonimus westermani</i>

Los ciclos vitales de los trematodos son similares y requieren dos huéspedes intermediarios antes de evolucionar a los estadios infectantes para los seres humanos (las especies de *Schistosoma* son la excepción). Los estadios iniciales de los ciclos vitales son casi idénticos, con miracidios que nadan libremente, liberados a partir de los huevos grávidos eliminados en estuarios de agua adecuados con las heces de un ser humano infectado. Las etapas del desarrollo de los estadios restantes en los ciclos vitales de las especies de trematodos incluidos en este capítulo se diagraman en los esquemas presentados más adelante.

Esquistosomas

El nombre *esquistosoma* proviene del aspecto del parásito macho adulto, cuyo cuerpo presenta un surco genital longitudinal, o canal, que actúa como receptáculo para la hembra durante la copulación (lámina en color 22-7A). La mayoría de las infecciones humanas están causadas por tres especies de *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*; *S. mekongi*, que se asemeja a *S. japonicum* y *S. intercalatum*, con huevos que se parecen a los de *S. haematobium*, pero con la enfermedad clínica que simula la infección por *S. mansoni*, son otras dos especies con distribuciones geográficas en la cuenca del Mekong y en el centro y oeste de África, respectivamente.²⁶¹ El ciclo vital es similar al de los otros trematodos, salvo que no se requiere un segundo huésped intermediario para transmitir la enfermedad. En la figura 22-15 se ilustra el ciclo vital de *Schistosoma*.

De acuerdo con la especie, los esquistosomas adultos pueden estar en diversas localizaciones en el sistema venoso portal: 1) en las venas porta del intestino grueso para *S. mansoni* y *S. intercalatum*, 2) en el intestino delgado para *S. japonicum* y *S. mekongi* y 3) en las venas de la vejiga en el caso de *S. haematobium*. Aunque los parásitos adultos, que miden cerca de 2,5 a 3 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro cuando están maduros,

pueden causar la obstrucción de la vena porta en los sitios donde residen, la enfermedad se origina con mayor frecuencia por el daño tisular extenso como consecuencia del depósito de la gran cantidad de huevos que la hembra produce por día.²⁶¹ En el recuadro de correlación clínica 22-12 se muestran las manifestaciones clínicas de la esquistosomiasis.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la detección de los huevos característicos en las heces o, en casos de infecciones por *S. haematobium*, en la orina.

Huevos

- Los huevos son muy grandes. Las siguientes son las variaciones del tamaño de cada una de las tres especies que afectan a los seres humanos:
 - *Schistosoma mansoni*: 116-180 $\times$ 45-58 μm
 - *Schistosoma haematobium*: 112-180 $\times$ 40-70 μm
 - *Schistosoma japonicum*: 75-90 $\times$ 60-68 μm
- Los huevos de *S. mansoni* y *S. haematobium* presentan la característica de ser ovales.
 - Los huevos de *S. mansoni* tienen una espícula lateral prominente (lámina en color 22-7B).
 - Los huevos de *S. haematobium* tienen una espícula terminal (lámina en color 22-7C).
 - Los huevos de la especie menos frecuente, *S. intercalatum*, también tienen una espícula terminal.
- Los huevos de *S. japonicum* son ovales a semiesféricos; puede observarse una espícula rudimentaria en forma de botón lateral si se corrige el plano del foco (lámina en color 22-7D).

En la lámina en color 22-7E se ilustra una microfotografía de cercaria con cola bifurcada, la forma infectante en el ciclo vital de las especies de *Schistosoma*.

Diversas técnicas inmunológicas, como procedimientos de inmunofluorescencia indirecta, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas, radioinmunoanálisis y fijación del complemento se utilizan en los laboratorios de referencia para ayudar a establecer el diagnóstico. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales formados contra el antígeno del tegumento de 15 kDa de parásitos adultos *S. mansoni*, Da Silva y cols.⁵³ desarrollaron un ensayo competitivo inmunosorbente ligado a enzimas con una sensibilidad del 94% para la detección de anticuerpos contra *S. mansoni* en pacientes infectados. De Jonge y cols.⁶² efectuaron importantes investigaciones en la década pasada sobre serodiagnóstico de la esquistosomiasis, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales biotinilados para detectar antígenos anódicos y catódicos en el suero de pacientes infectados por *S. mansoni*. Van Etten y cols.²⁶⁸ informaron una sensibilidad del 95,5% y una especificidad del 96,7% en la detección de antígeno catódico circulante del esquistosoma en la orina de pacientes infectados por *S. mansoni*, mediante una tira reactiva de nitrocelulosa o de polivinilo recubierta con anticuerpos monoclonales. Esta tira pretende ser de valor en el diagnóstico cualitativo de las infecciones por *S. mansoni* en los programas de control.

Fasciola hepatica y *Fasciolopsis buski*

La fascioliasis es una causa importante de enfermedad parasitaria zoonótica hepática en las ovejas. Por otra parte, los parásitos adultos de *Fasciolopsis buski* permanecen en el intestino, donde se adhieren a la mucosa del duodeno y del ye-

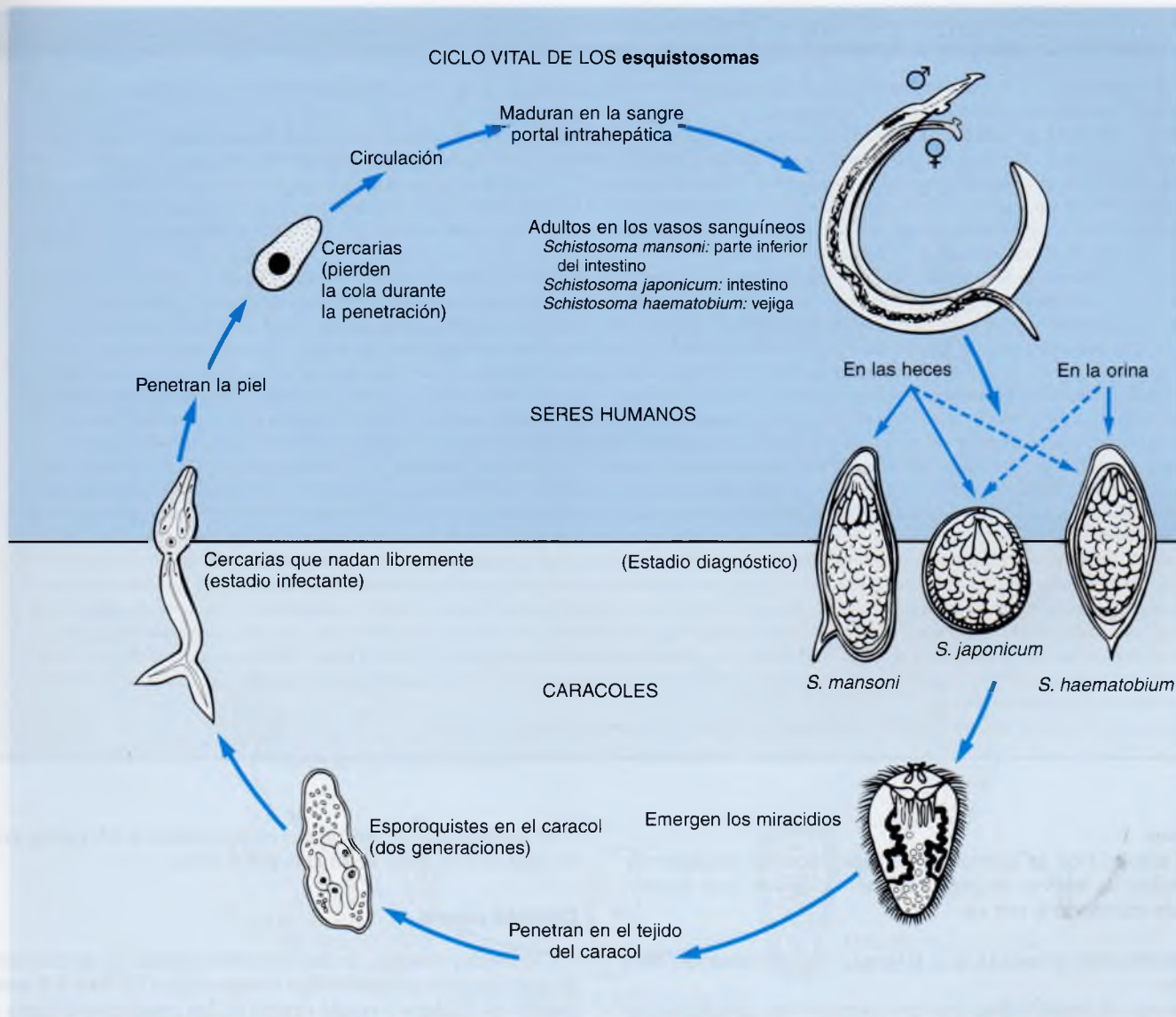


Figura 22-15 Ciclo vital de los esquistosomas. Los huevos eliminados por las heces en los lagos, canales y lagunas de agua dulce eclosionan en condiciones adecuadas y liberan el miracidio que nada libremente. El miracidio penetra los tejidos de caracol específico de especie apropiado, dentro del cual madura y sufre la división para formar cientos de cercarias. Las cercarias que nadan libremente, liberadas por los caracoles infectados, pueden penetrar de modo directo la piel macedurada por el agua de los nadadores y de los que caminan desprevenidos en estuarios de agua dulce. Una vez en los tejidos subcutáneos, las cabezas de las cercarias ingresan en la circulación y migran al sistema venoso portal, donde se desarrollan a parásitos adultos machos y hembras. Las hembras, que ocupan el canal ginecóforo de los machos, producen una miríada de huevos que se liberan en un estuario acuático adecuado para completar el ciclo vital.

yuno. Otros herbívoros, como ciervos, conejos, vacas, cabras, cerdos y caballos, entre otros, también pueden infectarse. Las duelas pueden permanecer en los conductos biliares durante muchos años y causar gran daño por irritación mecánica en los sitios de invasión local y la producción de derivados tóxicos. *Fasciola hepatica* y *Fasciolopsis buski* son las dos especies de trematodos más frecuentes y, salvo por el hábitat final de los parásitos adultos, sus ciclos vitales son iguales. Ambos ciclos vitales son algo complejos y requieren dos huéspedes intermediarios. En la figura 22-16 se ilustra el ciclo vital de *Fasciola hepatica*.

Las manifestaciones clínicas de fascioliasis y fasciolopsiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-13.

Identificación por el laboratorio

Duela adulta

Las duelas adultas se observan sólo si se extirpan en la cirugía. Pueden reconocerse por:

- *F. hepatica* adulta, que mide 20-30 × 8-13 mm, presenta un aspecto de hoja aplanada, con una protrusión anterior con forma de cono (lámina en color 22-7F); las duelas adultas de *F. buski* tienen un extremo cefálico redondeado (lámina en color 22-7G).
- Cada duela adulta presenta una ventosa anterior y una ventral y son hermafroditas, con un útero convoluto en la parte anterior.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-12 Esquistosomiasis

Davis⁵⁷ ha dividido las manifestaciones clínicas de la esquistosomiasis en cuatro estadios separados, con síntomas que a menudo se superponen en individuos que están constantemente reexpuestos a la infección.

Estadio 1: "Prurito del nadador". La invasión temprana por las cercarias causa una sensación de picazón o prurito de la piel afectada. En los individuos no inmunes pueden observarse reacciones cutáneas, que varían de Petequias diminutas a una erupción papular pruriginosa. Los signos y los síntomas de estas erupciones suelen ser más intensos en las reacciones frente a las cercarias de los esquistosomas no humanos (aves). Davis-Reed y Theis⁵⁹ publicaron un caso de infección cutánea por *Schistosoma haematobium* que apareció como la única manifestación clínica 3 años después de la exposición. Estos autores aconsejan que los dermatólogos tengan en cuenta la esquistosomiasis en los pacientes que presentan lesiones cutáneas no habituales, en especial con antecedentes de viajes a regiones endémicas.

Estadio 2: Síndrome de Katayama. Durante el segundo estadio, o maduración, durante el cual los esquistosomas están migrando a sus sitios anatómicos preferidos y se aparean antes de la postura de los huevos, los síntomas pueden ser mínimos o constituyen el denominado síndrome de Katayama, caracterizado por grados variables y combinaciones de fiebre, malestar general, dolor de espalda, artralgias, anorexia, tos, cefalea y toxemia. Puede detectarse hepatoesplenomegalia leve y la eosinofilia en sangre periférica puede ser importante. Como en este estadio los huevos a menudo aún no son excretados, el diagnóstico se basa en la obtención de antecedentes de exposición, la presencia de dermatitis típica y uno o más de los síntomas mencionados antes.

Estadio 3: Inflamación granulomatosa. El tercer estadio implica la reacción inflamatoria secundaria a la postura y la migración de los huevos en los tejidos. La postura de los huevos es de cerca de 300 por día por hembra de *S. haematobium* y *S. mansoni* y de 3 000 por día para *S. japonicum*. Después de invadir la pared de las venas en las cuales reside la hembra adulta, los huevos tienen una propensión a penetrar en el interior de la víscera adyacente donde desencadenan una inflamación granulomatosa supurativa intensa que causa fibrosis y cicatrización. El engrosamiento marcado de las paredes del intestino o de la vejiga, con pérdida de la función, produce diarrea sanguinolenta, dolor abdominal vago y, en casos graves, obstrucción intestinal en las infecciones por *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi*. *S. haematobium* causa inflamación de la vejiga, con hematuria intermitente, dolor abdominal bajo y, por último, contracción.

Estadio 4: Inflamación crónica. En el cuarto estadio de la enfermedad o estadio crónico, se produce una fibrosis progresiva apreciable alrededor de las áreas del granuloma, con una disminución marcada de la cantidad de huevos excretados. Los pacientes con infección crónica por *S. haematobium* presentan aumento persistente de la frecuencia urinaria y disuria, ya que la vejiga continúa contrayéndose y tienen un riesgo alto de carcinoma de vejiga. En el estadio tardío de las infecciones por *S. mansoni* la hepatoesplenomegalia, la cirrosis y la ascitis son complicaciones frecuentes cuando los huevos son transportados hacia las venas porta y se alojan en el hígado. También pueden observarse poliposis intestinal y masas inflamatorias en el colon que simulan el carcinoma de intestino. *S. japonicum* puede provocar síntomas similares; sin embargo, debido a su mayor capacidad de depositar huevos, la morbilidad puede ser mucho mayor.

El tratamiento recomendado es praziquantel, 20 mg/kg por vía oral en tres dosis separadas por 8 horas.

Huevos

El diagnóstico de laboratorio es más frecuente mediante la detección de huevos en preparaciones de heces. Los huevos pueden reconocerse por su:

- Tamaño muy grande (150 × 80 µm), ovoide y amarillo castaño.
- Cáscara delgada y lisa, con un opérculo sin características especiales en uno de los bordes estrechos (lámina en color 22-7H).
- División del material interno que está mal organizado y se extiende al borde de la cáscara sin dejar un espacio claro.

Como los huevos del parásito pueden diseminarse sólo después de 8 semanas o más de la infección o de modo intermitente más tarde, en los laboratorios de referencia se han utilizado las pruebas serológicas para el diagnóstico de fascioliasis. Espino y Finlay⁷⁷ desarrollaron un anticuerpo monoclonal a partir de antígenos excretorios-secretorios de *F. hepatica* y un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa para identificar el antígeno ES de *Fasciola* en muestras de heces. Estos autores indicaron que su prueba de detección de antígenos tiene ventajas sobre otros métodos para la detección de anticuerpos porque los títulos séricos pueden permanecer elevados incluso después de la curación. También citan ventajas para la detección de antígeno en muestras de heces con respecto al suero porque 1) evita el problema de la formación de inmunocomplejos que disminuye la tasa potencial de detección, 2) evita la venopunción en muchas regiones del mundo donde el procedimiento es inaceptable y 3) se logra una prueba disponible con facilidad para la curación.

El tratamiento recomendado es praziquantel, 25 mg/kg por vía oral en tres dosis separadas por 8 horas.

Clonorchis sinensis

Clonorchis sinensis, la duela hepática china, es un trematodo relativamente pequeño cuyo tamaño varía (12-20 × 3-5 mm) cuando es maduro y reside dentro de los conductos biliares o en la vesícula biliar de los seres humanos. El ciclo vital es similar al de *Fasciola hepatica*, salvo que su segundo huésped intermediario es un pez en lugar de las plantas acuáticas. Los seres humanos se infectan mediante la ingestión de carne cruda o poco cocida de diversos peces de agua dulce. En la figura 22-17 se muestra su ciclo vital.

El nombre del género (del griego *clon*, división y *orchis*, testículos) proviene del órgano testicular profusamente ramificado en el parásito adulto hermafrodita. La enfermedad es más frecuente en una amplia región del Lejano Oriente, en especial en Indochina, Japón, Corea, Formosa y sur de China. Las manifestaciones clínicas de la clonorchiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-14.

Identificación por el laboratorio

Duela adulta

- El parásito adulto es plano y blando, con un tamaño que varía de 12-20 × 3-5 mm.
- La cabeza, con forma de botella y saliente, se observa en el extremo cefálico (lámina en color 22-7I).
- Una ventosa anterior lleva a un esófago que se ramifica en un ciego que se extiende lateralmente hasta el extremo posterior (lámina en color 22-7J).

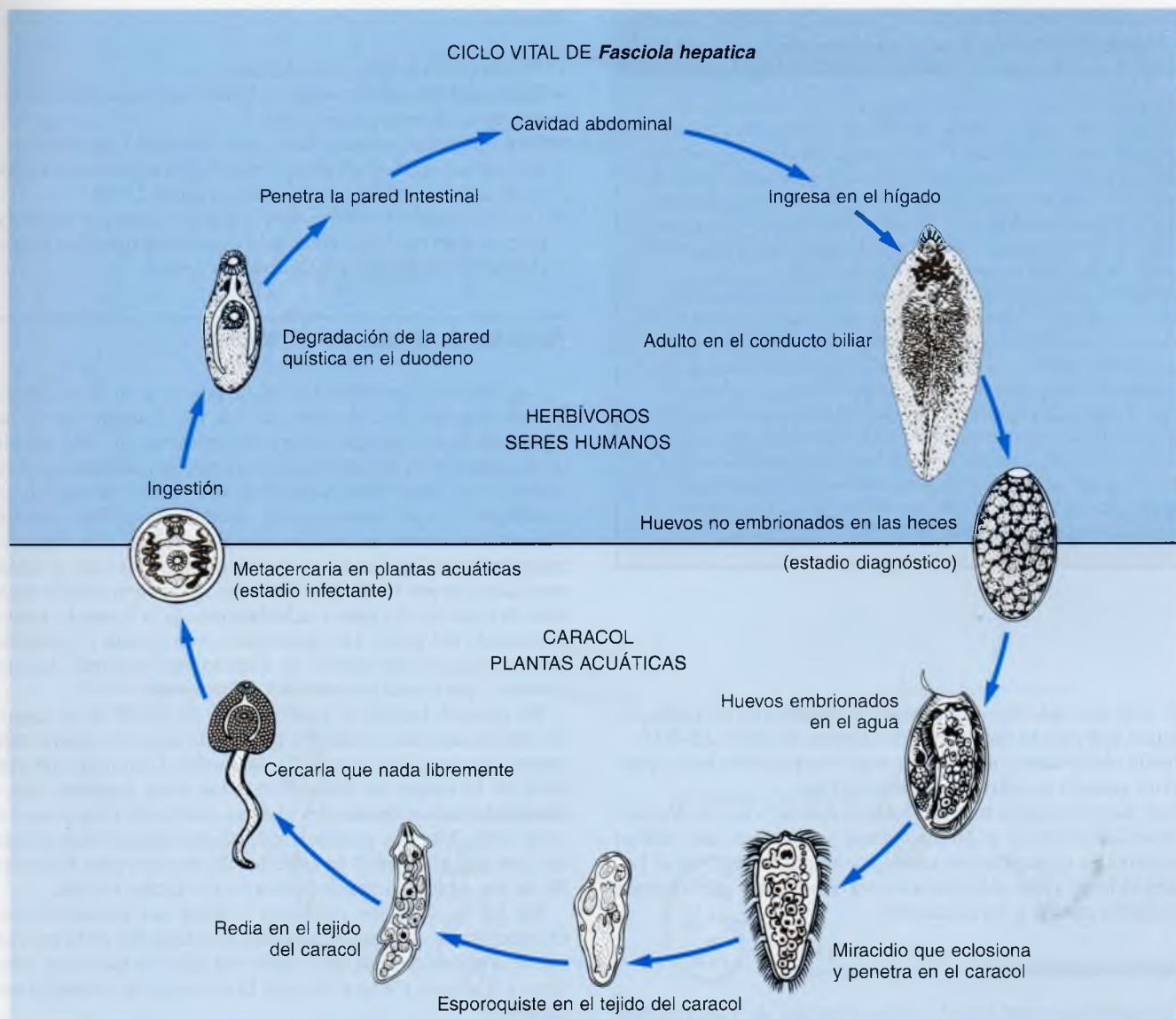


Figura 22-16 Ciclo vital de *Fasciola hepatica*. Con la eliminación de huevos maduros en canales, lagos y cursos de agua, los huevos embrionados eclosionan y liberan miracidios que nadan libremente. Después de la penetración en la carne de un caracol adecuado, se forman los esporoquistes en el tejido. Dentro del caracol se produce la maduración y la multiplicación en redias, lo que por último conduce a la liberación de cientos de cercarias que nadan libremente y que presentan cola recta. Las cercarias se adhieren a las plantas acuáticas y se enquistan como metacercarias infectantes. Los seres humanos se infectan por la ingestión de plantas acuáticas crudas o deficientemente cocidas infestadas por metacercarias. Tras la ingestión, se degrada la pared quística de las metacercarias en el duodeno del ser humano y se liberan las formas larvarias. Éstas invaden la pared intestinal, migran a la cavidad abdominal e ingresan en el hígado, donde evolucionan las duelas maduras en los conductos biliares. Estos trematodos son hermafroditas y liberan huevos en la luz de los conductos biliares. Los huevos a su vez son transportados hacia la luz intestinal, desde donde se eliminan por las heces para completar el ciclo vital.

- Una ventosa ventral se ubica justo anterior al útero enrollado de modo laxo (lámina en color 22-7K).
- Inmediatamente posterior al útero se encuentra el ovario conectado con conductos vitelinos delicados (lámina en color 22-7L).
- Testículos muy ramificados, de los cuales proviene el nombre del género, se extienden en la parte posterior del cuerpo (lámina en color 22-7M). En esta fotografía también se observa la terminación ciega del ciego y una vejiga excretora mal definida.

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la identificación de los huevos pequeños, con forma de urna característicos en muestras de heces.

Huevos

- El huevo típico es relativamente pequeño, con forma de urna y mide $27-35 \times 14-16 \mu\text{m}$.
- Se observa una pigmentación parda amarillenta por la tinción con bilis.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-13 Fascioliasis y fasciolopsiasis

Con la ingestión de hígado crudo de oveja o de cabra infectado por parásitos adolescentes, los trematodos pueden adherirse a la mucosa faríngea y causar laringofaringitis local, denominada *halzoun*. La fascioliasis humana se manifiesta por cefalea, escalofríos, fiebre y dolor en el hipocondrio derecho. En las infecciones graves puede haber hepatomegalia, ictericia, diarrea y anemia; la cirrosis biliar hepática es una complicación tardía. El régimen terapéutico recomendado es praziquantel, en dosis de 25 mg/kg tres veces por día durante 6 días.

F. buski es una duela similar a *F. hepatica*, salvo que es algo más grande (20-75 mm × 8-20 mm) y tiene una porción anterior redondeada en lugar de cónica (lámina en color 22-7G). Estos parásitos residen en el intestino delgado y se adhieren a la mucosa intestinal por medio de una pequeña ventosa oral. Las úlceras locales de la mucosa producen grados variables de epigastria, náuseas y diarrea, en especial por la mañana. En las infecciones con gran cantidad de parásitos puede observarse ascitis y obstrucción intestinal. El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la identificación de los huevos grandes en las heces, que presentan un aspecto idéntico a los de *F. hepatica*. El tratamiento recomendado es una dosis única de 25 mg/kg de praziquantel.

- El opérculo saliente, prominente y convexo es una característica útil para la identificación (lámina en color 22-7O).
- Puede observarse con el microscopio un pequeño botón posterior cuando se corrige el plano del foco.
- Este huevo presenta una morfología similar a los de *Heterophyes heterophyes* y *Metagonimus yokogawai*, dos duelas intestinales pequeñas que también son prevalentes en el Lejano Oriente y que infectan a los seres humanos que ingieren pescados crudos o en escabeche.

Paragonimus westermani

Paragonimus westermani y otras especies de *Paragonimus* son duelas pulmonares que causan enfermedad endémica en el oeste de África, el Oriente y ciertas regiones de América Central y del Sur. Los parásitos adultos miden de 8-16 × 4-8 mm y presentan una forma de cuchara, con un extremo contraído y el otro alargado. Las ventosas anterior y ventral tienen el mismo tamaño.

El ciclo vital de estos trematodos representa un ejemplo clásico de organotropismo; es decir, la afinidad especial que un parásito tiene para buscar y residir dentro de un órgano dado. Los seres humanos se infectan tras la ingestión de carne cruda o poco cocida de cangrejo o de langosta que contenga las metacercarias enquistadas. Tras la ingestión, la metacercaria eclosiona en el duodeno y libera las larvas que se adhieren a la mucosa duodenal. Las larvas penetran todo el espesor de la pared del intestino ingresan en la cavidad abdominal, atraviesan el diafragma, ingresan en el espacio pleural y llegan al tejido pulmonar periférico donde maduran. La figura 22-18 es una ilustración del ciclo vital.

Las manifestaciones clínicas de paragonimiasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-15.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio suele realizarse mediante la detección microscópica de los huevos característicos en preparaciones de heces.

Huevos

- Varían de 80 a 120 × 48 a 60 µm.
- Son amarillo castaño oscuro y tienen una cáscara lisa con un opérculo saliente prominente.
- Esta opérculo saliente sirve para distinguir los huevos de *Paragonimus* de los de *Diphylobothrium latum*, cuyo opérculo es liso y no sobresale (lámina en color 22-7P).
- Los huevos de *P. westermani* tampoco tienen la protrusión similar a un botón en el sentido opuesto al opérculo característica de los huevos de *Diphylobothrium*.

Parásitos de la sangre y los tejidos

Los parásitos encontrados en la sangre o en otros órganos suelen describirse separados de los que habitan en el tubo digestivo. Sin embargo, debe comprenderse que los parásitos de la sangre y los tejidos incluyen protozoos, nematodos y cestodos con diversas formas de sus ciclos vitales con morfologías similares a sus contrapartes intestinales. Por ejemplo, *Toxoplasma gondii* es un coccidio de los tejidos, los tripanosomas son hemoflagelados, las larvas migrans visceral y cutánea son causadas por las formas larvianas de los nematodos ascarídeos del perro y del gato y la hidatidosis es la forma larvaria de un cestodo del perro. Los plasmodios que causan el paludismo son esporozoos que tienen su contraparte intestinal, *Isospora hominis*, que puede encontrarse en las heces.

En general, los ciclos vitales de los parásitos de la sangre y los tejidos son más complejos que los de sus contrapartes intestinales, con estadios sexuales y asexuales. Casi todos los parásitos de la sangre se transmiten a los seres humanos por un artrópodo vector dentro del cual se realiza la fase sexual del ciclo vital. Muchos parásitos que causan infecciones tisulares utilizan una diversidad de especies de insectos para el desarrollo de los estadios intermediarios en sus ciclos vitales.

En los tejidos, los parásitos pueden ser intracelulares o extracelulares, según las especies y la fase del ciclo parasitario. A continuación se menciona una serie de parásitos hemáticos y tisulares como guía para la descripción posterior en el capítulo:

Protozoos tisulares

Paludismo:	<i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium vivax</i> <i>Plasmodium malariae</i> <i>Plasmodium ovale</i>
Babesias:	<i>Babesia microti</i>
Leishmaniasis:	<i>Leishmaniasis donovani</i> <i>Leishmaniasis tropica</i> <i>Leishmaniasis brasiliensis</i> <i>Leishmaniasis mexicana</i>
Trypanosomiasis	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Trypanosoma rangeli</i>

Filarias:

Wuchereria bancrofti
Brugia malayi
Loa loa
Mansonella ozzardi
Mansonella perstans
Onchocerca volvulus
Dirofilaria immitis

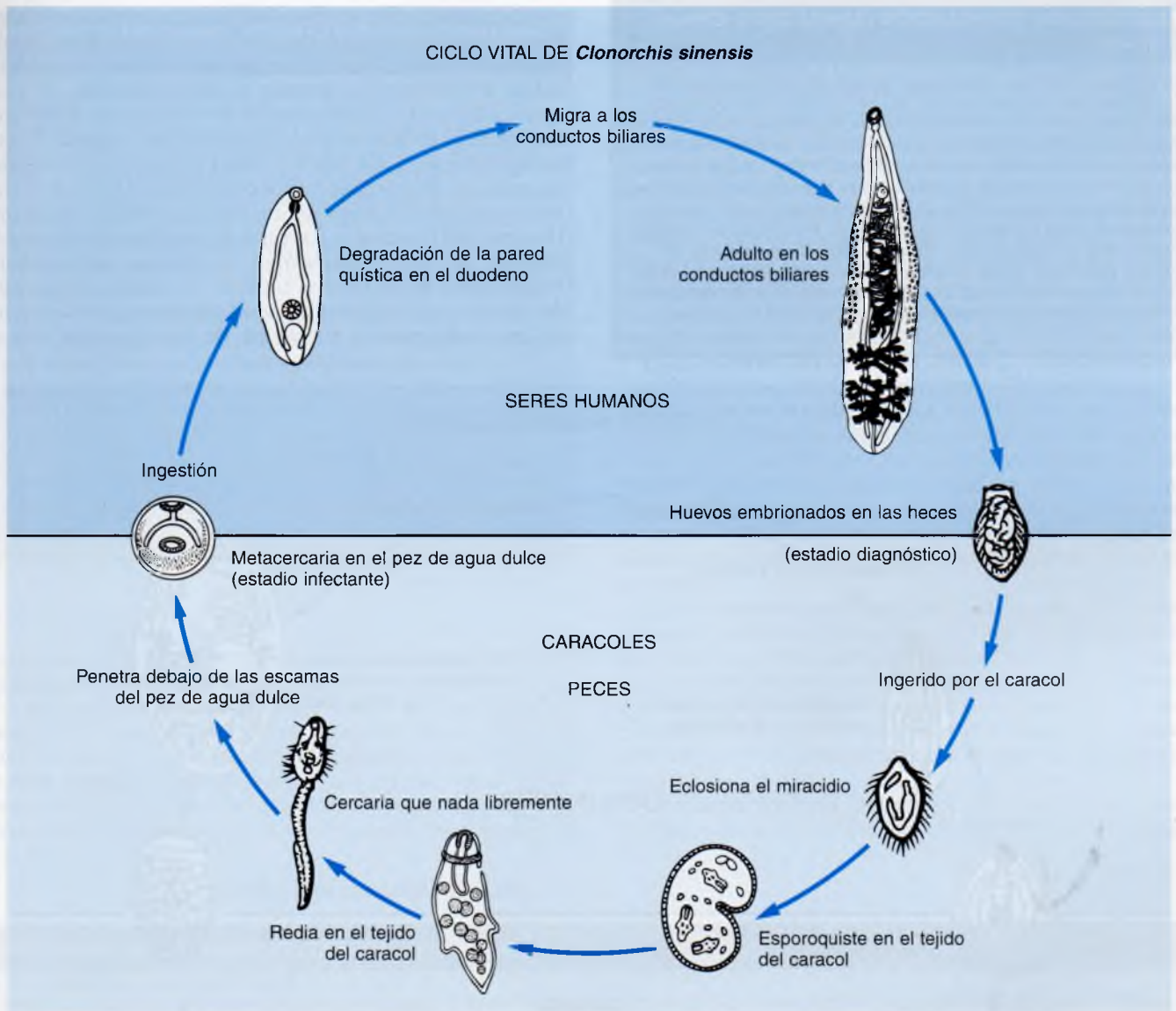


Figura 22-17 Ciclo vital de *Clonorchis sinensis*. Con la eliminación de los huevos maduros en canales, lagos y cursos de agua, los huevos embrionados eclosionan y liberan miracidios que nadan libremente. Éstos son ingeridos por un determinado tipo de caracol dentro del cual eclosionan y forman un esporoquiste en los tejidos. El esporoquiste a su vez madura en redia, dentro de la cual tienen lugar la maduración y la multiplicación, lo que conduce a la liberación de cientos de cercarias con cola recta que nadan libremente. Las cercarias se adhieren y penetran las escamas de diversas especies de peces de agua dulce y forman metacercarias. Los seres humanos se infectan a través de la ingestión de pescado crudo o poco cocido infestado con metacercarias. Luego de ingeridas, las metacercarias se exquistan en el duodeno y salen las larvas que migran a los conductos biliares. Estos trematodos son hermafroditas y liberan huevos en la luz de los conductos biliares. Los huevos, en cambio, son transportados al intestino y se eliminan a través de las heces, con lo que se completa el ciclo vital.

Coccidias tisulares: *Toxoplasma gondii*
Pneumocystis jirovecii

Nematodos tisulares: *Trichinella spiralis*
Toxocara canis (larva migrans visceral)
Ancylostoma braziliensis o *A. caninum* (larva migrans cutánea)
Dracunculus medinensis

Cestodos tisulares: Especies de *Anisakis*
Especies de *Gnathostoma*
Echinococcus granulosus
Echinococcus multilocularis
Especies de *Multiceps* (cenurosis)
Spirometra mansonioides (esparganosis)

Paludismo

En los Estados Unidos, la mayoría de los casos de paludismo se encuentran en viajeros, estudiantes nacidos en el extranjero o refugiados que han estado expuestos a los mosquitos en áreas endémicas. En 1980 se informaron 566 casos a los CDC, una incidencia del 243% mayor que los 165 casos informados en 1988.³¹ Aunque la mayoría de los pacientes con paludismo recientemente diagnosticado en los Estados Unidos nacieron en el extranjero o regresaron recientemente de regiones endémicas, los vectores del género *Anopheles* se encuentran en muchos sitios. Por ejemplo, se han informado casos inexplicables de paludismo en el condado de San Diego en California y

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-14 Clonorquiasis

En las infecciones leves, el daño de las células del parénquima hepático es mínimo y no se produce cirrosis. Al comienzo de la infección puede haber leucocitosis leve y eosinofilia. Aunque los conductos biliares en las infecciones humanas pueden engrosarse y dilatarse, en especial en los puntos donde los parásitos se adhieren al revestimiento interno, la obstrucción biliar y la ictericia son raras salvo en las infecciones extremadamente intensas (lámina en color 22-7N). En la mayoría de los casos, la enfermedad tiende a permanecer leve y crónica; los organismos persisten durante cuatro o cinco décadas y producen sólo síntomas menores de malestar abdominal, diarrea intermitente y dolor espontáneo o a la palpación del hígado. Una preocupación especial plantea el posible desarrollo de colangiocarcinoma en asociación con las infecciones crónicas por *Clonorchis*.^{241,245}

en el condado de Bay en Florida.¹⁰⁰ Ninguno de los individuos afectados refirió un viaje reciente al extranjero, transfusiones de sangre recientes o uso de drogas intravenosas. Sin embargo, habían frecuentado o acampado en áreas infestadas por mosquitos adyacentes a campamentos de trabajadores itinerantes. Los estudios epidemiológicos revelaron que ninguno de esos trabajadores tenía una historia clínica sugestiva de paludismo; sin embargo, el mosquito vector competente, *Anopheles hermsi*, se encontró a lo largo del río San Luis Rey en California. Hace poco se informaron dos casos de paludismo autóctono del condado de Suffolk, Nueva York, en personas que no habían viajado fuera de los Estados Unidos.³³ La conclusión del estudio de estos casos aislados es que el paludismo debe ser incluido en el diagnóstico diferencial de todo paciente con un

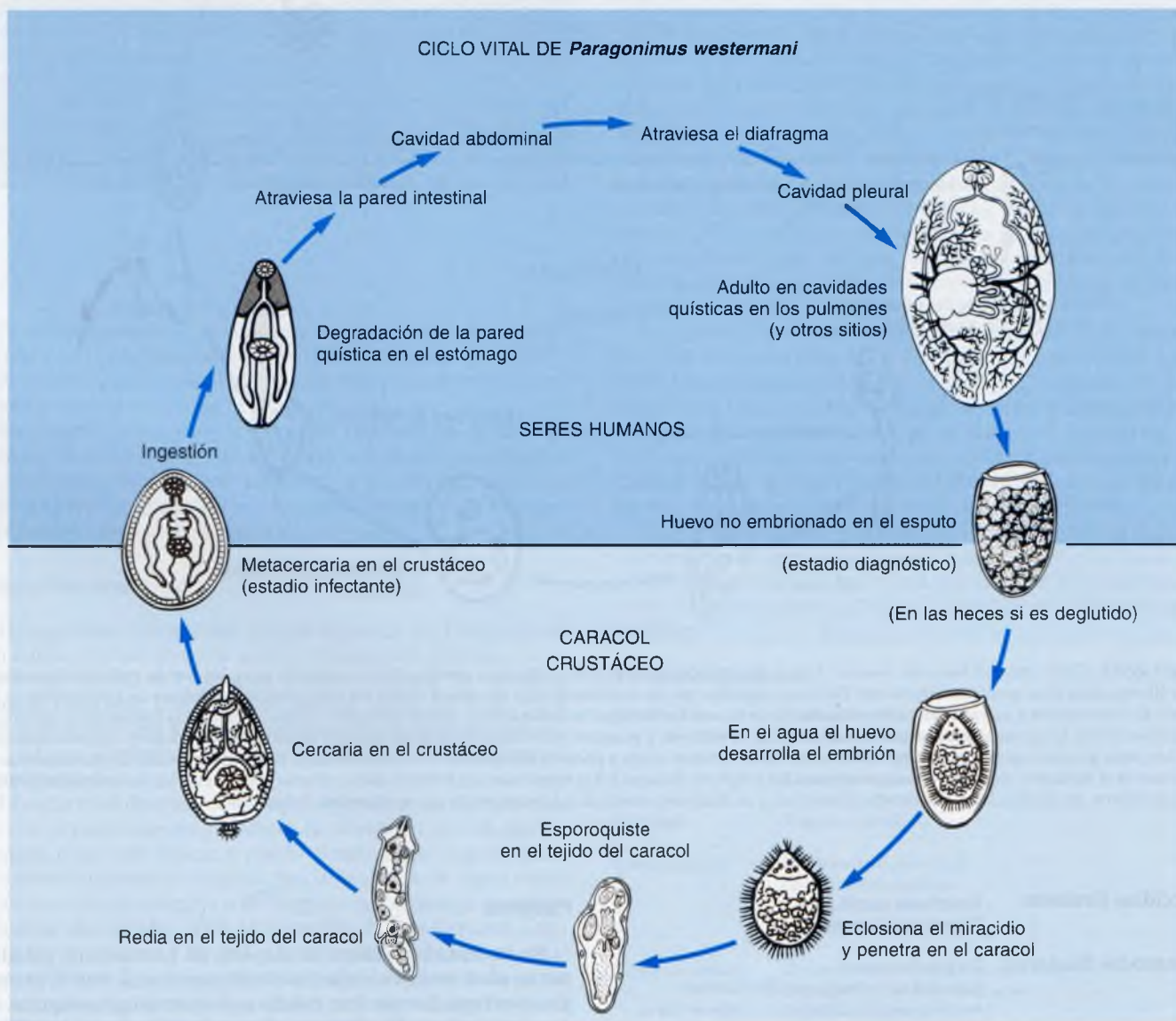


Figura 22-18 Ciclo vital de *Paragonimus westermani*. Los huevos no embrionados se eliminan al medio acuático ya sea por el esputo o por las heces o por ambos. Estos huevos se embrionan en el agua y liberan un miracidio que nada libremente y que penetra en los tejidos de un caracol específico de la especie. En éste, se desarrollan los esporoquistes y las redias en cuyo interior se multiplican las cercarias. Cuando maduran, las cercarias que nadan libremente salen del caracol y penetran en las branquias, los músculos o las vísceras de un crustáceo de agua dulce en cuyo interior se enquistan como metacercarias inactivas. Los seres humanos se infectan tras la ingestión de carne cruda o deficientemente cocida de cangrejo o de langosta que contenga la metacercaria enquistada. Tras la ingestión, la metacercaria eclosiona en el duodeno y libera las larvas que penetran todo el espesor de la pared intestinal, ingresan en la cavidad abdominal, atraviesan el diafragma e ingresan en espacio pleural. Las larvas llegan al tejido pulmonar periférico donde maduran en duelas adultas que residen dentro de quistes parabronquiales. Los huevos se liberan por el esputo, donde son expectorados o deglutidos para ser eliminados, por último, por las heces para completar el ciclo vital.

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-15 Paragonimiasis

Durante la fase migratoria del parásito pueden observarse escalofríos, fiebre y eosinofilia pronunciada. Con el tiempo, las duelas adultas llegan a residir dentro de un pseudoquiste pequeño en el tejido pulmonar. El quiste se agranda a medida que la duela adulta crece y puede abrirse camino al bronquiólo adyacente. Cuando el pseudoquiste se rompe en un bronquio, la tos y la hemoptisis son síntomas habituales. Los huevos producidos por las duelas maduras son eliminados en los bronquios y, por último, deglutidos por el paciente de las secreciones que llegan a la orofaringe por la tos.

La enfermedad tiende a ser crónica. Lo que conduce a grados variables de fibrosis y cicatrización pulmonares. El dolor torácico intermitente, la fiebre y los escalofríos pueden ser manifestaciones tardías. La paragonimiasis abdominal puede suceder si la duela permanece localizada en el abdomen. El dolor abdominal sordo y la diarrea sanguinolenta son los síntomas principales. Se han informado casos ocasionales de enfermedad cerebral, que debe diferenciarse de la hidatidosis; para el tratamiento se recomienda praziquantel, en dosis de 25 mg/kg tres veces por día durante 2 días, seguido de 30-50 mg/kg día por medio durante 10-15 días.

comienzo agudo de fiebre cíclica, aun cuando no existan antecedentes de viajes recientes al extranjero.

La prevalencia mundial de paludismo es de casi 100 millones: un millón de muertes por año suceden sólo en África. La mayoría de los casos afectan a refugiados, sobre todo del sudeste asiático. Por consiguiente, los médicos deben permanecer alertas a la posibilidad de paludismo en ciertos grupos de la población. Aunque se han realizado grandes progresos en su

eliminación de algunos sitios, el paludismo permanece en movimiento y la reaparición de la infección es una preocupación actual. Martens y Hall¹⁷⁹ atribuyen este resurgimiento a la reagrupación de personas de bajos recursos, que tienen más probabilidad de estar infectadas, provenientes de áreas endémicas, que viajan a regiones sin paludismo en busca de una vida mejor. Las manifestaciones clínicas del paludismo se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-16.

El ciclo vital del plasmodio tiene dos fases: un ciclo sexual, conocido como esporogonia, que transcurre dentro del tubo digestivo del mosquito, y un ciclo asexual, conocido como esquizogonia, que sucede en el huésped humano. El ciclo vital de *Plasmodium malariae*, como prototipo de todas las especies de paludismo, se muestra en la figura 22-19.

En el recuadro de correlación clínica 22-16 se presentan las manifestaciones clínicas del paludismo.

Identificación por el laboratorio. La identificación por el laboratorio de los parásitos del paludismo en los seres humanos, como ya se describió, se efectúa mediante la observación de frotis de gota fina y gruesa de sangre periférica. Estos frotis deben obtenerse en diferentes momentos del día de los pacientes en los que se sospecha la infección porque la parasitemia puede ser intermitente y la cantidad de parásitos circulantes puede variar.

Las tres especies de *Plasmodium* que con mayor frecuencia causan el paludismo humano son *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. Una cuarta especie, *Plasmodium ovale*, es rara en gran parte del mundo, pero relativamente común en el oeste de África. A continuación se describen las características diferenciales de las tres especies frecuentes. La morfología microscópica de las formas intraeritrocíticas se ilustra en la lámina en color 22-8.

La identificación por el laboratorio de las diversas especies de *Plasmodium* no es difícil si se sigue un enfoque ordenado

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-16 Paludismo

La fiebre es el síntoma de presentación constante de las infecciones por todas las especies de *Plasmodium*. Los picos de temperatura comienzan 7 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado del género *Anopheles* durante un período cuando los parásitos están sufriendo la multiplicación preeritrocítica en las células del hígado. Los síntomas prodrómicos de cefalea, mialgias, malestar general y fatiga son sugestivos de un síndrome gripal que puede experimentar durante este período. Sin embargo, una vez que una progenie de merozoítos abandona las células hepáticas e invade los eritrocitos, comienzan los ciclos de fiebre espaciados de modo regular. La periodicidad de cada acceso de fiebre elevada se relaciona con la rotura de eritrocitos a medida que los merozoítos se liberan a la circulación. Las designaciones de este ciclo de fiebre, paludismo "terciano", para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* y paludismo "cuartano" para *Plasmodium malariae* son algo confusas. Los picos de fiebre para el paludismo terciano suceden con una periodicidad de día por medio; sin embargo, como cualquier acceso febril se cuenta como día 1, el pico siguiente no sucederá hasta el tercer día (por eso terciano). De manera similar, los accesos febriles del paludismo cuartano suceden en un ciclo de un día cada tres; sin embargo, al contar el primer episodio como día 1, el próximo pico sucederá en el cuarto día. No obstante, estos patrones clásicos de fiebre pueden ser irregulares y no sirven para basar el diagnóstico presuntivo exclusivamente en ellos.

Cada acceso febril se caracteriza por un período corto de "frío" que dura alrededor de 1 hora, cuando la piel está fría, y los labios y los lechos ungueales aparecen cianóticos por la vasoconstricción periférica. Este período corto es seguido por el comienzo súbito del "período caliente", cuando la piel se siente calurosa y seca, y la fiebre asciende a 40.5-40.7 °C que dura de 3 a 6 horas. Los picos de fiebre suelen acompañarse por cefaleas, dolor de tórax y espalda, taquicardia, tos, vómitos y delirio de intensidad variable. Cada acceso febril es seguido por fatiga y sueño. Entre los accesos febriles, los pacientes suelen estar asintomáticos.

En grado variable se observa anemia hemolítica, esplenomegalia y hepatomegalia dolorosa. Los pacientes son muy susceptibles a la rotura del bazo y durante el examen físico debe evitarse la palpación profunda del hipocondrio y del flanco izquierdo. No hay linfadenopatía y si se observa aumento de tamaño de los ganglios linfáticos siempre indica otra enfermedad. De suma preocupación son las complicaciones del sistema nervioso central que pueden ser secundarias a las infecciones por *P. falciparum*. Los eritrocitos infectados por trofozoítos de *P. falciparum* sufren cambios de membrana en los cuales aparecen "bultos" sobre la superficie, que los torna "pegajosos" y se adhieren a los receptores específicos sobre el revestimiento de células endoteliales de los capilares.⁴⁰ La microcirculación del cerebro presenta una vulnerabilidad particular al bloqueo con eritrocitos infectados por *P. falciparum*, lo que produce pequeñas áreas de infarto cerebral y hemorragia.⁴ Puede haber alteraciones de la conciencia que varían de la somnolencia al coma, trastornos de la conducta, alucinaciones, convulsiones motoras y, en ocasiones, temblores, parálisis musculares focales y otros signos localizados. En los casos fulminantes puede haber un empeoramiento rápidamente progresivo que conduce a la muerte.

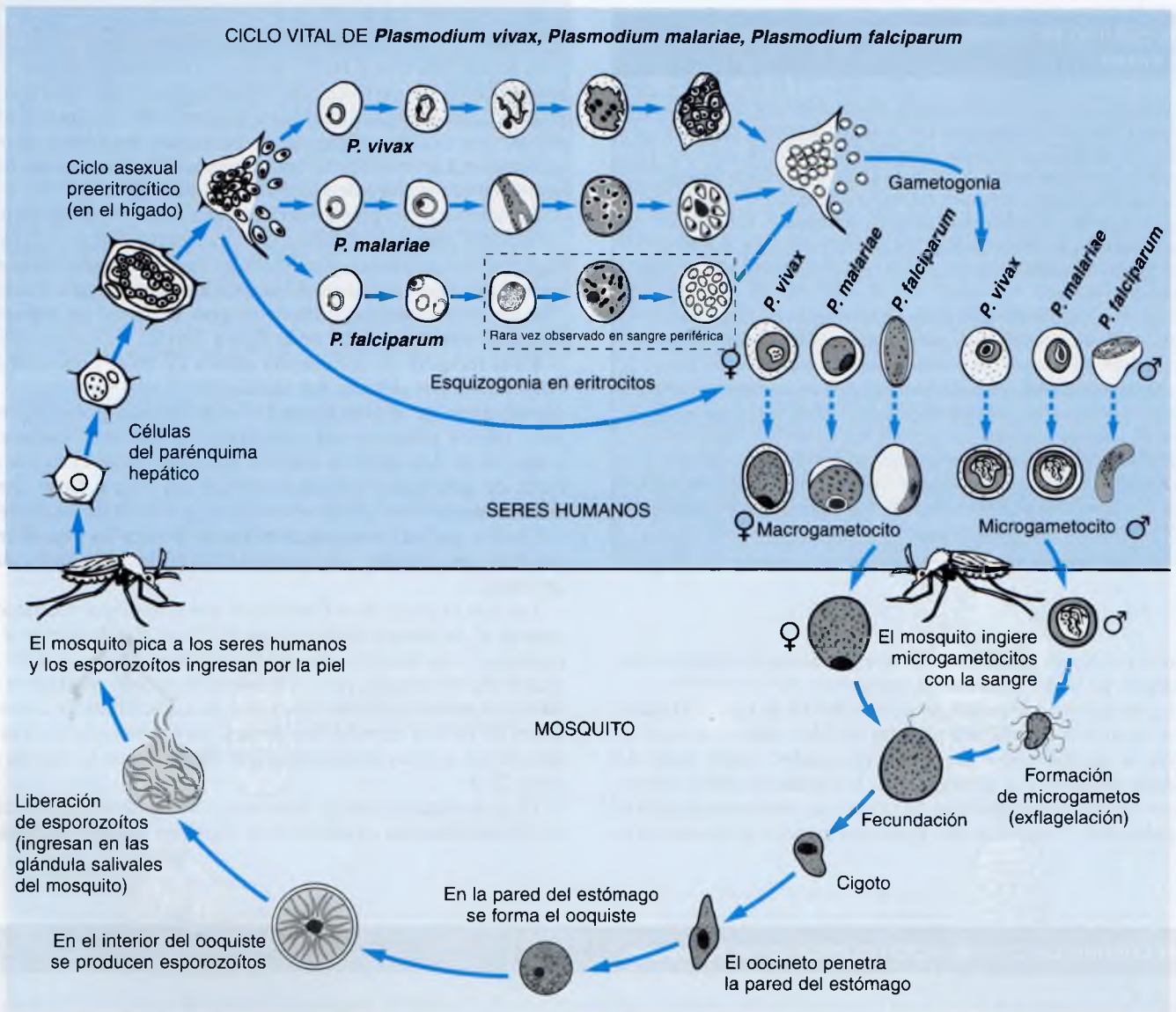


Figura 22-19 Ciclo vital de *Plasmodium malariae*. Tras producirse varios ciclos eritrocíticos, algunos de los merozoítos se transforman en las formas sexuales de macrogametocitos (hembras) y microgametocitos (machos). Cuando un mosquito no infectado por plasmodio pica a un ser humano infectado por paludismo, estos gametocitos son ingeridos junto con los eritrocitos infectados que contienen trofozoítos como parte de su alimentación con sangre. En el estómago del mosquito, los microgametocitos (machos) adoptan seis a ocho flagelos. Los microgametocitos penetran en los macrogametocitos hembra y producen cigotos fecundados. Estos cigotos penetran la pared del estómago del mosquito, donde los esporozoítos por último se rompen en la cavidad general y migran a las glándulas salivales. Cuando el mosquito pica a un nuevo huésped, los esporozoítos salen de las glándulas salivales y se inyectan a través de la proboscidea.

Los esporozoítos, la forma infectante para los seres humanos, se encuentran en las glándulas salivales de los mosquitos del género *Anopheles* hembra. La saliva que contienen los esporozoítos infecciosos es inyectada en el torrente circulatorio de los seres humanos a través de la proboscidea del mosquito. Después de circular en la sangre periférica durante 20-30 minutos, los esporozoítos ingresan en las células del parénquima hepático, donde comienzan a multiplicarse (etapa exoeritrocítica). Al cabo de 10 días, múltiples formas pequeñas, denominadas merozoítos, salen de los hepatocitos y se liberan a la circulación, donde buscan y penetran en los eritrocitos. En su interior (ciclo intraeritrocítico), tienen lugar una serie de etapas del desarrollo (lámina en color 22-8). Estos organismos evolucionan a una "forma anular" conocida como trofozoíto, el cual, según la especie, se agranda y divide en un estado conocido como esquizonte. Los segmentos individuales de los esquizontes son los merozoítos. Cuando maduran, los esquizontes rompen los eritrocitos y los merozoítos se liberan a la circulación. Estos merozoítos buscan entonces eritrocitos no infectados y el ciclo continúa.

basado en la observación de determinadas estructuras morfológicas. Es bastante importante que las infecciones por *P. falciparum* sean reconocidas lo antes posible, dado que la enfermedad puede tener una gravedad especial, con un progreso rápido a un desenlace mortal. Un enfoque del laboratorio sugerido para la identificación de las especies de *Plasmodium* es el siguiente:

1. **Primero, descartar *Plasmodium falciparum*.** Como se mencionó, esta especie es la más peligrosa y las infecciones deben diagnosticarse lo antes posible. Buscar en sangre periférica:
 - Formas anulares diminutas que ocupan menos de la tercera parte del diámetro del eritrocito (lámina en color 22-8A).

- A menudo se observan formas múltiples dentro de un eritrocito, con dos núcleos en el mismo anillo.
- Las infecciones pueden ser intensas y afectan al 20% o más de los eritrocitos, lo que indica una infección fulminante.
- Los anillos diminutos suelen ubicarse sobre la membrana celular del eritrocito, lo que se conoce como aspecto en “anillo de sello” (lámina en color 22-8B).
- En los frotis de sangre periférica teñidos rara vez se observan las formas anulares en desarrollo o los esquizontes. Las únicas formas que se observan, salvo en las infecciones fulminantes terminales, son las anulares tempranas y los gametocitos.
- La presencia de gametocitos en forma de banana o de media luna es diagnóstica (lámina en color 22-8C). Pueden estar ausentes en los estadios tempranos de infección y suelen aparecer sólo después de 7-10 días del comienzo de la fiebre.

2. Si lo anterior no se observa, a continuación se debe realizar la identificación objetiva de *Plasmodium vivax*. Buscar:

- Eritrocitos infectados con forma algo irregular, agrandados, pálidos y que contengan gránulos importantes de color rosado a rojo, denominados gránulos de Schüffner (lámina en color 22-8D).
- Puede haber formas anulares en todos los estadios del desarrollo.
- Los anillos jóvenes miden más de un tercio del diámetro del eritrocito infectado.
- A medida que los trofozoítos maduran, comienzan a llenar el eritrocito con un citoplasma que “fluye” o “ameboide”.
- La presencia de más de un núcleo en un trofozoíto indica la formación de una forma segmentada temprana, conocida como esquizonte. Los esquizontes de *P. vivax* están compuestos por 12 a 14 o más segmentos individuales denominados merozoítos (lámina en color 22-8E).
- Los gametocitos son grandes y circulares (Nota: cualquier célula con un núcleo único que ocupa más de la mitad del diámetro celular es un gametocito).
- Los trofozoítos siempre pueden diferenciarse de los gametocitos porque, en el momento que alcanzan el tamaño de la mitad del diámetro de la célula, debe observarse más de un segmento nuclear (lámina en color 22-8F).
- El pigmento palúdico en la forma de gránulos finos de color pardusco puede ser abundante tanto en el gametocito como en el esquizonte.

3. Aunque la identificación de *Plasmodium malariae* suele ser por exclusión tras haber descartado las características de *P. falciparum* y *P. vivax*, como ya se describió, observar las siguientes características por las cuales pueda realizarse la identificación objetiva:

- La presencia de trofozoítos en desarrollo que se extienden hasta los bordes de la membrana del eritrocito y adoptan la forma de “bandas” (lámina en color 22-8G).
- Los eritrocitos infectados no son alargados ni pálidos.
- Los gránulos de Schüffner están ausentes.
- Los esquizontes están compuestos por no más de 6-12 segmentos, con los segmentos nucleares que se disponen para formar una “roseta” (lámina en color 22-8H).
- El pigmento palúdico es abundante y más tosco (o incluso “voluminoso”) que el observado en *P. vivax*, a menudo condensado dentro del agujero del citoplasma que alberga el núcleo de los gametocitos.

- Los gametocitos están contenidos dentro de los eritrocitos de tamaño normal sin gránulos de Schüffner.

La identificación de las especies de *Plasmodium* no suele ser difícil si se aplican los principios mencionados. Sin embargo, se originan problemas en la interpretación de los frotis de sangre periférica en los pacientes que fueron tratados de modo parcial o inadecuado cuando puede haberse bloqueado la maduración normal de los parásitos y sólo se observan formas atípicas. El cuadro de sangre periférica también puede ser confuso si un individuo determinado se infecta por más de una especie de *Plasmodium*. En la década pasada se adelantó mucho en los aspectos moleculares de la infección palúdica. Estos avances, como el esclarecimiento de los genes *var* que codifican la proteína de membrana I del eritrocito de *Plasmodium falciparum*, y las proteínas codificadas rosetina y rifina sobre la superficie de los eritrocitos infectados, se revisan en la publicación de Chen y cols.³⁸

Los individuos que planean viajes a regiones del mundo endémicas para paludismo deben consultar con las autoridades de salud pública locales para asesorarse respecto de las medidas profilácticas y de protección. Las recomendaciones sobre la profilaxis son publicadas periódicamente por los CDC (www.cdc.gov). Para determinar el tipo de la profilaxis recomendable deberá considerarse si los lugares a donde se prevé viajar se asocian con un riesgo elevado de transmisión de paludismo resistente a la cloroquina, si la persona tuvo reacciones previas a los fármacos antipalúdicos y si se dispondrá con facilidad de atención médica. La profilaxis con cloroquina debe comenzar 1 a 2 semanas antes de realizar el viaje y se extiende durante 4 semanas después del regreso. En todas las regiones endémicas para paludismo se han encontrado cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina. Actualmente, la mefloquina ha reemplazado a los fármacos utilizados con anterioridad para la profilaxis del paludismo que han desarrollado resistencia del parásito. En una serie de ensayos clínicos, Croft y Garner⁴⁶ encontraron que la mefloquina previene el paludismo, aunque se están investigando los efectos adversos neuropsicológicos en pacientes ocasionales, así como los aspectos de la tolerabilidad.

Babesia

Persing y cols.²⁰⁹ examinaron el estado de las infecciones por *Babesia microti* en los Estados Unidos. *B. microti* causa la mayoría de las infecciones humanas en pacientes no esplenectomizados; *B. bovis* y *B. divergens* son otras especies que causan infecciones en personas esplenectomizadas. *B. microti* sigue de cerca a *Borrelia burgdorferi*, la espiroqueta que causa la enfermedad de Lyme, ya que ambos agentes tienen el ratón de patas blancas, *Peromyscus leucopus*, como el principal huésped reservorio. La mayoría de los brotes sucedieron en las regiones del noreste de los Estados Unidos, en especial en Connecticut, Isla de Nantucket, Long Island y Cape Cod. El vector predominante para ambos agentes es la garrapata *Ixodes dammini*, que en el 40% de los casos está coinfectada con ambos parásitos. La incidencia mucho menor de la babesiosis respecto de la enfermedad de Lyme en las personas que viven en áreas endémicas puede reflejar la tendencia de *B. microti* para causar infecciones subclínicas. Los estudios serológicos indican que el 10% de los nativos de Connecticut seropositivos para *B. burgdorferi* también poseen anticuerpos contra *B. microti*, lo que indica que las infecciones son mucho más frecuentes de lo que se sospechaba.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio se realiza con mayor frecuencia mediante la detección de las inclusiones parasitarias intraeritrocíticas en frotis teñidos de sangre periférica. Presentan las siguientes características:

- Las formas anulares son diminutas, varían entre 1 y 3 μm , que recuerdan a los trofozoítos tempranos de *P. falciparum* (lámina en color 22-9A).
- Los núcleos son muy pequeños y pueden observarse uno o dos gránulos de cromatina.
- Las formas maduras pueden aparecer como dobletes, lo que les da el aspecto de orejas de conejos; o en tétradas y simulan la Cruz de Malta.
- Los eritrocitos no están agrandados, son normocrómicos y no presentan pigmentos.

Las manifestaciones clínicas de la babesiosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-17. También se han comunicado infecciones relacionadas con transfusiones; específicamente, un grupo de seis casos de babesiosis asociados con transfusiones en el estado de Nueva York, rastreado a un único donante asintomático.⁶⁹ Se ha establecido que *B. microti* puede permanecer infecciosa a 4 °C durante 30 días, el tiempo normal de almacenamiento de la sangre de donantes.⁷⁵ También se ha informado un caso reciente en el estado de Washington relacionado con transfusión con la cepa WA1.¹³⁰

El diagnóstico mediante las escasas formas intraeritrocíticas descritas antes es difícil y puede ser pasado por alto, incluso por microscopistas experimentados. Mattia y cols.¹⁸¹ utilizaron una técnica de capa enriquecida de leucocitos (*buffy-coat*) para mejorar la detección de la parasitemia en casos de babesiosis. García⁹⁶ ha publicado una nota de precauciones que advierte sobre los posibles problemas diagnósticos provenientes de los diferentes instrumentos. La cantidad de campos examinados de manera habitual cuando se examinan los frotis es demasiado pequeña y estos instrumentos no están diseñados para detectar parásitos intracelulares. Por consiguiente, a menos que se

advierta al laboratorio sobre la sospecha diagnóstica, los casos de babesiosis y de paludismo pueden pasar inadvertidos.

Hemoflagelados: especies de *Leishmania* y de *Trypanosoma*

La familia de protozoos *Trypanosomatidae* incluye miembros de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, que son flagelados que habitan la sangre y los tejidos humanos.

Pueden observarse cuatro estadios de desarrollo de los parásitos. La forma adulta, o tripanosoma, presenta un cuerpo alargado con un flagelo posterior en forma de látigo adherido por una delicada membrana ondulante que recorre todo el cuerpo. Tres especies se asocian con la enfermedad humana: *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* causan la enfermedad del sueño africana, mientras que *Trypanosoma cruzi* es el agente de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Las formas menos desarrolladas de estos protozoos, conocidas como amastigoto o formas leishmanoides, están desprovistas de flagelos y se encuentran como parásitos intracelulares en las células reticuloendoteliales. *Leishmania donovani*, la causa del kala-azar visceral en los seres humanos y el complejo *Leishmania tropica*, los agentes de las úlceras cutáneas tropicales, son las especies de *Leishmania* que se asocian con mayor frecuencia con las enfermedades humanas. *T. cruzi* también existe en la forma de amastigoto e infecta las fibras del músculo cardíaco y células de otras vísceras. Los estadios de desarrollo de leptomonas y critidias están albergados en el insecto vector; este último estadio representa la forma infectante para los seres humanos.

LEISHMANIASIS Y ESPECIES DE *LEISHMANIA*

La leishmaniasis humana puede adquirir dos formas: la enfermedad diseminada, el kala-azar, que afecta el hígado, el bazo y otras partes del sistema reticuloendotelial y una forma cutánea primaria, que se manifiesta como úlceras de la piel y las mucosas (lámina en color 22-9B). Los seres humanos se infectan a través de la regurgitación de los promastigotos infectantes del parásito en el tejido subcutáneo en el momento en que se alimentan de la sangre diversas especies de mosquitos del género *Phlebotomus*. En la figura 22-20 se muestra el ciclo vital de las especies de *Leishmania*.

La leishmaniasis visceral está causada por varias especies que pertenecen al complejo *Leishmania donovani*; es decir, *L. donovani donovani*, *L. donovani infantum* y *L. donovani chagasi*. Cuando los flagelados ingresan al cuerpo humano, en primer lugar invaden los monocitos inflamatorios del tejido subcutáneo en el sitio de la picadura. Estas células inflamatorias se rompen y liberan parásitos que a su vez invaden otros monocitos y macrófagos, dentro de los cuales se diseminan a través del sistema reticuloendotelial. El período de incubación varía de 3 a 8 meses. La progresión o no de la enfermedad depende de la capacidad de los linfocitos T del huésped para activar los macrófagos a fin de matar los parásitos. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-18.

Identificación por el laboratorio. Para la leishmaniasis diseminada (kala-azar) el diagnóstico se realiza mediante la demostración de los amastigotos en frotis teñidos, en improntas o en biopsias de tejidos infectados. Presentan las siguientes características:

- Los protozoos tienen una forma oval, son intracelulares y muy pequeños, de 2 a 4 μm .

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-17 Babesiosis

Como lo señalaron Persing y cols.,²⁰⁹ los síntomas en la babesiosis temprana pueden ser mínimos: malestar general, anorexia y fatiga son síntomas inespecíficos que se confunden con facilidad con otras enfermedades infecciosas. Aunque los síntomas de las infecciones contraídas en el noreste de los Estados Unidos tienden a ser relativamente leves, informes recientes de estudios de casos de California y otras partes del mundo indican que las presentaciones de enfermedad fulminante, febril y hemolítica se encuentran con mayor frecuencia.^{27,210} Los estudios genéticos revelan que estas infecciones más graves pueden ser causadas por una cepa más estrechamente relacionada con un patógeno canino conocido, *B. gibsoni*, o con especies de *Theileria*, más que con *B. microti*.²⁰⁹ Esta cepa, designada WA1 (Washington 1), se encuentra en amplia investigación. Dorman y cols.⁷¹ informaron el caso de un hombre de 58 años, infectado por la picadura de una garrapata, en quien se desarrolló anemia hemolítica grave seguida de coagulación intravascular diseminada e insuficiencia renal aguda y respiratoria. Se notó una rápida mejoría después del tratamiento con clindamicina, 300 mg cuatro veces por día (comenzada 2 días antes de la internación), quinina (650 mg tres veces por día) durante la internación y una transfusión de intercambio, en la cual la proporción de eritrocitos parasitados se redujo del 13,8% al 4,2%.

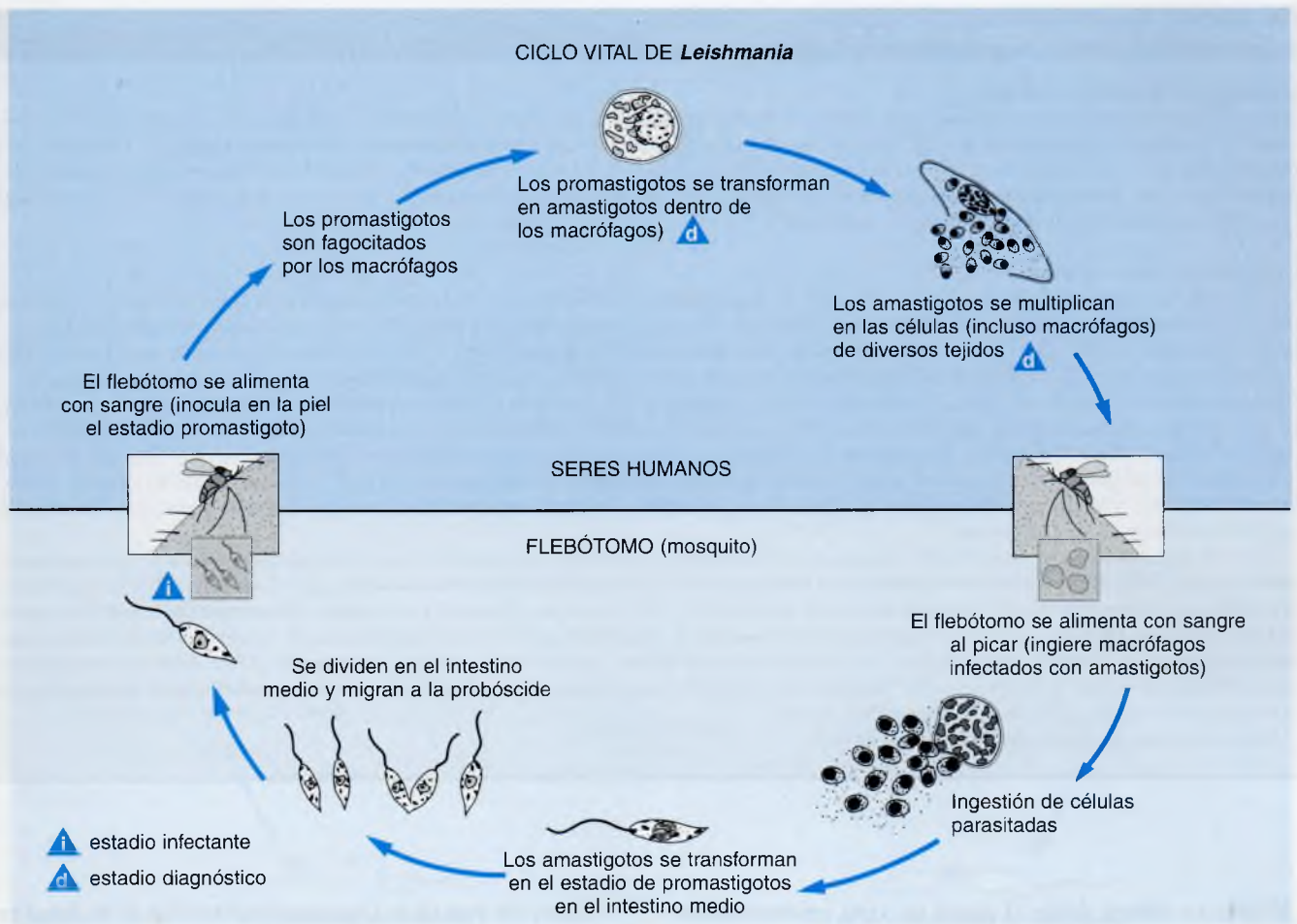


Figura 22-20 Ciclo vital de las especies de *Leishmania*. En el sitio de la picadura del flebótomo se forma una pápula cutánea, pero rara vez progresa a una úlcera. Los promastigotos se transforman en amastigotos, los cuales proliferan localmente en el tejido subcutáneo y se diseminan a través del sistema reticuloendotelial para afectar bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos, donde los organismos se encuentran como parásitos intracelulares estrictos (lámina en color 22-9C). El ciclo vital simple luego se completa cuando los amastigotos son captados por el flebótomo durante su alimentación siguiente con sangre del huésped infectado. Los amastigotos se transforman en promastigotos infectantes en el intestino medio del mosquito.

- Se asemejan a las células levaduriformes de *Histoplasma capsulatum*.
- Los amastigotos tienen un cinetoplasto en barra adyacente al núcleo, una estructura que es útil para la distinción de estos organismos de las formas levaduriformes de *Histoplasma capsulatum* (lámina en color 22-9C, D y E).

Leishmaniasis cutánea. El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la demostración de los amastigotos intracelulares en preparados de improntas o cortes de tejidos de lesiones activas. Las biopsias deben obtenerse de los bordes sobreelevados e inflamados de la lesión; los aspirados deben obtenerse mediante la extensión profunda de la punta de la aguja por debajo del lecho de la úlcera. Los métodos de cultivo, utilizados sobre todo en los laboratorios que prestan servicios en áreas endémicas, se detallan en la publicación de García.⁹⁶ Lopez-Velez y cols.¹⁷⁰ también describen un método de cultivo que utiliza muestras separadas en capa enriquecida de leucocitos de sangre periférica que fueron de valor en el diagnóstico de leishmaniasis en pacientes con SIDA con cuadros clínicos atípicos. Las técnicas de inoculación en animales se utilizan en

estos laboratorios para diagnosticar infecciones cuando las concentraciones del parásito son bajas.

Las técnicas de ELISA, que emplean anticuerpos monoclonales específicos de especies y las sondas de DNA fueron satisfactorias para la detección directa de antígeno de *Leishmania* en extractos de muestras de tejido en laboratorios donde se dispone de reactivos. Piarroux y cols.²¹³ utilizaron un ensayo de PCR que amplifica una secuencia repetida del genoma de *Leishmania infantum* en un estudio de 73 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de leishmaniasis visceral; estos autores demostraron una sensibilidad superior del método (82%) para hacer el diagnóstico cuando se comparó con el examen de aspirados de médula ósea (55%) y mielocultivos (55%). Concluyeron que la PCR puede servir como ayuda en el diagnóstico de leishmaniasis visceral en pacientes inmunodeprimidos. Rodríguez y cols.²²⁶ mediante la técnica de hibridación por PCR que emplea oligonucleótidos dirigidos contra regiones conservadas del DNA del cinetoplasto, pudieron detectar la presencia de *Leishmania* en el 98% de los pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea por la prueba cutánea de Montenegro positiva. Estos autores consideran que

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-18 Leishmaniasis

Leishmaniasis diseminada: kala-azar

Los síntomas pueden ser leves y autolimitados en las infecciones con escasa cantidad de parásitos o puede haber un comienzo súbito de síntomas, con fiebre en picos (un patrón de dos o tres picos por día), anorexia, malestar general y una sensación de enfermedad, que simula la fiebre tifoidea o el paludismo. Si la enfermedad progresa y se torna crónica, la fiebre de baja intensidad, el dolor abdominal vago, el aumento de tamaño del abdomen por la hepatomegalia y la esplenomegalia (que puede tomarse enorme), la linfadenopatía generalizada, la anemia y la leucopenia pueden persistir. Recientemente se ha reconocido kala-azar como una infección oportunista relacionada con el SIDA.¹⁹¹

Leishmaniasis cutánea primaria

La enfermedad se clasifica en las formas del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo. La enfermedad del Viejo Mundo, denominada úlcera de Oriente, está causada con mayor frecuencia por miembros del complejo de *L. tropica* (que comprende *L. major*, *L. tropica minor* y *L. aethiopica*). Esta forma de enfermedad es endémica en las regiones tropicales y subtropicales de Asia Menor, China, sur del Mediterráneo, India y África. En el sitio de las picaduras del insecto en las partes expuestas del cuerpo, los promastigotos inoculados en la piel son captados por las células reticuloendoteliales, donde evolucionan a amastigotos. La especie que causa la leishmaniasis cutánea no circula salvo en muy raros casos. En el sitio de la picadura se manifiesta un prurito intenso que en el transcurso de varias semanas o meses progresa a una úlcera crónica y bien circunscrita con bordes eritematosos y sobreelevados y un lecho poco profundo (lámina en color 22-6J). Las úlceras causadas por *L. major* tienden a ser húmedas y múltiples; las de *L. tropica minor* son más secas y forman una costra que las recubre. Casi todas las lesiones son benignas y se curan solas; desarrollan inmunidad permanente. Las lesiones cutáneas de *L. aethiopica* pueden no ulcerarse, pero a menudo causar infecciones subcutáneas profundas que se diseminan y esta especie también tienen predilección para provocar enfermedad diseminada indistinguible de las infecciones por *L. donovani*.²⁰⁷

La leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo está causada por el complejo *L. braziliensis* (que también incluye *L. braziliensis guyanensis* y *L. braziliensis panamensis*), que es endémico en casi todos los estados de América del Sur y en varias regiones de América Latina, y por el complejo *Leishmania mexicana*, que incluye varias especies separadas endémicas en diversas regiones de México, Guatemala, Venezuela y en la cuenca del Amazonas de Brasil. Los organismos del complejo *L. braziliensis* causan úlceras cutáneas crónicas agresivas, con diseminación a las mucosas (bucal, nasal, faríngea), un cuadro clínico denominado espundia. Los organismos del complejo *L. mexicana* con más probabilidad producen úlceras cutáneas autolimitadas (el 60% de las lesiones aparecen en los lóbulos de las orejas⁹⁶ y se conocen como "úlceras de los chicleiros"). Las mucosas están menos afectadas, aunque es probable que *L. peruviana* produzca una enfermedad cutánea difusa conocida como "uta" en Perú.

El tratamiento de elección es el estibogluconato de sodio.

la técnica es valiosa desde el punto de vista epidemiológico para la discriminación taxonómica entre especies.

TRIPANOSOMIASIS

La tripanosomiasis humana está causada por un protozoo flagelado que habita en la sangre y los tejidos. La forma adulta, que mide 1,5-30 $\mu\text{m} \times 1,5\text{-}3,5 \mu\text{m}$, tiene un cuerpo alargado con un flagelo posterior en forma de látigo que se adhiere a una delicada membrana ondulante que recorre toda la longitud del cuerpo. Los animales silvestres actúan como huéspedes reservorios. Se observan con facilidad un núcleo central y un cinetoplasto posterior. Estas formas diagnósticas se observan en los frotis teñidos de sangre periférica (lámina en color 22-9E) y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con infección activa. Sin embargo, en las infecciones crónicas o leves, Bailey y Smith,¹² en un estudio de muestras de sangre de 134 pacientes con infección por *Trypanosoma gambiense*, encontraron que la prueba con enriquecimiento de leucocitos desarrollada para el diagnóstico de paludismo constituye la prueba diagnóstica más sensible para la detección de las formas de los tripanosomas.

El ciclo vital incluye animales y seres humanos como huéspedes definitivos, en los cuales los tripanosomas maduros circulan y se dividen en la sangre periférica y, por último, invaden el sistema nervioso central, y un huésped intermediario, la mosca tsetse (género *Glossina*), en la que se desarrollan las formas inmaduras en las glándulas salivales que por último forman los tripomastigotos metacíclicos infectantes. El ciclo vital se ilustra en figura 22-21.

Las manifestaciones clínicas de la tripanosomiasis africana se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-19.

En un informe de la Organización Mundial de la Salud emitido en 1986, se consideraba que alrededor de 50 millones de personas están en riesgo de tripanosomiasis africana; se han diagnosticado 20 000 casos nuevos por año.²⁹⁵ En la forma africana de la enfermedad, los seres humanos se infectan a través de las picaduras de las moscas tsetse infectadas que albergan los tripomastigotos procíclicos infectantes en sus glándulas salivales. Las moscas glosina se encuentran sólo en África. La capacidad de estos organismos de permanecer viables en una población de personas infectadas de modo crónico se debe a la propiedad singular de cambiar la estructura antigénica de las glucoproteínas dentro de sus membranas de superficie, lo que evita los efectos de los anticuerpos del huésped.⁷⁰

Se han creado métodos para la detección de antígeno a fin de diagnosticar la tripanosomiasis africana. En un ensayo de campo realizado en Zaire, Nantulya y cols.¹⁹⁵ utilizaron de modo eficaz ELISA para antígenos en la evaluación de 77 casos de tripanosomiasis gambiense comprobados por métodos parasitológicos. De estos pacientes, 69 (89,6%) mostraron antígenos en suero y 35 (45,5%) en el LCR. De estos últimos, 34 (97,1%) tuvieron recuentos de leucocitos elevados en el LCR, 29 (82,9%) mostraron concentraciones elevadas de proteínas y 23 (65,7%) revelaron tripanosomas identificados por microscopía en el LCR. Los autores indican que su prueba de ELISA puede ser útil en la estadificación de la enfermedad y en el seguimiento hasta el tratamiento. Kyambadde y cols.¹⁵⁹ encontraron que la PCR demostró infección en 20 de 35 (57%) muestras de sangre obtenidas de pacientes con sospecha de tripanosomiasis en Uganda y en 21 de 34 muestras de LCR (61%). De las 21 muestras de sangre negativas para las formas diagnósticas circulantes, 6 fueron positivas por PCR (28,6%), y 8 de 21 mues-

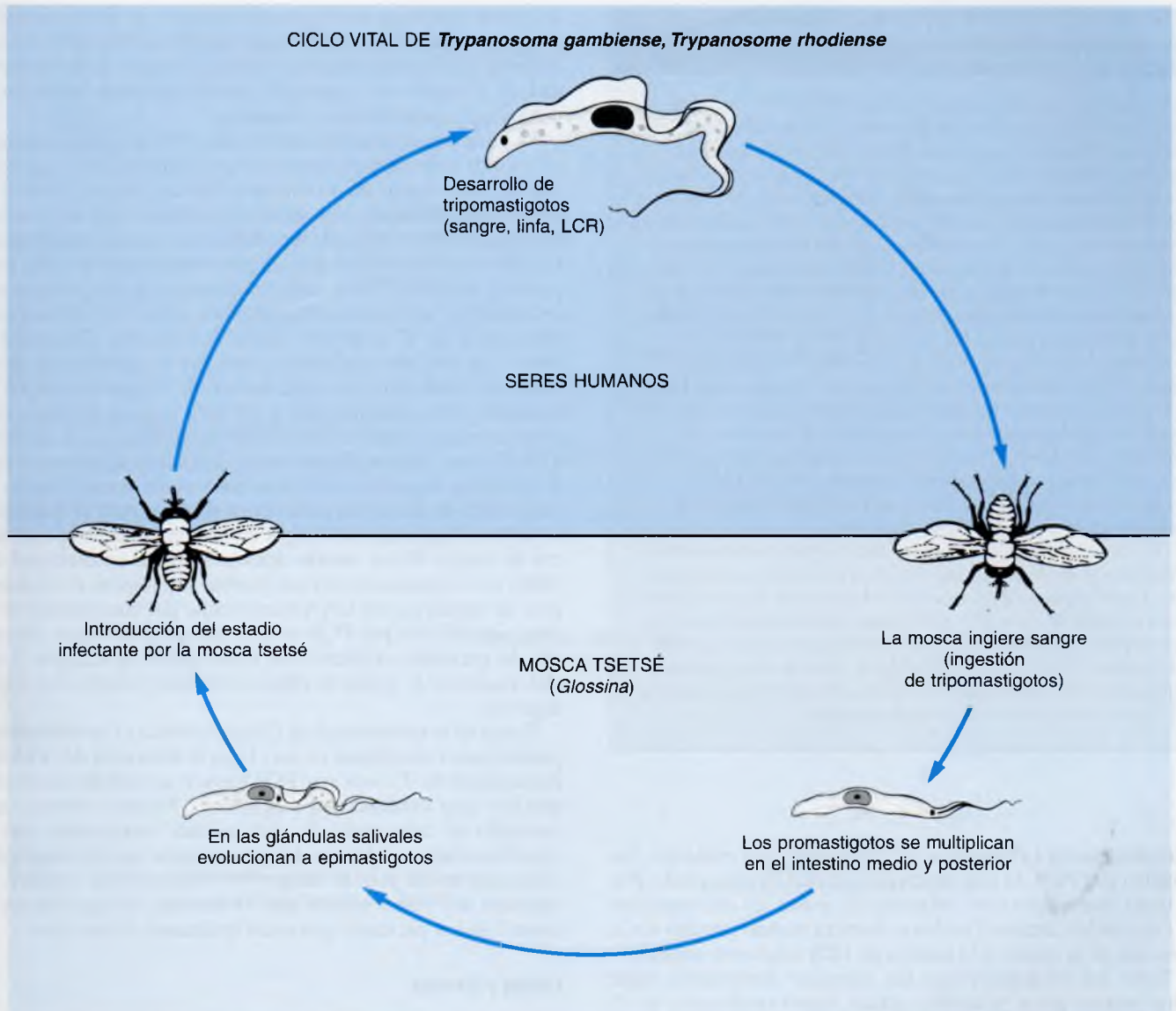


Figura 22-21 Ciclo vital de *Trypanosoma brucei gambiense*. El ciclo vital comprende los seres humanos y un insecto, la mosca tsetse. Cuando el insecto pica a una persona infectada ingiere su sangre que contiene tripomastigotos. En el estómago de la mosca se liberan promastigotos que se multiplican en el intestino medio y posterior; por último migran a las glándulas salivales como epimastigotos. A su vez, los seres humanos se infectan a través de la picadura de una mosca infectada que inocula epimastigotos. En el sitio de la picadura del insecto se forma un chancro dentro del cual, en un período de varias semanas, los tripanosomas sufren su multiplicación y maduración. Por último, éstos invaden los vasos linfáticos y sanguíneos, y se diseminan a los ganglios linfáticos y al sistema nervioso central. La multiplicación del organismo continúa en el torrente circulatorio a pesar de la inmunidad humoral del huésped infectado, una diferencia fundamental con *T. cruzi*.

tras de LCR (38%) que fueron negativas por centrifugación doble resultaron positivas por PCR.

Los fármacos de elección en el tratamiento de la tripanosomiasis africana son la suramina o la pentamidina. El melarsoprol puede utilizarse en los estadios tardíos con enfermedad del SNC.

Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana): La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, se extiende desde el sur de los Estados Unidos por toda América Latina y del Sur hasta la Argentina. Se estima que hay entre 10 y 12 millones de personas infectadas, de las cuales cerca de la mitad vive en Brasil.⁶⁶ Si bien *T. cruzi* se ha encontrado en perros, mamíferos silvestres e insectos vectores en el sur de los Estados Unidos, sólo muy rara vez se comunicaron casos au-

tóctonos humanos.^{117,263} El diagnóstico puede realizarse mediante la observación de los tripomastigotos circulantes en sangre periférica, aunque el período de circulación es más corto que el observado en la tripanosomiasis africana. Los tripomastigotos presentan un aspecto similar a los de su contraparte africana, salvo por su tendencia característica de formar la letra "C" (lámina en color 22-9G).

El último caso informado en los Estados Unidos fue en la región rural de Tennessee, cuando una madre encontró un triatoma (chinche reduvída o "vinchuca") en la cuna de su niño de 18 meses.¹²⁹ Se halló que el contenido intestinal de la vinchuca estaba infectado por *Trypanosoma cruzi* tanto por microscopía óptica como por PCR. Un preparado enriquecido de leucocitos de una muestra de sangre del niño fue negativo

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-19

Tripanosomiasis africana

La tripanosomiasis africana, también conocida como enfermedad del sueño, es causada por una de las dos especies, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, endémico en las regiones de la sabana y de los bosques del centro y el este de África, y *Trypanosoma brucei gambiense*, endémico en las regiones selváticas lluviosas tropicales del centro y oeste de África. La enfermedad clínica causada por *T. brucei rhodesiense* presenta un comienzo más rápido con una tendencia mayor a tornarse rápidamente progresiva, incluso llevar a la muerte. El cuadro más crónico del deterioro neurológico progresivo, que culmina en la "enfermedad del sueño" característico de la tripanosomiasis *gambiense*, a menudo no tiene tiempo de desarrollarse en las cepas *rhodesiense*.

Los pacientes infectados por *T. brucei gambiense* experimentan primero fiebre recurrente intermitente asociada con linfadenopatías. Los ganglios linfáticos de la región cervical posterior del cuello son los afectados con frecuencia y producen la lesión conocida como signo de Winterbottom. Ormerod²⁰² ha mostrado datos experimentales de una relación fisiológica entre los ganglios linfáticos cervicales y los ventrículos cerebrales, lo que sugiere que el signo de Winterbottom puede ser un marcador de la infección cerebral.

La hepatoesplenomegalia también puede evidenciarse durante este estadio temprano de la infección. Cuando la enfermedad se torna crónica, la invasión por parte del organismo del sistema nervioso central produce el estadio de sueño de la enfermedad, caracterizado inicialmente por cambios conductuales y de la personalidad, que conducen a la apatía, la fatiga, la confusión y la somnolencia, signos de la meningoencefalitis progresiva. La emaciación y el coma profundo llevan por último a la muerte, a menudo causada por sobreinfecciones.

para determinar la presencia de organismos; sin embargo, fue positivo por PCR, lo que indica parasitemia de bajo grado. Por lo tanto, este quinto caso informado de infección autóctona por *T. cruzi* en los Estados Unidos se hubiera pasado por alto sin la atención de la madre y la técnica de PCR altamente sensible.

Tanto los roedores como los animales domésticos, entre ellos perros, gatos y cerdos, actúan como reservorios de *T. cruzi*. En los Estados Unidos se han encontrado zarigüeyas y mapaches infectados. En el caso informado antes, tres mapaches en la vecindad del caso inicial tenían hemocultivos positivos para *T. cruzi*. Las casas construidas con adobe, barro o material vegetativo, con numerosas grietas en las paredes, proporcionan los sitios óptimos para la cría de los triatomas (lámina en color 22-9H). Estas chinches tienen hábitos nocturnos y atacan a sus víctimas mientras duermen. Por consiguiente, la prevención de la enfermedad está dirigida a mejorar las condiciones de las viviendas.

El ciclo vital de *T. cruzi* difiere del de las especies africanas en que el triatoma (reduvído) actúa como el artrópodo vector y que las vísceras pueden ser infectadas con las formas de amastigotos (leishmanias) del parásito. El ciclo vital se ilustra en la figura 22-22.

Las presentaciones clínicas de la enfermedad de Chagas se encuentran en el recuadro de correlación clínica 22-20.

Trypanosoma rangeli es otro tripanosoma transmitido a los seres humanos por chinches reduvídeas. Las infecciones humanas suelen ser asintomáticas. Los tripomastigotos pueden identificarse en frotis de gota gruesa y fina de sangre periférica y la morfología se asemeja a la de la tripanosomiasis africana. Sin embargo, a menos que se obtenga una historia clínica detalla-

da, puede realizarse un diagnóstico erróneo de infección por *T. cruzi*. La comprobación serológica puede ser de valor para la diferenciación de las infecciones por *T. rangeli* de la enfermedad de Chagas; sin embargo, pueden aparecer infecciones dobles que confunden los resultados.

Se están desarrollando métodos para el diagnóstico serológico a fin de detectar anticuerpos séricos contra *T. cruzi* que ayuden al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Godsel y cols.¹⁰¹ identificaron en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas un antígeno recombinante nuevo denominado FCaBP, una proteína de unión al calcio flagelar de 24 kDa. Esta proteína puede utilizarse como componente de una preparación de múltiples antígenos recombinantes eficaz en la detección sistemática de *T. cruzi* en sangre de donante. Tantowitz y cols.²⁶³ en una revisión global, analizan la importancia de la detección sistemática de enfermedad de Chagas en sangre de donantes. Esta cuestión afecta no sólo a los individuos que viven en países donde la enfermedad es endémica sino también a los Estados Unidos, donde más de 50 000 inmigrantes de países endémicos pueden estar infectados. Avila y cols.¹¹ sugieren una prueba de detección sistemática sensible para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica en donantes para bancos de sangre. Estos autores demostraron una sensibilidad del 100% en comparación con las pruebas serológicas en la detección de productos del DNA minicircular del cinetoplasto de *T. cruzi* amplificado por PCR en 114 muestras de sangre obtenidas de pacientes crónicos con enfermedad de Chagas y sin ella, mediante la sonda de oligonucleótido marcada con digoxigenina.

Como en la enfermedad de Chagas crónica el número de tripomastigotos circulantes es muy bajo, la detección de DNA del cinetoplasto de *T. cruzi* por PCR provee un método altamente sensible para establecer el diagnóstico. Muchos estudios han mostrado un alto grado de sensibilidad, comparable con el xenodiagnóstico, capaz de detectar tan sólo un tripomastigoto circulante en 20 mL de sangre.^{20,103} Este método también se encontró útil como prueba para determinar la curación en el control de los pacientes que están realizando tratamiento.

Filarias y filariasis

Estos nematodos descritos aquí son parásitos con forma de hebras. Los adultos habitan sobre todo en los vasos sanguíneos y linfáticos, pero también pueden encontrarse en músculos, tejido conectivo y cavidades serosas. Tres especies de filarias son las que con frecuencia causan enfermedad en los seres humanos: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Loa loa*. En 1989 se estimó que 90 a 150 millones de personas en todo el mundo estaban afectadas, más del 90% por *W. bancrofti* y menos del 10%, por *B. malayi*.¹⁹³ En 1999, la estimación fue de 120 millones de personas.^{149a} La filariasis por *W. bancrofti* se observa sobre todo en regiones urbanas del sudeste asiático, debido a las malas condiciones sanitarias y a la cría intensa de mosquitos de los géneros *Culex*. La filariasis por *B. malayi* es principalmente una enfermedad rural transmitida por mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Aedes*. Se cree que la cantidad de personas infectadas está en aumento debido a la aparición de barrios de viviendas precarias por migraciones desde las zonas rurales a las urbanas, lo que brinda condiciones favorables para la reproducción de los mosquitos.²⁷⁵

Los seres humanos adquieren la enfermedad tras la picadura de un mosquito (*W. bancrofti* y *B. malayi*) o tábanos del género *Chrysops* infectados. Los mosquitos actúan como huéspedes intermediarios para las especies *M. perstans* y *M. ozzardi*, que

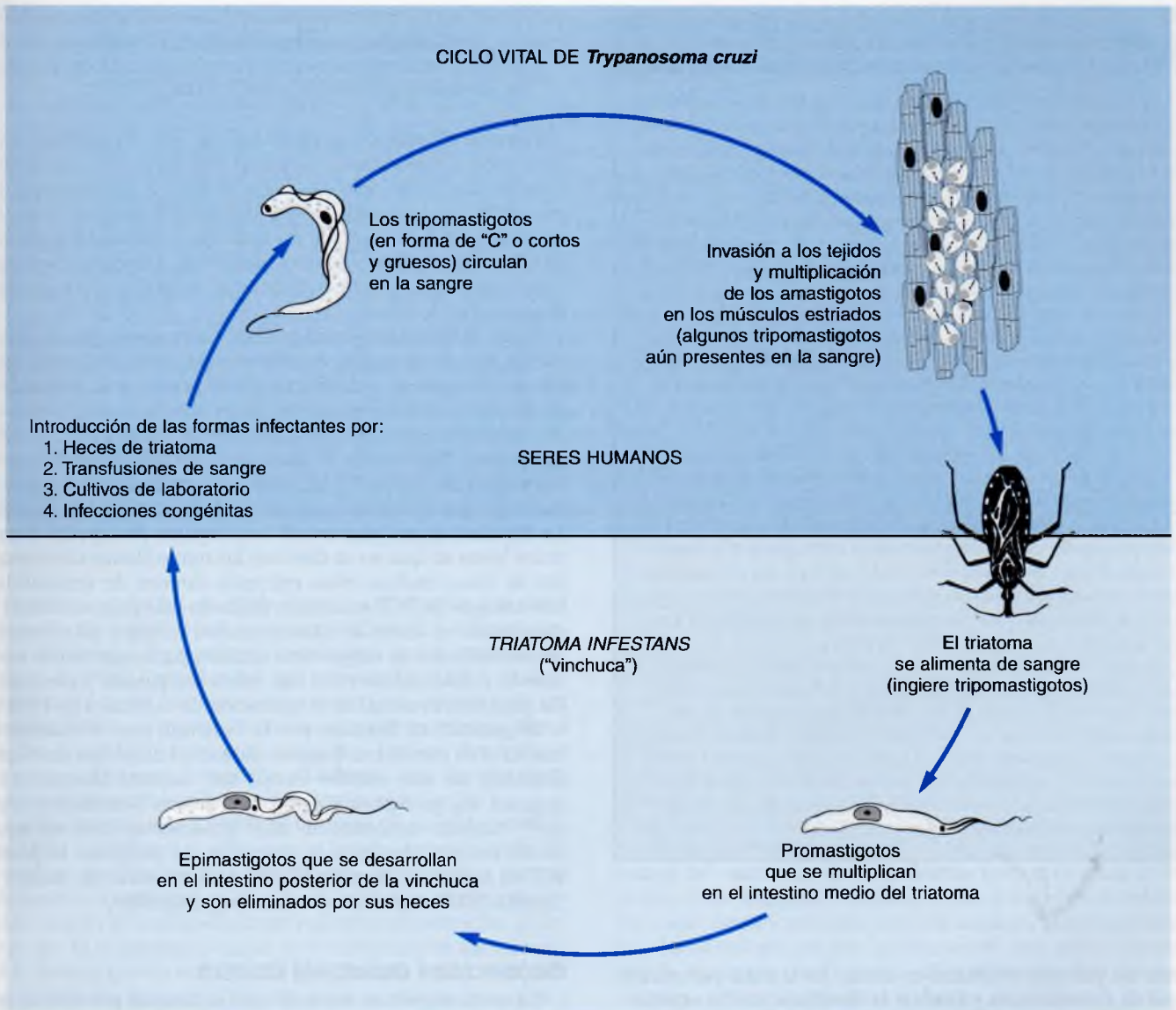


Figura 22-22 Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*. Los seres humanos se infectan cuando la vinchuca con tripanosomas deposita sus heces sobre la herida que produce al picar y chupar sangre. La picadura es bastante dolorosa y al frotarse, las heces infectadas penetran en la herida. En el huésped humano, los tripanosomas con forma de C circulan por el torrente circulatorio durante el comienzo de la fase aguda de la enfermedad (lámina en color 22-9G) y aparecen episodios febriles intermitentes. El ciclo se completa cuando la vinchuca reduvídea (lámina en color 22-9H) pica de nuevo a un huésped infectado.

carecen de vaina. El ciclo vital de *Wuchereria bancrofti* como prototipo de filarias se ilustra en la figura 22-23.

Identificación por el laboratorio. El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la observación de las microfilarias circulantes en frotis teñidos de sangre periférica.¹¹² Las microfilarias circulan por la sangre periférica con una periodicidad regular; las de *W. bancrofti* y *B. malayi* son nocturnas y las de *Loa loa* son diurnas. Por consiguiente, para diagnosticar filariasis por *W. bancrofti*, las muestras de sangre deben obtenerse de modo óptimo entre la medianoche y las 2 de la madrugada. En casos de infecciones leves o cuando las muestras se recolectan en momentos subóptimos, las técnicas de filtración por membrana, centrifugación, sedimentación (concentración de Knott) y la preparación de gotas gruesas pueden ayudar a detectar las microfilarias circulantes.²²⁴ El empleo de filtros de policarbo-

nato (Nuclepore®) para atrapar las microfilarias sobre un filtro después de haber lisado los eritrocitos es una técnica de concentración alternativa.⁶⁴ Como los filtros con un tamaño de poro de 3-5 μm son transparentes cuando están húmedos, pueden examinarse directamente en el microscopio sobre un portaobjetos para determinar la presencia de microfilarias.

Long y cols.¹⁶⁸ describen un método interesante para el diagnóstico de laboratorio de filariasis que emplea una técnica de naranja de acridina, en un tubo para microhematocrito. Este tubo, que incorpora heparina, EDTA y naranja de acridina, constituye la base para esta prueba. Con la centrifugación, los parásitos se concentran en la capa enriquecida de leucocitos y pueden visualizarse a través de la pared de vidrio transparente del tubo. El colorante naranja de acridina tiñe el DNA de los parásitos y pueden observarse las características morfológicas,

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-20 Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)

Los niños son los afectados con mayor frecuencia, aunque los adultos no están exentos de adquirirla. En la forma aguda de la enfermedad puede aparecer un chagoma inflamado y edematoso en el sitio de la picadura del triatoma (vinchuca). Como esta chinche suele atacar mientras las personas duermen, son más comunes las picaduras de la cara. Cuando la puerta de entrada es la conjuntiva aparece un edema indoloro del tejido periocular que causa el clásico signo de Romaña. Los ganglios linfáticos locales son los afectados con mayor frecuencia. Puede observarse fiebre, malestar general, anorexia, linfadenopatía generalizada, edema de los miembros inferiores y hepatoesplenomegalia de grado variable de intensidad. Los antiprotozoos nifurtimox, un derivado nitrofurilideno y el benznidazol, un imidazol, son los fármacos recomendados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos presentan posibles efectos colaterales graves, como polineuropatía, alergias cutáneas, trastornos gástricos y leucopenia.

En la forma crónica, el estadio de amastigoto (leishmania) se encuentra con mayor frecuencia en los tejidos, por lo común en las células reticuloendoteliales o en el músculo cardíaco (lámina en color 22-11A). La miocardiopatía, secundaria al edema y a la destrucción de las fibras miocárdicas y una miocarditis intersticial, son la causa principal de muerte. El megaesófago y el megacolon son otras complicaciones de la enfermedad de Chagas crónica. Aunque la afectación del sistema nervioso central no es típica, puede haber meningoencefalitis que progresa a la confusión, la apatía, el estupor, el coma y la muerte.

Manzullo y Chuit,¹⁷⁶ en un estudio de 4 593 personas con al menos dos resultados serológicos positivos para infección por *T. cruzi*, encontraron que hubo 89 muertes (1,5%). De estos casos mortales, las tres cuartas partes fallecieron por insuficiencia cardíaca y el cuarto restante, por arritmias ventriculares graves. Aquellos con bajo riesgo de muerte mostraron ECG y seguimiento clínico normales; los pacientes de alto riesgo fueron sintomáticos y presentaban ECG anormales, con bloqueo de rama derecho, alteraciones de la repolarización.

como los patrones nucleares en cortes de la cola, por microscopía de fluorescencia y realizar la identificación de especie.

Las hembras maduras producen una miríada de prelarvas conocidas como microfilarias que circulan por la sangre y constituyen el modo de transmisión cuando el mosquito vector se alimenta con sangre de un individuo infectado. La identificación puede realizarse mediante la observación de las características claves, particulares para cada especie de filaria. Microfilarias:

- Miden entre 240-300 × 7-10 µm.
- Se asemejan a cintas y pueden observarse en preparaciones microscópicas en fresco de sangre anticoagulada por su movimiento ondulante que desplaza a los eritrocitos de un lado hacia el otro a medida que ellas se mueven.
- En los frotis teñidos de sangre periférica con la especie patógena se observa que se extiende una vaina importante más allá del corte de la cola. La vaina es una membrana ajustada que envuelve a las microfilarias y representa los restos de la membrana del huevo a partir de la cual se forma.
- Las especies pueden diferenciarse mediante la observación del tamaño y del patrón de extensión de los núcleos en los cortes de la cola:
 - *W. bancrofti*: los núcleos no se extienden en la cola (lámina en color 22-10A).

- *B. malayi*: dos núcleos se extienden en la cola, espaciados por cerca de 10 µm (lámina en color 22-10B).
- *Loa loa*: una columna ininterrumpida de núcleos se extiende en la cola (lámina en color 22-10C).

Las microfilarias de las otras dos especies, *Mansonella persians* (antes *Dipetalonema perstans*) y *Mansonella ozzardi* también pueden observarse en sangre periférica; sin embargo, los pacientes con estas infecciones suelen estar asintomáticos. En ocasiones, se ha observado en individuos infectados eosinofilia, linfadenitis, fiebre de baja intensidad, erupción maculopapular y urticaria. Las microfilarias de estas dos especies están desprovistas de vaina.

Como la detección de microfilarias circulantes por la observación directa de sangre es relativamente insensible para establecer el diagnóstico de filariasis y depende de la recolección de muestras en momentos específicos del día, se han introducido varios procedimientos de detección de antígeno. En un estudio previo, Weil y cols.²⁸¹ demostraron antígeno de filaria en los sueros de 56 de 57 pacientes con microfilaremia por *W. bancrofti* que vivían en regiones endémicas del sur de la India. La cantidad de antígeno puede ser irregular, en especial durante las horas en que no se detectan las microfilarias circulantes; por lo tanto, incluso estos enfoques carecen de sensibilidad. Los ensayos de PCR resultaron útiles no sólo para establecer el diagnóstico en casos de infecciones con escasa o nula cantidad de microfilarias en sangre sino también para controlar el tratamiento y discriminar entre una infección pasada y presente.⁸⁰ De gran interés actual es la aplicación de la técnica de PCR en el diagnóstico de filariasis por *W. bancrofti* para el examen de muestras de esputo recolectadas durante el día.¹ Los datos preliminares de este estudio inicial son bastante alentadores y auguran una gran posibilidad para el futuro. Simonson y Dunyo²⁴⁸ también encontraron muy promisorios tres enfoques recién introducidos para la detección de antígeno: la prueba ICT en tarjeta, la TropBio ELISA para muestras de suero y la TropBio ELISA para muestras en papel de filtro.

ONCOCERCOSIS Y *ONCHOCERCA VOLVULUS*

La oncocercosis es una enfermedad causada por filarias que afecta sobre todo el tejido subcutáneo en la forma de nódulos densos y fibrosos que varían de 5 a 25 mm, en los sitios de las picaduras del vector, la mosca negra o mosca búfalo del género *Simulium*. Se estima que 17,7 millones de personas están infectadas por *Onchocerca volvulus* en el mundo, de las cuales 270 000 son ciegas y otras 500 000 presentan deterioro visual. La oncocercosis es la principal causa mundial de ceguera.

La mosca del género *Simulium* tiene como hábitat la maleza que recubre los bancos de los arroyos de corriente rápida. La oncocercosis africana afecta sobre todo el Congo, Zaire, Angola y Sudán; en el continente americano se encuentra en la altiplanicie de Guatemala, los estados de Oaxaca y Chiapas en México, en Colombia y en el noreste de Venezuela. Los nódulos se distribuyen con mayor frecuencia en el tronco, los muslos y los brazos en los individuos africanos, pero se localizan en el cuello y los hombros de los habitantes de América Central. El ciclo vital de *Onchocerca volvulus* se ilustra en la figura 22-24.

La sospecha clínica del diagnóstico surge cuando un paciente de un área endémica presenta nódulos subcutáneos pruriginosos asociados con dermatitis, pérdida de la elasticidad e hiperpigmentación. El prurito es un síndrome importante en algunos pacientes, y produce fatiga, debilidad e insomnio hasta

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-21 Filariasis²⁰⁶

Al comienzo de las infecciones por *W. bancrofti* y *B. malayi* aparecen fiebre elevada y escalofríos, que duran hasta 5 días antes de remitir y que suelen asociarse con linfadenitis. Estos episodios febriles pueden recidivar cuando la linfangitis persistente se extiende en sentido distal desde los ganglios linfáticos, a medida que los parásitos adultos migran para llegar a su residencia final en los vasos linfáticos. A diferencia de lo que sucede con los esquistosomas, las filarias adultas son lo suficientemente grandes como para bloquear los vasos linfáticos. La obstrucción linfática, la inflamación y la tumefacción que producen linfedema extenso se conoce como elefantiasis. La manifestación clínica característica de *W. bancrofti* es la enfermedad genital con funiculitis, epididimoorquitis e hidrocele y, menos a menudo, elefantiasis.²⁰¹ En la filariasis por *B. malayi* es más frecuente la linfadenitis de la región inguinal y la elefantiasis, que afecta sobre todo la pierna por debajo de la rodilla y dejan la rodilla y el codo no afectados con contornos normales. En los vasos linfáticos en los que se alojan los parásitos se observa infiltración densa de eosinófilos, plasmocitos y macrófagos. El daño local de los vasos conduce a un aumento de la permeabilidad de la pared de éstos y a la fuga de líquidos con alta concentración de proteínas en los tejidos circundantes (linfedema), que por último causa la elefantiasis clásica. La linfangitis aguda ocurre cuando los parásitos adultos mueren. Algunos pacientes pueden albergar parásitos adultos sin microfilarias circulantes; otros pueden tener microfilaremia circulante importante sin síntomas clínicos acorde con esta situación.

Loa loa causa una enfermedad en la cual los parásitos adultos migran a través del tejido subcutáneo y puede observarse como una elevación serpiginosa de las partes delgadas de la piel o por debajo del revestimiento conjuntival del ojo. Estas lesiones cutáneas angioedematosas migratorias se conocen como edema de Calabar y constituyen una manifestación diagnóstica. Debido al aumento de los viajes en todo el mundo, Rakita y cols.²²¹ aconsejan que la infección por *Loa loa* sea considerada en el diagnóstico diferencial de los pacientes que presentan angioedema migratorio, vasculitis urticariana, eosinofilia o cualquier combinación de ellos. El término "gusano ocular" proviene de la propensión de este organismo a infiltrarse por debajo del epitelio conjuntival. Beaver¹⁶ analizó 56 casos de filariasis humana intraocular. En 10 casos, las filarias extirpadas se identificaron como *Loa loa*. Sin embargo, *W. bancrofti*, especies de *Dipetalonema* y especies de *Dirofilaria* fueron las otras especies de filarias detectadas en los casos restantes.

el punto de quedar incapacitado física y socialmente. Las áreas afectadas de la piel pueden tornarse calientes y edematosas, con cambio de color y arrugas prematuras, una afección conocida en América Central como mal morado. En África, la afectación de la región de la cadera, en especial alrededor de los ganglios linfáticos inguinales, causa un cuadro conocido como "ingles péndulas", que suele conducir a hernias femorales e inguinales. Diversas fotografías excelentes que ilustran estas presentaciones clínicas fueron publicadas por García.⁹⁶

La lámina en color 22-10D es un corte de un nódulo teñido con H-E, que incluye el corte de una hembra grávida dentro de la cual se observan muchas microfilarias. Aunque éstas pueden permanecer localizadas en el sitio de infección, pueden deambular a través de la piel adyacente y alcanzar otros tejidos, incluso el ojo. El compromiso ocular es la complicación más grave y suele llevar a grados variables de pérdida de la visión, conocida como "ceguera de los ríos". El ojo actúa como una trampa para las microfilarias itinerantes, las cuales pueden morir o vivir en la cámara anterior, la córnea, la coroides y el humor vítreo. Se considera que la acción mecánica o los efectos de las toxinas secretorias liberadas por el parásito adulto en un paciente hipersensible y la producción de anticuerpos contra los antígenos de la retina pueden participar en el desarrollo de la ceguera bilateral. La gravedad de la ceguera en diversas regiones endémicas depende de la cepa de *O. volvulus* implicada, como se determinó por análisis de la secuencia de DNA.²⁰⁰ El enzimoimmunoanálisis descrito antes puede ser útil para establecer el diagnóstico en los pacientes que presentan ceguera de los ríos.

El diagnóstico de laboratorio se establece mediante la demostración de las microfilarias en biopsias de piel. Puede ser necesario el examen de múltiples tiras para establecerlo. Zimmerman y cols.³⁰⁹ utilizaron con éxito la PCR para detectar microfilarias en biopsias de piel, lo que brinda un aumento significativo de la sensibilidad en la detección de la infección activa que la lograda por la observación microscópica habitual o las pruebas serológicas. Ogunrinade y cols.²⁰⁰ evaluaron un enzimoimmunoanálisis con antígenos recombinantes de *Onchocerca volvulus* OC 3.6 y OC 9.3 como una ayuda para el diagnóstico de pacientes en los que se sospechaba oncocercosis. Demostraron que 40 de las 42 (95%) muestras de suero

probadas de pacientes con oncocercosis conocida fueron reactivas para el antígeno OC 3.6, mientras que el 81% fueron positivas para el antígeno OC 9.3. Otros estudios revelaron que el antígeno OC 3.6 fue el más útil para detectar infecciones humanas antes de su manifestación; el antígeno OC 9.3 fue más sensible en los pacientes con infecciones definidas y manifestadas.

El tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica de los nódulos detectables cuando resulte eficaz. La ivermectina se considera en la actualidad el fármaco de elección cuando no es posible la extirpación quirúrgica de las lesiones. Este fármaco reduce las cantidades de microfilarias porque bloquea la liberación de las hembras, es bien tolerado y los efectos colaterales, como prurito, artralgia y edema cutáneo, suelen ser menores. La dietilcarbamazina, comenzando con dosis pequeñas más la suramina, son fármacos alternativos que han resultado exitosos, aunque los efectos colaterales secundarios a la muerte de las microfilarias pueden requerir el uso de antiinflamatorios. La administración de mebendazol o flubendazol (derivados del benzimidazol) también resultó beneficiosa, con escasos efectos secundarios.

DRACUNCULIASIS

Dracunculus medinensis es un nematodo de los tejidos asociado a menudo con las filarias. Es el gusano de Guinea que probablemente represente la "serpiente abrasadora" de la tradición bíblica.¹³⁵ Hopkins y cols.,¹³⁹ en una actualización reciente, indican que Asia está ahora libre de dracunculiasis, con Pakistán, India y Yemen sin nuevos casos desde 1993, 1996 y 1997, respectivamente. Tampoco hay nuevos casos de la enfermedad en Camerún y Senegal desde 1997, y hubo sólo tres casos informados en Chad en 1998. En la actualidad, la dracunculiasis está confinada a sólo 13 países de África, con una reducción del número global de casos de 3.2 millones en 1986 a 78 557 en 1998 (disminución del 97%). Esta reducción fue el resultado de un programa intensivo de detección y contención de casos, con recompensas para su comunicación.

Los seres humanos adquieren la infección a través de la ingestión del copépodo infectado. Las larvas evolucionan en

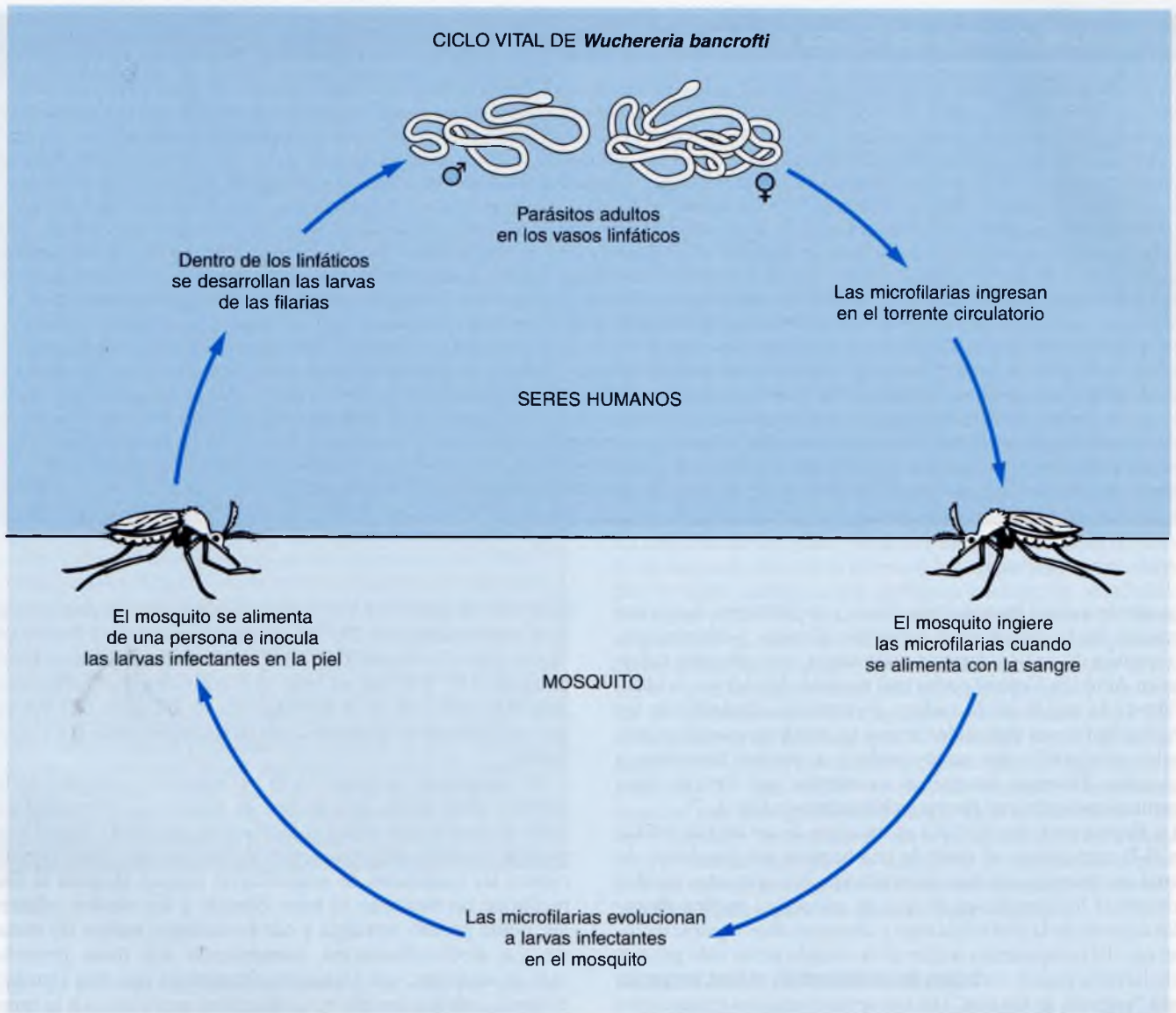


Figura 22-23 Ciclo vital de *Wuchereria bancrofti*. Los seres humanos adquieren la enfermedad tras la picadura de un mosquito infectado (*W. bancrofti* y *B. malayi*) o de un tábano (*Loa loa*). Los mosquitos picadores pequeños actúan como huéspedes intermediarios para las especies sin vaina, *M. perstans* y *M. ozzardi*. Cuando el vector pica a un huésped humano infectado, se ingieren las microfilarias infectantes y penetran la pared del estómago del insecto. En el estómago evolucionan a un tercer estadio larvario infectante, el que a su vez migra a los músculos torácicos del insecto y luego a la probóscide. Cuando el insecto pica a otro huésped humano, estas larvas infectantes se movilizan hacia la probóscide y se inoculan en la herida cutánea mientras el mosquito se alimenta con su sangre. Estas larvas infectantes se reproducen en forma local en el tejido subcutáneo y por último ingresan en los linfáticos periféricos y se dirigen a los ganglios linfáticos y vasos linfáticos en diversas partes del cuerpo. En un período de varias semanas, las larvas evolucionan a parásitos adultos blancos y con forma de hebras. Los linfáticos de los miembros inferiores y los ganglios linfáticos epitrocleares y femorales son los sitios afectados con mayor frecuencia. Las hembras maduras liberan microfilarias que circulan por la sangre y son ingeridas por el insecto adecuado durante su próxima alimentación con sangre para completar el ciclo vital.

parásitos adultos en las cavidades serosas y las hembras grávidas migran al tejido subcutáneo. Estas hembras pueden medir hasta 100 cm y causan una sensación de quemazón y ulceración de la piel en los sitios de infección. Pueden ser extirpadas del tejido subcutáneo mediante una incisión quirúrgica, enrollándolas después lentamente con un palillo. El ciclo vital del parásito se completa cuando las larvas producidas por la hembra escapan de la ampolla cutánea y se liberan en el agua donde vive el copépodo. La interrupción de esta parte del ciclo vital en las poblaciones infectadas permitirá la erradicación completa de la dracunculiasis en la próxima década.

DIROFILARIASIS

Las especies de *Dirofilaria*, transmitidas por mosquitos, son filarias que de manera habitual infectan a los animales. En el huésped definitivo, con frecuencia el perro, las formas larvarias infectantes inoculadas en el tejido subcutáneo de la probóscide del mosquito ingresan en la circulación y por último encuentran su recorrido al corazón, donde evolucionan a adultos (gusanos del corazón del perro) (lámina en color 22-10E). El diagnóstico se realiza en los perros infectados mediante la observación de microfilarias circulantes en sangre periférica. Cuando los seres humanos (que actúan como huéspedes acci-

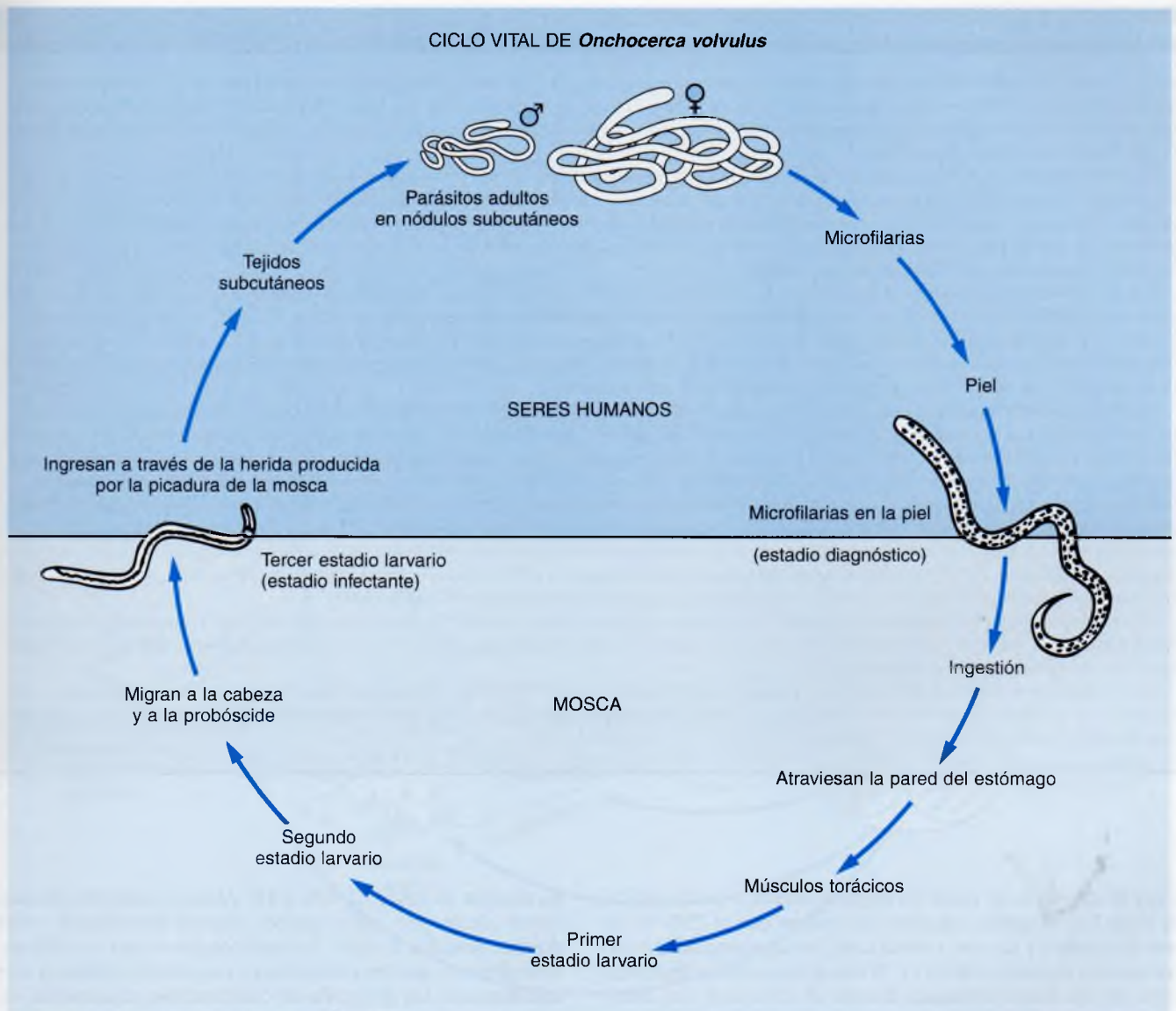


Figura 22-24 Ciclo vital de *Onchocerca volvulus*. En el ciclo vital, los seres humanos se infectan por picaduras de la mosca del género *Simulium*, en cuya boca se encuentran las forma larvarias del tercer estadio infectantes del parásito. Los parásitos adultos se desarrollan en masas enrolladas dentro de los nódulos debajo de la piel y las hembras producen microfilarias (lámina en color 22-9D). Las microfilarias permanecen localizadas en los sitios de infección y no circulan en la sangre periférica salvo en raras ocasiones. El ciclo vital se completa cuando una mosca negra pica de nuevo a una persona enferma en uno de los sitios de infección, tomando microfilarias en su parte bucal. Las microfilarias evolucionan en la mosca al penetrar la pared del estómago, ingresando en los músculos torácicos y transformándose en larvas del primero y segundo estadio. Éstas maduran a las forma larvarias infectantes del tercer estadio para completar el ciclo vital.

dentales) son picados por mosquitos infectados, las larvas, debido a que están en un huésped equivocado, son incapaces de completar su ciclo vital. En cambio, se alojan y obstruyen las arteriolas pulmonares, donde se desarrollan en nódulos granulomatosos locales que, en ocasiones, alcanzan el tamaño suficiente para ser diagnosticados como lesiones numulares⁷⁷ en las radiografías. Las microfilarias nunca circulan en la sangre humana. El diagnóstico se efectúa mediante la observación histológica de las larvas de filarias inmaduras dentro de los nódulos granulomatosos pulmonares. Flieder y Moran⁸² realizaron una revisión reciente de 39 casos de infección pulmonar por dirofilarias comprobadas por histología. Alrededor de la mitad de este grupo era asintomático, con sólo un nódulo pulmonar

detectado en las placas radiográficas obtenidas en exámenes físicos de rutina; la mitad restante presentó síntomas respiratorios. Sólo el 10% presentó eosinofilia en sangre periférica.

Infecciones tisulares por protozoos

TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii es un parásito protozoo que tienen una predilección particular por infectar el SNC humano. Su ciclo vital se ilustra en la figura 22-25.

Tres modos de transmisión conducen a la mayoría de las infecciones humanas: 1) directamente por la ingestión de ooquistes infectantes en alimentos (p. ej., verduras de hoja sin lavar) o agua contaminada con heces de gato; 2) indirectamen-

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-22 Toxoplasmosis¹⁵⁴

En casos de toxoplasmosis humana puede encontrarse un amplio espectro de signos y síntomas. Sobre la base de la alta prevalencia de seropositividad en ciertas poblaciones, del 90% en algunas regiones del Salvador, Tahití y Francia (un promedio del 20% en los Estados Unidos),¹⁸² millones de personas sanas están o han estado infectadas por *Toxoplasma gondii*. Así, los síntomas están ausentes o son pasados por alto excepto en el 10% de los casos y la incidencia de la enfermedad progresiva es muy baja.

La toxoplasmosis aguda sintomática en personas inmunocompetentes se presenta como una linfadenopatía generalizada, en especial de la región cervical. Se acompaña por odinofagia, fiebre y mialgias, y la enfermedad en conjunto puede simular la mononucleosis infecciosa. En la mayoría de los casos la enfermedad es autolimitada; sin embargo, en raras oportunidades puede haber una enfermedad diseminada manifiesta. La miocarditis, la neumonitis y la encefalitis pueden aparecer en grados variables de intensidad y simular otras enfermedades diseminadas, como tuberculosis, sarcoidosis, tularemia, linfoma o leucemia. En los casos graves puede haber un desenlace mortal.

Se halló un aumento acentuado en la incidencia de la enfermedad sintomática entre varones homosexuales y en drogadictos intravenosos. De hecho, debe sospecharse SIDA o drogadicción en todo paciente diagnosticado con toxoplasmosis. La enfermedad suele localizarse en el SNC con síntomas de encefalitis o meningoencefalitis o con manifestación de una lesión ocupante.¹¹⁴ Puede progresar con rapidez y por lo general termina con la muerte si no se modifica el estado de inmunodepresión. La enfermedad pulmonar, cardíaca y linforreticular también puede estar presente. De modo típico, el LCR muestra concentraciones elevadas de proteínas y aumento de las células inflamatorias mononucleares.

Los taquizoítos que circulan en la sangre de una mujer embarazada infectada pueden atravesar la placenta y distribuirse en los tejidos fetales. Los recién nacidos de término con un componente completo de anticuerpos IgG materno a menudo resisten las infecciones; los recién nacidos prematuros o deficientes de anticuerpos son más sensibles a la enfermedad progresiva. Pueden observarse síntomas generales como esplenomegalia, ictericia, fiebre y linfadenopatía. El SNC es especialmente sensible y los síntomas pueden variar; entre los más frecuentes se observan deterioro de la visión, convulsiones, retraso mental, espasticidad, hidrocefalia, microcefalia y sordera. En los recién nacidos asintomáticos al nacer puede desarrollarse la enfermedad de comienzo tardío; en los casos sospechosos deben realizarse punciones raquídeas o subaracnoideas a fin de establecer el diagnóstico. Grover y cols.¹¹⁴ aplicaron la técnica de PCR para el diagnóstico precoz de la infección congénita por *Toxoplasma*. Esta técnica se basa en la lisis directa de las células centrifugadas del líquido amniótico seguida de amplificación por PCR de una secuencia génica específica de *T. gondii*. La PCR identificó correctamente la presencia de *T. gondii* en cinco muestras de líquido amniótico obtenidas de cuatro pacientes con infección congénita comprobada en el estudio citado.

El exudado del vítreo y la retinocoroiditis bilateral de la mácula son signos oculares frecuentes de la toxoplasmosis congénita. Los síntomas pueden no manifestarse hasta la segunda o tercera década de la vida. La coriorretinitis con visión borrosa, la fotofobia y el dolor ocular pueden observarse en los casos adquiridos; sin embargo, suele ser unilateral.

El tratamiento recomendado es pirimetamina, en dosis de 25-100 mg/día durante 3 a 4 semanas más espiramicina, 2-4 g/día durante 3 a 4 semanas en los adultos. Los niños deben recibir dosis de pirimetamina de 2 mg/kg/día durante 3 días (máximo, 25 mg/día), luego 1 mg/kg/día durante 4 semanas, más espiramicina 50-100 mg/kg/día durante 3 a 4 semanas.

te, por la ingestión de carne de animales cruda o poco cocida que tiene los ooquistes ingeridos (se estima que el 25% de la carne de cordero y de cerdo vendida en los supermercados contiene quistes tisulares viables) y 3) transplacentaria, transferida al feto de una madre infectada durante el embarazo. Las tasas de infección materna durante los años reproductivos se estiman entre el 3% y el 5%.⁸⁷ Las mujeres embarazadas debieran ser firmemente advertidas de que eviten la manipulación con gatos y la ingestión de carne poco cocida. Los síntomas clínicos pueden ser mínimos o estar ausentes en los estadios agudos de la infección y los recién nacidos pueden no mostrar los signos cardinales de la infección –retinocoroiditis, calcificación cerebral, hidrocefalia o microcefalia– durante varios meses o incluso años. Las infecciones adquiridas en los adultos suele manifestarse como linfadenitis y linfadenopatía, grados variables de miocarditis, meningoencefalitis, neumonía atípica y rinocoroiditis.

En las infecciones humanas participan dos estadios parasitarios. Tras la ingestión de los ooquistes o las formas infectantes enquistadas en carne deficientemente cocida se liberan los taquizoítos (lámina en color 22-10F) en el intestino delgado e invaden en primer lugar las células epiteliales de la mucosa a partir de las cuales ingresan en la circulación y luego se distribuyen ampliamente por el cuerpo. Puede haber un daño tisular considerable cuando los taquizoítos destruyen las células que parasitan; sin embargo, a medida que se desarrolla la respuesta inmunitaria, los taquizoítos se tornan menos activos y por último se agregan dentro de un quiste encerrado por una membra-

na (lámina en color 22-10G y H). Aunque inactivos, los taquizoítos dentro de estos quistes pueden permanecer viables durante semanas o años. Lo más común es que por último se desintegren y queden enredados en una cicatriz hialina o sufran calcificación. La detección de calcificación intracerebral en el cráneo en las radiografías es un método para establecer la infección previa.

Diagnóstico de laboratorio. El diagnóstico de la toxoplasmosis aguda puede realizarse mediante la demostración de grupos de taquizoítos en frotis teñidos con PAS o H-E. Las tinciones con técnicas de anticuerpos fluorescentes y peroxidasa-antiperoxidasa se han utilizado para demostrar mejor los organismos en tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina. Tal vez, los taquizoítos se observan mejor en aspirados con aguja o impresas teñidos con Wright-Giemsa.

- Los taquizoítos presentan una forma típica de arco, miden 3-4 × 6-7 µm y presentan un núcleo central oscuro (fig. 22-26 y lámina en color 22-10F).

La presencia de uno o más quistes en cortes de tejidos de pacientes suele indicar infección crónica y por lo general un estadio de infección inactiva, pero sirve como importante fuente de reactivación aguda de la toxoplasmosis.

- Los quistes miden hasta 200 µm de diámetro y contienen varios cientos de bradizoítos de 2-3 µm de diámetro (fig. 22-27 y lámina en color 22-10G y H).

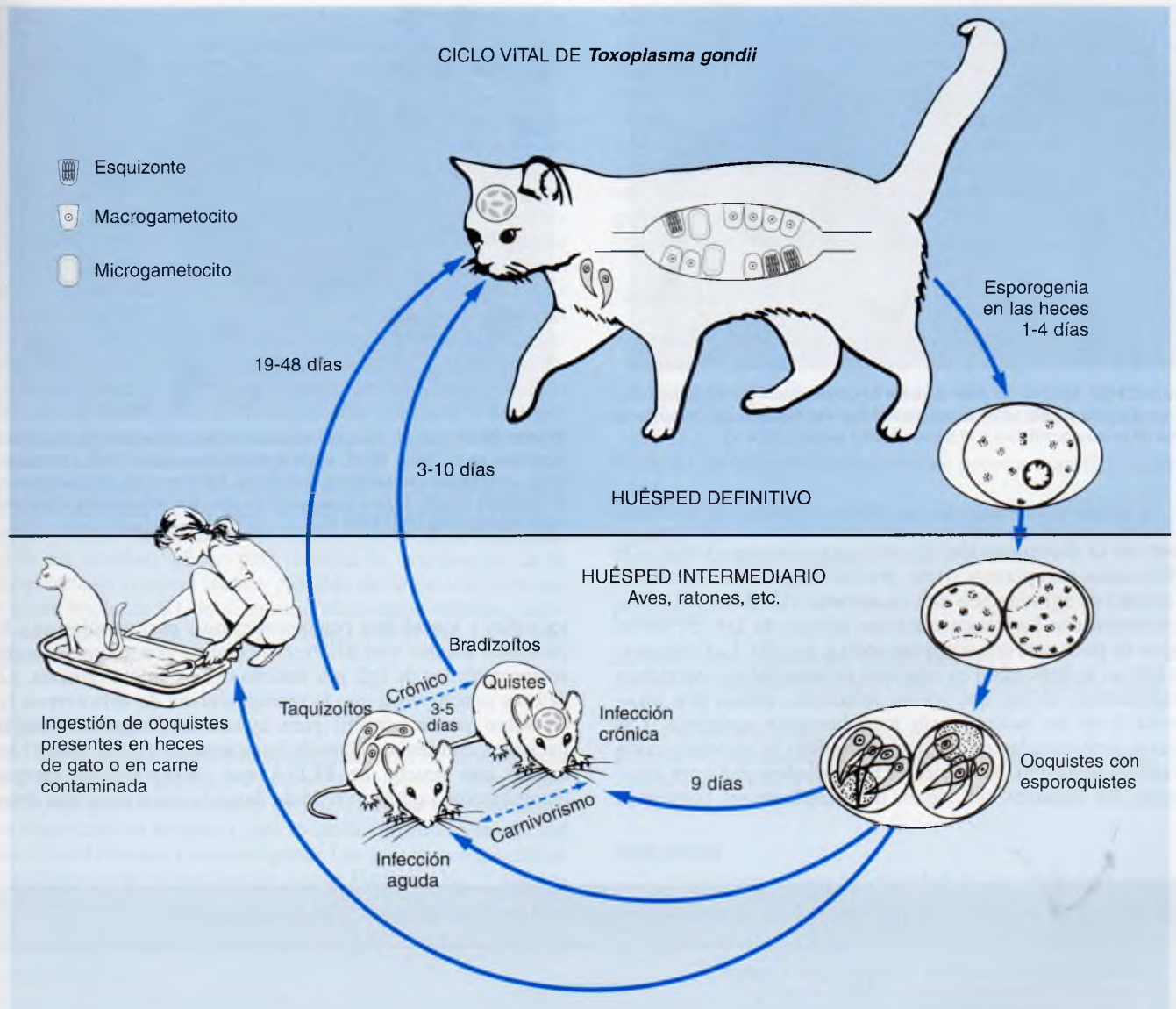


Figura 22-25 Ciclo vital de *Toxoplasma gondii*. El ciclo vital de *T. gondii* tiene estadios sexual y asexual. El estadio sexual se produce en el intestino de los gatos, donde los ooquistes infectantes, que miden entre 10 y 12 μm de diámetro, se replican dentro de las células epiteliales de la mucosa intestinal y se eliminan por las heces. El estadio asexual suele producirse en una diversidad de animales herbívoros y carnívoros que ingieren los ooquistes infectantes cuando comen en el suelo contaminado. Los seres humanos también se infectan por la ingestión de alimentos y agua contaminados con ooquistes. Las cucarachas, las lombrices de tierra, los caracoles y las babosas también pueden actuar como huéspedes de transporte para los ooquistes.

El diagnóstico serológico de toxoplasmosis es complejo y un análisis completo está más allá del alcance de esta presentación. Las investigaciones innovadoras, realizadas por McCabe y Remington,¹⁸² se resumen en el recuadro 22-6. Dada la alta prevalencia de títulos elevados de anticuerpos contra *Toxoplasma* en la población general, los resultados de la prueba deben interpretarse con cuidado antes de establecer un diagnóstico definitivo. La prueba de Sabin-Feldman, en honor de sus creadores, basada en el principio de que los taquizoítos vivos de *Toxoplasma gondii* pierden su afinidad por el colorante azul de metileno en presencia de suero inmune, es muy sensible y específica y aún sigue siendo el método de elección. No obstante, en la mayoría de los laboratorios de referencia se ha reemplazado por técnicas más nuevas para evitar la necesidad

de trabajar con organismos vivos. Asimismo, esta prueba mide anticuerpos IgG, que aparecen en el suero en el transcurso de 1 a 2 semanas después de la infección, alcanzan su máximo a las 6 a 8 semanas y declinan en los meses siguientes, pero en la mayoría de los pacientes nunca desaparecen por completo. Dado que los títulos en suero tan altos como 1:512 pueden persistir durante muchos años en personas sanas, las interpretaciones de muestras únicas deben evaluarse con cuidado.

En los últimos años se introdujeron varios métodos nuevos para el diagnóstico serológico de toxoplasmosis, que incluyen inmunoinmunoanálisis, ELISA, pruebas de aglutinación directa, inmunofluorescencia indirecta y técnicas de inmunocaptura e inmunotransferencia. Varias de estas pruebas fueron evaluadas por Cubitt y cols.⁴⁹ Wong y col.²⁹³ han evaluado las aplica-

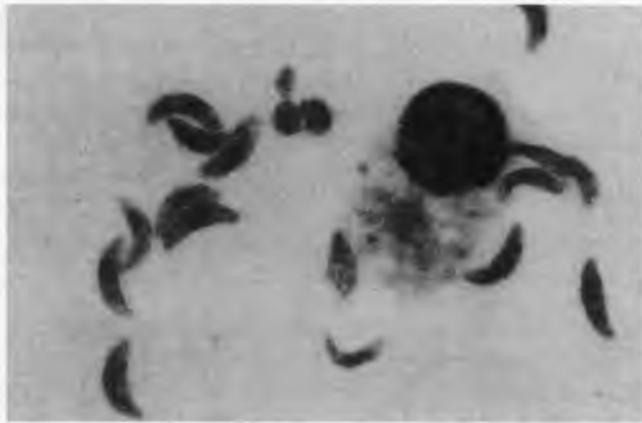


Figura 22-26 Imagen con gran aumento de un preparado por impronta teñido con Giemsa donde se observan trofozoitos del toxoplasma. Nótese la forma de arco característica y el núcleo central oscuro (1000 ×).

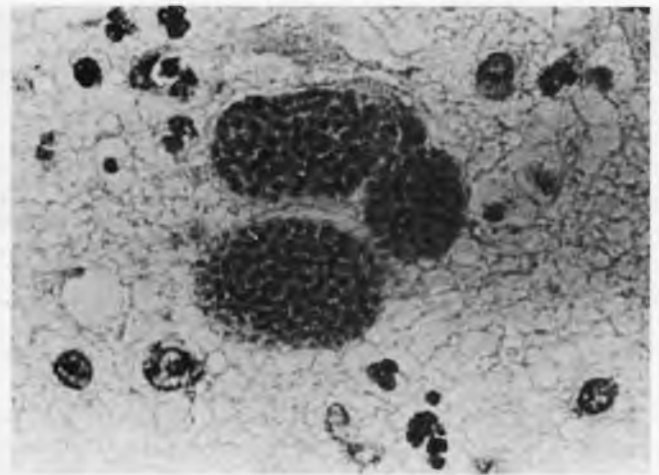


Figura 22-27 Imagen con gran aumento de los pseudoquistes de toxoplasma ilustrados en la figura 22-25. Cada pseudoquiste contiene varios trofozoitos. Estos pseudoquistes se observan con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad latente. Nótese la ausencia de reacción inflamatoria adyacente a estos pseudoquistes (H-E 1000 ×).

ciones de la determinación de anticuerpos inmunoglobulina E (IgE) contra toxoplasma como prueba diagnóstica. Mediante un estudio de aglutinación inmunosorbente (ISAGA) y ELISA, se determinaron las concentraciones séricas de IgE en varios grupos de pacientes con toxoplasmosis y sin ella. Los anticuerpos IgE no se detectaron en muestras de suero de los individuos seronegativos, en los que tenían infección crónica por toxoplasma o en los lactantes sin toxoplasmosis congénita. Las mujeres embarazadas en las que se produjo la seroconversión durante la gestación, los pacientes con linfadenopatía por toxoplasma, los lactantes con signos de toxoplasmosis congénita,

los niños y los adultos con coriorretinitis por toxoplasma y los pacientes adultos con SIDA y encefalitis por toxoplasma presentaron títulos de IgE por encima de los valores límites. Los autores concluyeron que la recrudescencia de anticuerpos IgE en suero puede ser útil para ayudar al diagnóstico en los pacientes con reactivación de la enfermedad. Li y cols.¹⁶⁴ han creado una prueba de ELISA que incorpora una proteína recombinante (antígeno rP35 de *Toxoplasma gondii*) que detec-

Recuadro 22-6 Interpretación de los resultados serológicos en los síndromes clínicos de toxoplasmosis¹⁸²

A. Toxoplasmosis adquirida aguda: paciente inmunocompetente.

El diagnóstico puede tener un alto grado de sospecha si:

1. Se demuestra la seroconversión de negativa a positiva.
2. Un aumento de dos veces en el título entre la muestra basal y otra prueba repetida 3 semanas más tarde.
3. Un título elevado de IgM con un único título elevado de IgG (> 1:1 000).
4. Un título bajo de IgM indica que la infección se adquirió hace 4 meses o más. El título de IgM suele revertir a lo normal dentro de los 9 meses.

Nota: una prueba de Sabin-Feldman o de inmunofluorescencia negativa en una persona inmunocompetente casi siempre descarta el diagnóstico de toxoplasmosis aguda.

B. Toxoplasmosis adquirida aguda: paciente no inmunocompetente.

Los criterios citados para los pacientes inmunocompetentes se aplican también a los individuos no inmunocompetentes. Sin embargo, los anticuerpos IgM o el aumento de dos veces en los anticuerpos IgG a menudo no se detectan; por consiguiente, una prueba negativa no descarta toxoplasmosis aguda. Los organismos deben demostrarse en biopsias de tejido o frotis por impronta de aspirados antes de que pueda realizarse un diagnóstico seguro en este grupo de pacientes.

C. Toxoplasmosis ocular.

El diagnóstico puede sospecharse si:

1. Títulos bajos de anticuerpos IgG en presencia de una lesión retiniana típica.
2. Si la relación de anticuerpos "C" es igual o mayor de 8 utilizando la siguiente fórmula cuando se prueba líquido de humor acuoso:

$$C = \frac{\text{Título de anticuerpos en el humor acuoso} \times \text{concentración de } \gamma\text{-globulina en suero}}{\text{Título de anticuerpos en suero} \times \text{concentración de } \gamma\text{-globulina en el humor acuoso}}$$

D. Toxoplasmosis congénita.

El diagnóstico de infección por toxoplasma en el recién nacido puede establecerse si:

1. Hay un título persistente o que se eleva en la prueba de Sabin-Feldman o en la inmunofluorescencia.
2. Se demuestra una prueba de IgM positiva con cualquier título después del nacimiento en ausencia de filtración placentaria (la prueba preferida es DS-IgM-ELISA) en biopsias de tejido o frotis por impronta de los aspirados.

ta anticuerpos IgG producidos sólo durante el estadio agudo de la infección; por eso sirve como marcador serológico para diferenciar entre infección adquirida en forma reciente e infección antigua latente.

Las técnicas de detección de antígeno también mejoraron de manera significativa en los últimos años, en especial con la introducción de la técnica de PCR. Varias publicaciones describen el gen B1 de *T. gondii* como el marcador para ser detectado por amplificación génica por PCR.^{79,134,153,205} El procedimiento de amplificación del gen B1 es lo suficientemente sensible para detectar un único parásito aislado y tan poco como 10 parásitos sobre un fondo de 100 000 leucocitos.²⁰⁵ Las técnicas de amplificación génica son más sensibles y pueden reemplazar a los cultivos de células como métodos de elección para detectar parasitemia por toxoplasma.¹³⁴ La detección de ésta en pacientes con SIDA que presentan fiebre inexplicada o alteraciones del sistema nervioso central mediante la determinación génica tras la amplificación por PCR también resulta promisorio.⁷⁹ El examen de sangre por PCR puede ser útil además en el diagnóstico de toxoplasmosis extracerebral proveniente de la reactivación local de quistes cerebrales latentes.⁷⁴ Dupon y cols.⁷³ hallaron que el examen por PCR de LCR sangre es un auxiliar valioso para detectar la reactivación de la toxoplasmosis cerebral latente. Además de detectar secuencias de ácido nucleico B1 de *T. gondii*, citan otros estudios satisfactorios que utilizan genes p30, TGR1 y el rDNA 18S como objetivos.

PNEUMOCYSTIS JIROVECI

En la actualidad y sobre la base del análisis de la secuencia del DNA, por su genética, *Pneumocystis jiroveci*, denominación actual para *Pneumocystis carinii*, está más estrechamente vinculado con los hongos y, por lo tanto, ha sido reclasificado como una levadura ascospórica. Los criterios específicos para realizar esta reclasificación, según Hadley y Ng,¹¹⁶ son los siguientes:

- *P. jiroveci* y los hongos tienen ultraestructuras similares de las paredes celulares.
- Las crestas de las mitocondrias de *P. jiroveci* son laminillares (los protozoos presentan crestas tubulares).
- Las formas quísticas que contienen cuerpos intraquísticos remedian a las ascosporas que forman los Ascomycota.
- Tiene una alta homología de los dominios más conservados de la subunidad 16S del rRNA con Ascomycota.
- El gen de β -tubulina presenta una homología del 89-91% con el de los hongos filamentosos.
- *P. jiroveci* tiene proteínas separadas para las actividades de timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa (los protozoos producen una única proteína bifuncional).
- Las subunidades 1, 2, 3 y 6 de la NADH deshidrogenasa; la subunidad II de la citocromo oxidasa y una subunidad pequeña del rRNA tienen una similitud promedio del 60% con los hongos (sólo del 20% con los protozoos).

Infecciones parasitarias por otras larvas tisulares

Los seres humanos pueden ser huéspedes accidentales involuntarios de diversos nematodos y cestodos que tienen ciclos vitales en otros animales. Los adultos de estas especies suelen residir en el tubo digestivo o en tejidos determinados de los huéspedes definitivos; las personas se infectan mediante la ingestión de las larvas en carne poco cocida o por la ingestión

de huevos fértiles. De particular preocupación en los Estados Unidos es la posibilidad de una mayor exposición a una diversidad de helmintos a través de la ingestión de peces o frutos de mar crudos como sushi, sashimi, salmón lomi lomi, arenque en vinagre y similares. Como los seres humanos no son los huéspedes definitivos naturales para algunos de estos parásitos, las larvas a menudo migran sin rumbo entre tejidos y órganos, ya sea formando lesiones cisticercoides o áreas de inflamación granulomatosa. Se brinda una breve descripción de las siguientes enfermedades causadas por larvas de parásitos.

Nematodos

- Trichinella spiralis* (nematodo intestinal de cerdos, osos, morsa)
- Toxocara canis* o *Toxocara cati* (áscaris de perros y gatos)
- Ancylostoma braziliense* o *A. caninum* (uncinaria de perros y gatos)
- Especies de *Anisakis* (nematodos de peces o mamíferos marinos)
- Gnathostoma spinigerum* (nematodo gástrico de perros y gatos)
- Especies de *Angiostrongylus* (ratas)

Cestodos

- Echinococcus granulosus* (tenia del perro)
- Echinococcus multilocularis* (tenia de perros, zorros, lobos y gatos)
- Especies de *Multiceps* (cenurosis)
- Spirometra mansonoides* (esparganosis) (tenia *Diphyllobothrium* de perros o gatos)

TRIQUINOSIS

La triquinosis es una enfermedad de los carnívoros causada por la infección con el nematodo *Trichinella spiralis*, que resulta de la ingestión de carne cruda o poco cocida. Los seres humanos son huéspedes accidentales y lo más frecuente es la infección a través de la ingestión de cerdo o sus derivados que contienen larvas enquistadas.¹⁰⁸ También se informaron infecciones tras la ingestión de carne de oso cocida de manera deficiente.⁴¹ El ahumado, el salado o el desecado de la carne no destruye las formas larvianas infectantes; sin embargo, la congelación prolongada (en promedio 20 días en el congelador del hogar) descontamina la carne. La enfermedad presenta una distribución mundial; en 1968 se encontró en los Estados Unidos que el 4% de los cadáveres humanos estaban infectados. En 1985, se informaron menos de 50 casos nuevos por año,⁴¹ un tributo al programa de inspección de la carne y a las leyes estrictas contra la alimentación de los cerdos con desechos no cocidos.

El ciclo vital en las infecciones humanas se inicia con la ingestión de las larvas infectantes provenientes de la carne poco cocida. El ciclo vital se ilustra en la figura 22-28.

Las manifestaciones clínicas de la triquinosis se presentan en el recuadro de correlación clínica 22-23.

Diagnóstico de laboratorio. La forma más común de realizar el diagnóstico de laboratorio de la triquinosis es mediante la detección de las larvas espiraladas en el tejido muscular (lámina en color 22-11G y H). El músculo deltoides de la parte superior del brazo y el gastrocnemio de la pantorrilla suelen elegirse para la biopsia. La muestra puede examinarse con el microscopio tras la digestión de las fibras musculares con tripsina y

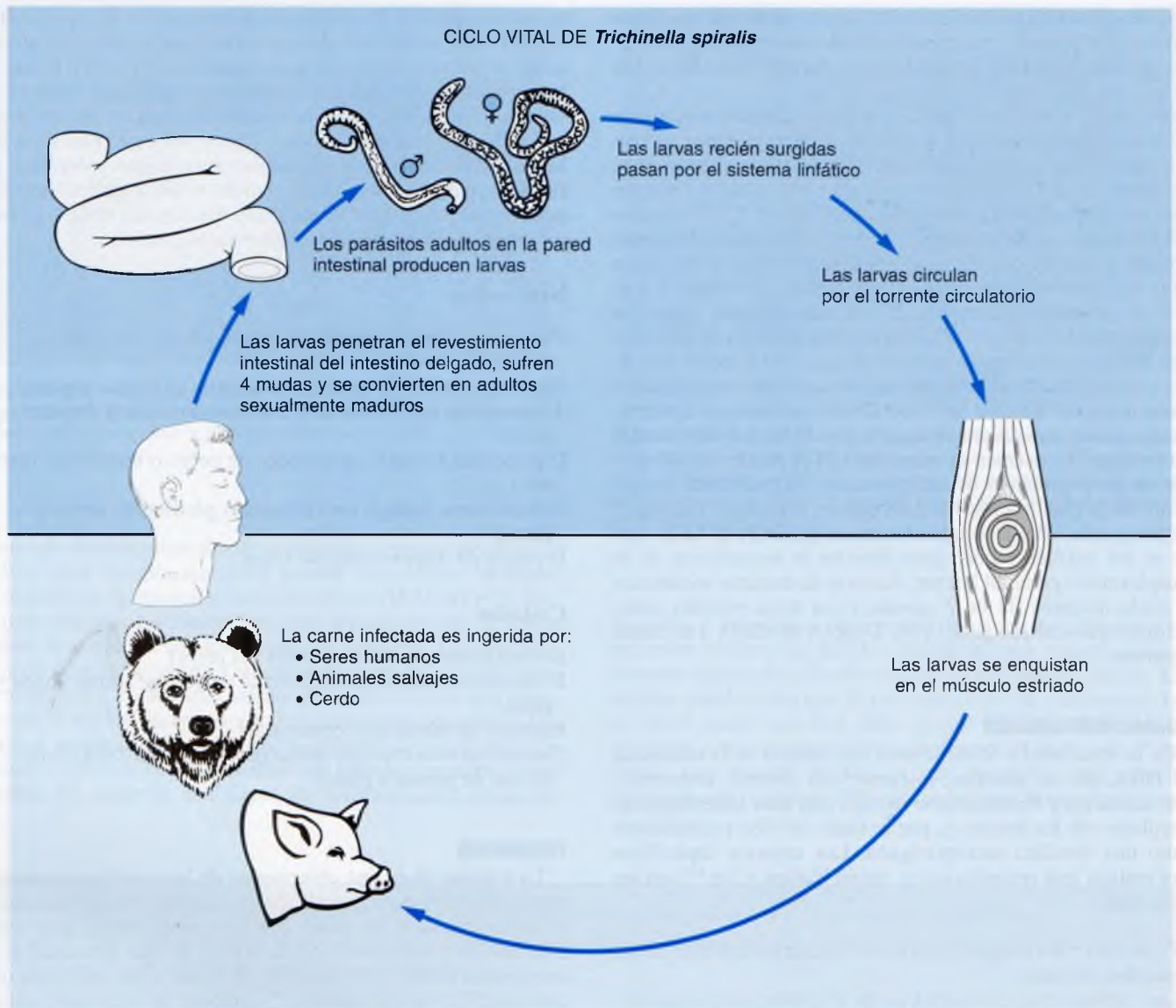
CICLO VITAL DE *Trichinella spiralis*

Figura 22-28 Ciclo vital de *Trichinella spiralis*. Cuando los seres humanos ingieren carne contaminada con triquinosis, se liberan las larvas enquistadas en el intestino y se introducen en las vellosidades. Las larvas maduran, copulan y se convierten en parásitos adultos machos y hembras que miden de 2 a 4 mm de longitud. El promedio de vida de los adultos en el intestino humano es de alrededor de un mes. Durante este tiempo, cada hembra libera cerca de 3 000 larvas, las que viajan a través del sistema linfático, ingresan en la circulación y se depositan en los tejidos del cuerpo. Casi todas las larvas mueren; sin embargo, muchas de las que alcanzan el músculo esquelético se enquistan y sobreviven. El período de mayor invasión muscular es alrededor de los 10 días después de la infección. Entre los 17 y 20 días, estas formas larvianas se diferencian y encapsulan, y forman una espiral dos veces y media sobre sí mismas, rodeadas en un comienzo por una reacción inflamatoria aguda y más tarde por una reacción crónica granulomatosa. (Lámina en color 20-11G y H). Las fibras musculares adyacentes se degeneran, lo que deja un quiste que mide entre 0,25 mm y 0,50 mm. En cerca de 3 meses los parásitos mueren y las lesiones quísticas sufren un proceso de calcificación que se completa en 6 a 12 meses.

realizando el montaje de parte del tejido digerido sobre un portaobjetos. En forma alternativa puede efectuarse la preparación presionando un fragmento pequeño de músculo con una gota de solución fisiológica entre dos portaobjetos; en cualquiera de los casos se buscan con el microscopio las formas larvianas enrolladas. Las formas lineales o espiraladas de las larvas también pueden observarse en cortes de tejidos teñidos, aunque su morfología no suele estar bien delineada.

Las pruebas serológicas también son útiles para realizar el diagnóstico. Mahannop y cols.,¹⁷⁵ mediante el empleo de antígenos crudos obtenidos del estadio larvario infectante de

Trichinella spiralis en un sistema de ELISA para la detección de anticuerpos séricos de la clase IgG contra *T. spiralis*, informaron una sensibilidad del 100% en un grupo de pacientes con triquinosis confirmada. Estos autores hallaron reacciones cruzadas en los sueros de pacientes con capilariasis, gnathostomiasis, opistorquiasis y estrogiloidiasis.

LARVA MIGRANS VISCERAL

Toxocara canis, el nematodo intestinal del perro, con un ciclo vital similar al de *Ascaris lumbricoides* humano, es la

RECUADRO DE CORRELACIÓN CLÍNICA 22-23 Triquinosis

En la mayoría de los casos, los síntomas son leves, ya que la cantidad de larvas suele ser pequeña. Muchos individuos presentan síntomas gripales. El número mínimo de larvas ingeridas para producir síntomas es de alrededor de 100 y una dosis mortal se estima en 300 000.¹⁰⁸ Con la ingestión de carne contaminada, los primeros síntomas en aparecer son los gastrointestinales, como náuseas, diarrea y cólicos abdominales, lo que sugiere una intoxicación aguda por alimentos. Estos síntomas pueden persistir con grados variables de intensidad durante 10 semanas. Durante el estadio de invasión larvaria puede haber dolor, tumefacción y debilidad de los músculos afectados, acompañados por fiebre. La eosinofilia en sangre periférica, con recuentos diferenciales que alcanzan hasta el 50%, se observa durante el estadio de invasión muscular. El edema periorbitario es un signo diagnóstico, ya que los músculos extraoculares suelen estar afectados. El daño a los músculos puede ocasionar trastornos para masticar, deglutir y respirar según los músculos afectados y el grado de compromiso. Entre el 10% y el 20% de los pacientes presentan síntomas del SNC en grados variables, como polineuritis, miastenia grave o paresia de grupos musculares localizados. La miocarditis aguda es la complicación más grave, que puede causar la muerte en casos en que la cantidad de parásitos es importante. Watt y cols.²⁷⁷ hicieron una evaluación de los fármacos antiparasitarios eficaces para la miostitis por *Trichinella*. El tratamiento recomendado es mebendazol, en dosis de 200-400 mg tres veces por día durante 3 a 5 días

causa más frecuente de larva migrans humana. La larva migrans es una enfermedad en la cual las larvas de nematodos de animales inferiores migran en los tejidos de los seres humanos sin el desarrollo ulterior. Puede estar causada por diferentes especies de parásitos y afectar tejido cutáneo o visceral, según las áreas del cuerpo afectadas y los parásitos implicados.

En la infección por *T. canis*, los seres humanos se convierten en un huésped accidental a través de la ingestión de huevos embrionados presentes en el suelo. La enfermedad es más frecuente en los niños por la ingestión inadvertida de tierra y su estrecha relación con los perros. Los huevos embrionados eclosionan en el intestino del huésped humano, liberan las larvas, las que a su vez penetran la pared intestinal e ingresan en la circulación. Sin embargo, como los seres humanos son huéspedes anormales, el ciclo pulmonar no se completa; en cambio, las larvas quedan retenidas en diversos órganos, en especial el hígado. Pueden causar reacciones tisulares locales o granulomas, pero por último mueren sin secuelas. La infección puede sospecharse en un niño con hepatomegalia, enfermedad pulmonar inespecífica y un grado elevado de eosinofilia en sangre periférica que puede llegar al 50-90%.

Aunque el diagnóstico definitivo sólo se confirma por la identificación de larvas en muestras de autopsia o biopsia, se recomienda la comprobación serológica para dirigir la terapéutica. Los títulos en suero de 1:32 o mayores son indicativos de larva migrans visceral; un título de 1:8 se considera diagnóstico de larva migrans ocular. La detección de títulos elevados en muestras de líquido ocular es confirmatoria de esta última enfermedad. Buijs y cols.²⁴ comunicaron que la seroprevalencia de *Toxocara* en los niños pequeños en edad escolar en Holanda a partir de 1994 era del 11% en La Haya y del 6% en Rotterdam. Encontraron una correlación significativa de asma recurrente y bronquitis en los niños seropositivos para *Toxocara* y especularon que el aumento de la IgE específica

para el alérgeno en estos pacientes puede ser el determinante del asma. Jacquier y cols.¹⁴⁵ evaluaron un equipo de ELISA comercializado por Biokema-Affinity Products (Crissier-Lausanne, Suiza), que se basa en la detección de antígeno excretor/secretor proveniente de las larvas de segundo estadio de *T. canis*. En un estudio de 1 000 muestras de suero recogidas al azar de donantes de sangre sanos y niños de Suiza, la seroprevalencia de toxocariasis fue del 2,7%. De las muestras positivas, el equipo de Biokema mostró una sensibilidad diagnóstica global del 91% y una especificidad del 86%. La menor especificidad se debió a la reactividad cruzada con filariasis, strongiloidiasis e infección por *Trichinella*. En la interpretación de los resultados serológicos se debe recordar que un porcentaje pequeño de la población estadounidense, estimada en el 2%, puede tener títulos residuales bajos por alguna infección anterior.

LARVA MIGRANS CUTÁNEA – TOXOCARA

Las larvas filariformes de las uncinarias del perro o del gato, por lo general de las especies *Ancylostoma braziliense* y *A. caninum*, pueden penetrar la piel expuesta de los seres humanos y causar un trastorno popular y pruriginoso conocido como "erupción reptante". Las larvas penetran en la profundidad del tejido subcutáneo y producen trayectos lineales que se extienden varios milímetros por día. Las principales manifestaciones clínicas locales de las infecciones cutáneas son el impétigo, las reacciones alérgicas vesiculares y el prurito intenso, que persisten por períodos prolongados. La migración a los tejidos profundos puede conducir a infecciones pulmonares. Las infecciones por especies de *Ancylostoma* deben incluirse en el diagnóstico diferencial cuando se detecta eosinofilia en sangre periférica y cristales de Charcot-Leyden en la microscopia de las muestras de esputo. El diagnóstico se realiza por los antecedentes de exposición y la presencia de trayectos lineales subcutáneos. Tremblay y cols.²⁶⁶ describieron un brote de larva migrans cutánea en un gran porcentaje de un grupo de 140 turistas en Barbados. Los factores de riesgo fueron la edad más joven, el uso infrecuente de calzado protector y caminar con los pies desnudos por la playa.

Las biopsias de lesiones sospechosas a menudo suelen ser de escasa ayuda para establecer el diagnóstico, ya que sólo muestran un infiltrado celular eosinófilo. Yamasaki y cols.²⁹⁹ han desarrollado un antígeno recombinante de *Toxocara canis* que resultó altamente específico para toxocariasis, lo que proporciona un procedimiento diagnóstico fiable en los ámbitos donde se dispone de este método. Camous²⁸ informó el tratamiento satisfactorio de esta enfermedad con una única dosis de 400 mg de albendazol por vía oral (tasa de curación, 46-100%) o una única dosis de 12 mg de ivermectina (tasa de curación, 81-100%).

ANISAKIASIS

La anisakiasis es una enfermedad zoonótica en la que los seres humanos, a través de la ingestión de peces o frutos de mar crudos, ahumados o en vinagre como sushi, sashimi, salmón lomi lomi, arenque en vinagre y similares, se convierten en huéspedes accidentales para las larvas de nematodos que pertenecen a los géneros *Anisakis*, *Phocanema* y *Contracaecum*. El número de infecciones en los Estados Unidos ha aumentado a medida que se hizo más popular la comida con pescado crudo como los nombrados. Deardorff y Kent⁶⁸ informaron que sólo el salmón del Pacífico (Rey o Cheenok) estaba infectado; el

salmón del Atlántico estaba libre de infección. Por lo tanto, el conocimiento del origen del pescado fresco puede ayudar a evitar las infecciones.

Al ingresar en el estómago con la carne de pescado contaminada, las larvas penetran en la pared intestinal, forman túneles pequeños y hurgan entre una densa reacción inflamatoria granulomatosa. En algunos casos se identifican úlceras de la mucosa. En el transcurso de las 24 horas de la ingestión del pescado contaminado pueden presentarse náuseas y vómitos. Las manifestaciones tardías comprenden dolor abdominal alto, periódico y agudo, y diarrea, que simulan gastritis, úlcera duodenal o, en oportunidades, apendicitis aguda. Daschner y cols.⁵² informaron manifestaciones alérgicas de hipersensibilidad en una serie de 40 pacientes con anisakiasis. Los síntomas frecuentes de presentación son urticaria, angioedema, eritema, broncoespasmos y grados variables de anafilaxia. Lopez-Serrano y cols.¹⁶⁹ publicaron 22 casos más de pacientes con anisakiasis gastroalérgica. Dos o más parásitos se detectaron por gastroscopia en tres de estos pacientes. Moneo y cols.¹⁸⁶ demostraron que estas reacciones alérgicas se debían a un poderoso alérgeno (Ani S 1) producido en la glándula excretora del parásito adulto *Anisakis simplex*. Como estos síntomas a menudo son más tardíos, el diagnóstico de anisakiasis puede ser difícil, pero debe considerarse, en especial si hay antecedentes clínicos de ingestión de pescado crudo o deficientemente cocido. En ocasiones, la larvas de *Anisakis* migran más allá del estómago y producen infecciones metastásicas en el epiplón, el hígado, el páncreas y los pulmones.²³³ Ikeda y cols.¹⁴² comunicaron el tratamiento exitoso de nueve pacientes con anisakiasis gástrica mediante la eliminación de las larvas del parásito causal por endoscopia, lo cual alivió de inmediato el dolor abdominal agudo. La extirpación quirúrgica del granuloma parasitario, la administración de tiabendazol, en dosis de 25 mg/kg tres veces por día durante 3 días o ambos es la terapéutica recomendada.

Yaquihashi y cols.³⁰¹ informaron el diagnóstico exitoso de anisakiasis con un microanálisis inmunosorbente ligado a enzimas, con anticuerpos monoclonales dirigidos contra larvas específicas de *A. simplex*. Sin embargo, este enfoque está limitado a algunos laboratorios de investigación o de referencia, ya que hasta ahora no se cuenta con reactivos comerciales.

GNATOSTOMIASIS

Gnathostoma spinigerum es un nematodo que normalmente infecta el aparato digestivo de gatos y perros; no obstante, los seres humanos se convierten en huéspedes accidentales por la ingestión de mariscos poco cocidos o en vinagre que contienen las formas larvarias inmaduras. La enfermedad es endémica en gatos y perros en el Lejano Oriente. Tras la ingestión del pez contaminado por un perro o un gato, las larvas liberadas evolucionan en el estómago o la pared intestinal en adultos que quedan encerrados en nódulos inflamatorios granulomatosos. Sin embargo, en los seres humanos las larvas no maduran; en cambio, penetran la pared gástrica y migran por los tejidos. Se forman túneles cutáneos o subcutáneos profundos que simulan la larva migrans cutánea, o pueden aparecer tumefacciones duras y dolorosas, no depresibles. Hira y cols.¹³³ comunicaron el caso de un residente tailandés que vivía en Kuwait que presentó dolor agudo en la fosa ilíaca derecha. Se le extirpó una masa del íleon terminal y del ciego que reveló parásitos machos inmaduros de *G. spinigerum*. Hace poco, Grobusch y cols.¹¹³ publicaron un caso de granuloma cutáneo del brazo de una mujer de Bangladesh que vivía en Alemania. También se observó eosio-

nofilia marcada y aumento manifiesto de IgE. El diagnóstico se realizó con la demostración de anticuerpos séricos específicos contra *Gnathostoma* mediante el empleo de la técnica de enzimoanálisis.

ANGIOESTRONGILIASIS

La angiostrongiliasis está causada por las larvas de los nematodos que en su estadio adulto viven en ratas como su huésped definitivo. La enfermedad se presenta en los seres humanos en dos formas clínicas, de acuerdo con la especie: *A. cantonensis*, endémico de Tailandia, Tahití y Taiwán entre otras regiones del sur del Pacífico, causa un síndrome de meningitis, pleocitosis eosinófila en LCR y eosinofilia en sangre periférica (conocida como meningitis eosinofílica). *A. costaricensis*, el parásito pulmonar de la rata, endémico sobre todo en Costa Rica, con casos también informados en México y en América Central y del Sur, causa enfermedad abdominal, en especial en la parte distal del intestino delgado y el colon ascendente, los sitios de penetración de las larvas en desarrollo.

La hembra adulta produce huevos en el sitio de infección en el pulmón de la rata, que son deglutidos y eliminados por las heces. Las babosas, los caracoles de tierra y otros moluscos (con menor frecuencia también los langostinos de agua dulce, los cangrejos de tierra y las ranas) ingieren estos huevos y actúan como huéspedes intermediarios dentro de los cuales se desarrolla la larva infectante del tercer estadio. Los seres humanos adquieren la infección mediante la ingestión de alimentos, por lo general vegetales de hojas, contaminados con caracoles y babosas infectados. Tras la ingestión por los seres humanos, las larvas migran al cerebro y causan la meningitis eosinofílica. Los síntomas varían desde cefalea leve, rigidez de cuello y debilidad hasta los síntomas típicos que incluyen náuseas, vómitos, erupción cutánea pruriginosa y diversos síntomas neurológicos, como parestesias, parálisis del cuarto y el sexto par craneal e infecciones con gran cantidad de parásitos, coma y muerte.

Witoonpanich y cols.²⁹¹ informaron dos casos mortales de tres pacientes infectados de una familia. Dos días después de la ingestión de caracoles del género *Pila*, apareció una erupción maculopapular generalizada y pruriginosa en los tres pacientes, seguida de mialgias, parestesia acentuada, fiebre y cefalea. Dos de los pacientes manifestaron debilidad en los miembros, retención de orina y obnubilación que progresó al coma con un desenlace mortal. La autopsia reveló trayectos y cavidades múltiples con la presencia de *A. cantonensis* en el cerebro y en varios niveles de la médula espinal.

En el huésped normal, la rata, los parásitos adultos de *A. costaricensis* ocupan las arterias y las arteriolas de la porción ileocecal del intestino. Los huevos depositados en el tejido de la rata eclosionan y se eliminan por las heces. Las babosas también actúan como huéspedes intermediarios y los seres humanos se infectan por la ingestión de alimentos contaminados por ellas. Las larvas penetran los tejidos en la porción ileocecal del intestino humano, incluso el apéndice, donde una combinación de parásitos adultos y huevos depositados causa una reacción inflamatoria granulomatosa intensa que da por resultado la formación de una masa similar a un tumor. Hulbert y cols.¹⁴¹ informaron dos casos de infecciones por *A. costaricensis* en niños adquiridas dentro de los Estados Unidos. Un paciente presentó síntomas sugestivos de apendicitis aguda; el otro, un posible divertículo de Meckel.

El diagnóstico suele hacerse en pacientes de áreas endémicas sobre la base de los síntomas descritos junto con el aumen-

to de eosinófilos en el líquido cefalorraquídeo y la sangre periférica. Las larvas o los parásitos adultos jóvenes pueden aislarse en el LCR. El aumento del título de anticuerpos por ELISA, en especial cuando se encuentra en suero y LCR, también puede ayudar al diagnóstico.³⁰¹

HIDATIDOSIS (ENFERMEDAD HIDATÍDICA O EQUINOCOCOSIS)

La hidatidosis es quizás una de las enfermedades parasitarias más difíciles de comprender por las lesiones quísticas peculiares que se forman cuando los estadios larvarios del parásito invaden las vísceras. Pueden encontrarse dos especies con cierta morfología y patrones de comportamiento algo diferentes: *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*. Los seres humanos actúan como huéspedes accidentales para ambas especies. El ciclo vital normal de *E. granulosus* abarca perros o zorros como huéspedes definitivos, en cuyos intestinos residen las tenias adultas. Miden cerca de 3-6 mm de longitud y tienen tres proglótides y un escólex armado con una doble corona de ganchos (lámina en color 22-11F). Las ovejas, las vacas o los cerdos actúan como huéspedes intermediarios en los que se desarrolla la enfermedad quística larvaria, descrita más adelante. *Echinococcus multilocularis* difiere en que los huéspedes definitivos son perros, zorros, lobos y gatos, mientras que los huéspedes intermediarios son pequeños roedores, como ardillas y ratones de campo. Si los seres humanos se infectan, también son huéspedes intermediarios que albergan la forma larvaria del parásito. El ciclo vital se ilustra en la figura 22-29.

Los quistes de *E. granulosus* crecen con lentitud y suelen permanecer inactivos durante muchos años. Sólo en raras oportunidades se rompen, a veces en la vía biliar y otras a través de la cápsula hepática en la cavidad peritoneal. Si el quiste se rompe, ya sea de modo espontáneo o durante la cirugía, el peligro de muerte por shock anafiláctico es elevado. En casi todos los órganos pueden formarse lesiones quísticas metastásicas si el quiste primario se rompe. Si el material del quiste se disemina al revestimiento peritoneal puede haber una proliferación masiva con invasión vascular y diseminación a otros órganos. En ocasiones, pueden hallarse quistes cerebrales. Los quistes de *E. multilocularis* crecen con más rapidez, con invasión del parénquima hepático que simula un carcinoma. En la lámina en color 22-11B y C se ilustran ejemplos de quistes hidatídicos.

Diagnóstico de laboratorio. El diagnóstico de laboratorio puede realizarse mediante la demostración de los quistes hijos o las cápsulas prolíferas con protoescólices en el tejido extirpado por cirugía. El revestimiento interno del quiste es la membrana germinativa de la cual se forman numerosos embriones hijos. Estas formas son estructuras polipoides diminutas (cápsulas prolíferas) que recubren la membrana reproductiva interna a partir de la cual se producen grandes cantidades de quistes hijos (arenilla hidatídica) (lámina en color 22-11D). Cuando los embriones se liberan de la membrana y flotan en el líquido dentro del quiste, se conocen como **arenilla hidatídica** (lámina en color 22-11E). Si se examina con el microscopio, cada grano de arena es, de hecho, un embrión diminuto que representa el comienzo de una tenia nueva completa, con el escólex invertido y el rostelo armado con ganchos (lámina en color 22-11H).

Varias técnicas inmunodiagnósticas permiten confirmar el diagnóstico clínico. En 1992 Gottstein¹⁰⁷ realizó una revisión global de los enfoques molecular e inmunológico para el diagnóstico de la enfermedad hidatídica. Casi todas las técnicas inmunodiagnósticas implican la detección de anticuerpos específicos para *Echinococcus* en el suero de pacientes en los que

se sospecha la enfermedad mediante una diversidad de antígenos crudos. El problema con los métodos que emplean este tipo de antígenos es la reactividad serológica cruzada de las pruebas para anticuerpos contra la hidatidosis con otras enfermedades parasitarias, cirrosis hepática y collagenopatías. Los problemas con la reactividad cruzada se han mejorado de modo sustancial con el desarrollo de un antígeno seleccionado conocido como arco 5. En un estudio realizado por Schantz y McAuley,²³⁸ se observó que un porcentaje elevado de personas positivas para el arco 5 con posterioridad albergaban quistes hidatídicos. Se demostró reactividad cruzada del antígeno del arco 5 en sueros de pacientes con cisticercosis; sin embargo, en estos casos el diagnóstico diferencial se realiza por la clínica.

Verastegui y cols.²⁷¹ brindan un análisis de inmuno-electrotransferencia ligado a enzima para el diagnóstico de la enfermedad hidatídica que sortea el problema de la reactividad cruzada con la cisticercosis. El antígeno, preparado del líquido hidatídico bovino liofilizado, contiene tres bandas de 8, 16 y 21 kDa, que reaccionan de modo cruzado en sólo el 12,4% y el 4%, respectivamente, de los sueros provenientes de pacientes con cisticercosis, una reducción significativa respecto de la mayor parte de los métodos de ELISA. Los ensayos inmunoenzimáticos más nuevos proveen sensibilidad y especificidad mayores del 90% para la detección de anticuerpos específicos contra *Echinococcus*. Mediante el procedimiento de ELISA, Poretti y cols.²¹⁹ demostraron sensibilidad del 91% y especificidad del 82% para detectar antígeno específico de *E. granulosus* en el análisis directo de líquido de quiste, lo que provee una discriminación del 99% entre casos seropositivos de hidatidosis e infecciones parasitarias no causados por cestodos o procesos malignos. Helbig y cols.¹²⁶ pudieron diferenciar entre enfermedad quística y alveolar con un análisis que utiliza antígenos larvarios recombinantes que resultaron más específicos que las imágenes radiológicas. La evolución de la PCR junto con la producción de sondas de DNA específicas resultan muy promisorias en el diagnóstico de la hidatidosis, en especial en la detección del antígeno específico en material de biopsia obtenido con aguja fina de las lesiones sospechosas.¹⁰⁷

ESPECIES DE MULTICEPS – CENUROSIS

La cenurosis es otra enfermedad humana relacionada con una tenia del perro, un cestodo del género *Multiceps*, en el que los huéspedes intermediarios normales son los ovinos, los bovinos, los equinos y otros animales herbívoros. Los seres humanos se infectan mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces de perro que contienen huevos de *Multiceps*; en ellos, la enfermedad afecta sobre todo el sistema nervioso central, donde las larvas que migran evolucionan a quistes similares a los de la hidatidosis conocidos como cenuros, de los que difieren por presentar múltiples escólices pero sin cápsulas prolíferas ni quistes hijos. Los síntomas suelen ser los de una lesión ocupante y consisten en cefalea, vómitos y síntomas neurológicos localizados, como hemiplejía, paraplejía, afasia y convulsiones. La aracnoiditis basal que conduce al síndrome de la fosa posterior y la hidrocefalia interna también son síntomas de presentación. El diagnóstico suele realizarse tras la extirpación quirúrgica del quiste y el reconocimiento histológico de los cenuros.

ESPARGANOSIS: SPIROMETRA MANSONIOIDES

Los perros y los gatos actúan como los huéspedes definitivos para diversas especies de tenias difilobotroides pertenecientes

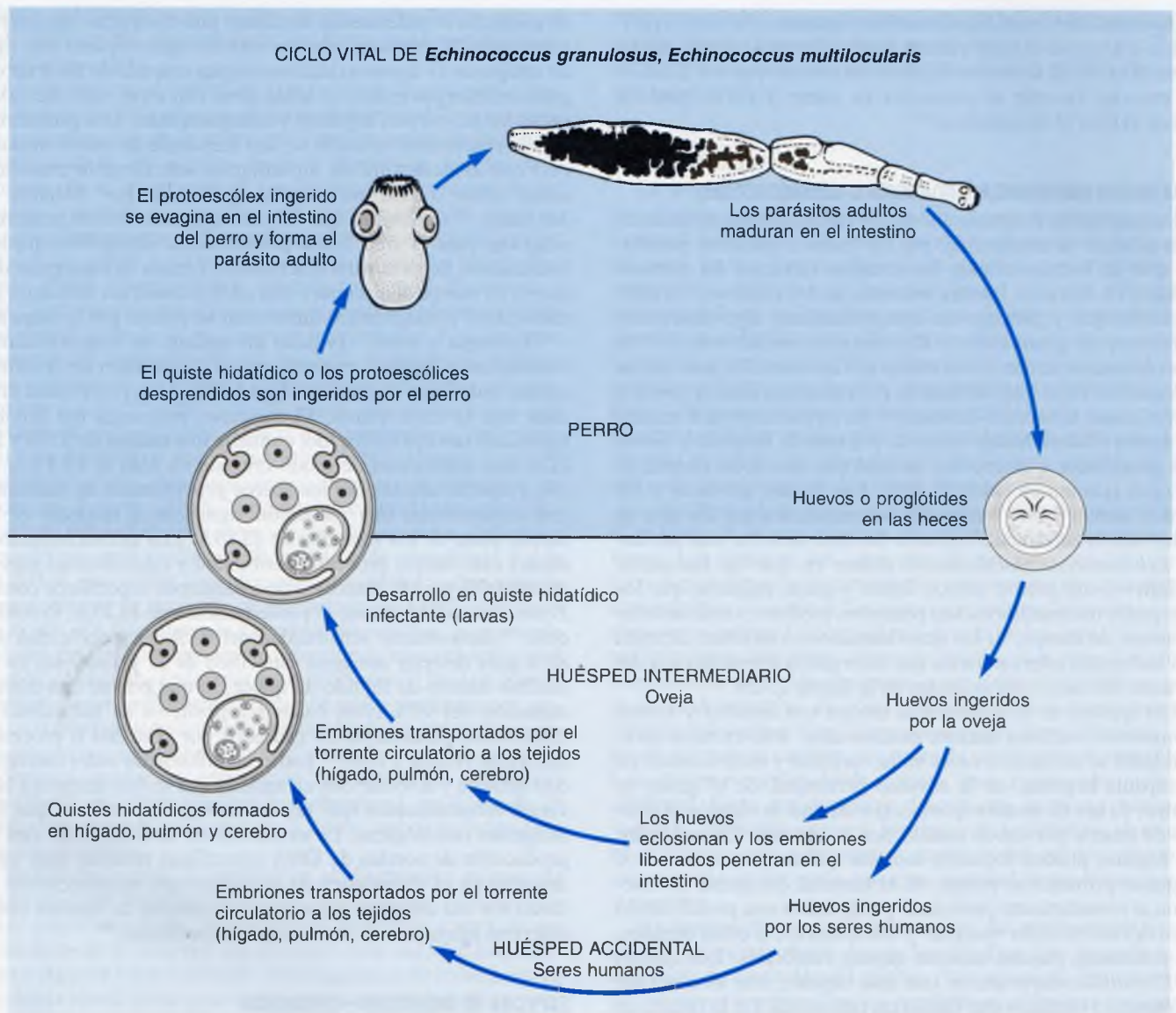


Figura 22-29 Ciclo vital de *Echinococcus granulosus*. Los huevos, ya sean solos o dentro de los proglótides, que se asemejan a los de las especies de *Taenia*, se eliminan por las heces del perro y se embrian en el suelo. En circunstancias normales estos huevos son ingeridos por los huéspedes intermediarios naturales (ovinos, bovinos o porcinos) o por roedores pequeños mencionados en el texto en el caso de *E. multilocularis*. En el intestino de los huéspedes intermediarios los huevos eclosionan y liberan el embrión hexacanto, que por medio de sus ganchos atraviesa la pared del intestino e ingresan en la circulación.

Los embriones circulantes son retenidos en los capilares de diversos órganos, por lo general el hígado, ya que es el primer órgano en drenar la sangre mesentérica. *Echinococcus granulosus* produce un quiste único con múltiples capas a partir de las cuales pueden formarse pequeños quistes denominados vesículas (lámina en color 22-11B). Los quistes de *E. multilocularis*, como su nombre lo indica, presentan numerosas cavidades. En algunos casos pueden verse quistes múltiples de hasta 5 cm de diámetro, que se asemejan a lo que Aristóteles denominó granizo (lámina en color 22-11C). Los seres humanos también pueden convertirse en huésped intermediario por la ingestión de huevos de *Echinococcus*, cuyas larvas también pueden migrar a varios órganos, en especial hígado, pulmón y cerebro, y maduran en lesiones cisticercoides. El ciclo vital se completa cuando un perro, zorro u otro carnívoro relacionado, come vísceras infectadas del huésped intermediario.

al género *Spirometra*. Los huevos de este parásito son eliminados por las heces de perros o gatos al agua dulce donde eclosionan y son ingeridos por crustáceos diminutos del género *Cyclops*, dentro de los cuales evolucionan a larvas procercoides. A su vez, éstas maduran en la carne de un segundo huésped intermediario (peces, serpientes, ranas) que se alimentan de *Cyclops* como larvas plerocercoides, cada una de las cuales recibe el nombre de espargano. Los seres humanos se infectan ya sea por la ingestión de *Cyclops* infectado, por comer la carne cruda infectada del segundo huésped intermediario o por

la práctica de ciertas culturas de aplicar pescados crudos a la piel, los ojos o la vagina para curar otras enfermedades. Una vez ingeridos, los esparganos penetran la pared intestinal e ingresan en la circulación.

Casi todas las lesiones en los seres humanos son subcutáneas, donde se forman nódulos edematosos de crecimiento lento, dolorosos y rojos. El diagnóstico definitivo se realiza sólo después de extirpar el espargano e identificar el parásito blanco delgado y delicado que mide 60-80 × 1-2 mm de ancho. Esparganos aberrantes se han observado en la parte externa

del ojo, donde la tumefacción edematosa del párpado simula el signo de Romaña (enfermedad de Chagas); en los vasos linfáticos, donde causan tumefacciones similares a la elefantiasis, y en el cerebro, en la forma de abscesos cerebrales.

Diagnóstico serológico de las infecciones parasitarias

El enfoque serológico de la evaluación de las enfermedades parasitarias es más aplicable cuando para establecer el diagnóstico se requieren técnicas invasivas distintas del examen habitual de sangre, heces u otros líquidos corporales. Por ejemplo, las formas parasitarias infectantes de toxoplasmosis, amebiasis extraintestinal, triquinosis y cisticercosis a menudo se alojan en la profundidad de tejidos y órganos, y para confirmar el diagnóstico se necesitan biopsias por aspiración con aguja fina o a cielo abierto. En estos casos, el diagnóstico serológico puede ser posible si se consideran probables problemas, como lo determina García.⁹⁶

1. Ciertos parásitos que pasan a través de varias fases del desarrollo pueden no proporcionar estímulos antigénicos constantes o continuos suficientes para desencadenar la formación de anticuerpos.
2. En casos específicos pueden faltar las respuestas de anticuerpos, ya sea porque hay un estímulo antigénico limitado o porque no está presente en el sistema de prueba.
3. Los antígenos utilizados en los estudios a menudo son mezclas heterogéneas o extractos de formas parasitarias mal definidos. Estas preparaciones antigénicas pueden mostrar reactividad cruzada o sensibilidad inadecuada, lo que dificulta la interpretación.
4. Los pacientes que viven en áreas endémicas pueden tener títulos de anticuerpos basales más elevados que los de áreas no endémicas; por lo tanto, si es posible, deben determinarse los cambios del título.
5. Los equipos de prueba fiables para el uso diagnóstico general a menudo no los proveen fuentes comerciales. Aun cuando estén disponibles, la incidencia de la enfermedad parasitaria suele ser tan baja en la mayoría de los laboratorios que los reactivos se vencen sin ser utilizados. Además, estas pruebas pueden ser efectuadas por personal de laboratorio que sólo pocas veces se siente capacitado para interpretarlas.

Varias de las aplicaciones de la detección de anticuerpos y antígenos proporcionadas en la revisión de García están reflejadas en este libro en secciones cortas incluidas dentro de la descripción de cada parásito. Hemos elegido incluirlas en cada sección en lugar de hacer una presentación única aquí. Muchos de los detalles de los diversos métodos empleados en la actualidad en los laboratorios de investigación exceden el alcance de este texto. Como el volumen de enfermedades parasitarias encontradas en la mayoría de los ámbitos de la práctica en los Estados Unidos es bajo o inexistente, la realización de las pruebas serológicas es poco práctica en los laboratorios de microbiología diagnóstica. En la mayoría de los casos, las muestras se envían a los laboratorios de referencia local y regional, incluso a los diversos laboratorios de salud pública estatal. Cada laboratorio de la referencia tendrá en funcionamiento técnicas consagradas por la tradición y otras más nuevas que son exclusivas para ese laboratorio y es necesario consultar para informarse sobre cuál es su aplicación y los tipos de muestras requeridas que correspondan. Los procedimientos para la

Recuadro 22-7 Pruebas serológicas realizadas en los Centers for Disease Control

Enfermedad	Prueba	Títulos diagnósticos
Tripanosomiasis africana	IFA	≥ 1:16
Amebiasis	IHA	≥ 1:256
Ascariasis	ELISA	≥ 1:32
Enfermedad de Chagas	FC, IHA	≥ 1:8; 1:64
Cisticercosis	IHA	≥ 1:64
Hidatidosis	IHA	≥ 1:256
Fascioliasis	IHA	≥ 1:128
Filariasis	IHA	≥ 1:128
Leishmaniasis	IFI	≥ 1:16
Paludismo	IFI	≥ 1:64
Paragonimiasis	FC	≥ 1:8
Neumocistosis	IFI	≥ 1:16
Esquistosomiasis	IFI	≥ 1:16
Estrongiloidiasis	IHA	≥ 1:64
Toxocariasis	ELISA	≥ 1:32
Toxoplasmosis	IFI, IFI-IgM	≥ 1:256; 1:16
Triquinosis	Floc. de la bentonita	≥ 1:16

detección de antígenos y anticuerpos para las enfermedades parasitarias más frecuentes pueden encontrarse en el capítulo 22 de la edición actual del texto de García.⁹⁶ El recuadro 22-7 es la lista de las pruebas serológicas realizadas en los CDC para diversas enfermedades parasitarias, junto con los títulos considerados importantes desde el punto de vista diagnóstico, como lo publicaron originalmente Walls y Smith.²⁷⁴

La mayoría de los adelantos en el diagnóstico de la parasitología clínica en los últimos cinco años implican la introducción de técnicas serológicas nuevas para la detección de anticuerpos y antígenos en sangre y otros líquidos y secreciones. Los enzimo-inmunoanálisis (EIA), las pruebas de inhibición de la hemaglutinación indirecta (IHA), las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y directa, y la fijación del complemento constituyen el espectro de los procedimientos utilizados en los laboratorios de parasitología clínica y de referencia. La aplicación de la biología molecular en el diagnóstico parasitológico o el uso de la cita corta de Persing²⁰⁸ "desde las trincheras a la mesa de trabajo", es una evolución atractiva que surge de los laboratorios de investigación.

Sin embargo, como lo señala Weiss,²⁸³ el entusiasmo debe ser atenuado por ciertas realidades. Varias de las pruebas moleculares nuevas para el diagnóstico de enfermedades parasitarias se han incluido en este libro como segmentos cortos en las secciones sobre diagnóstico de laboratorio de los diversos parásitos descritos antes. Estas citas se centran en el trabajo que se están realizando en laboratorios de investigación; sin embargo, como lo señala ese autor, muy pocas de estas técnicas han sido sometidas a estudios de campo o a evaluaciones clínicas en gran escala. Las aplicaciones prácticas de la PCR pueden citarse como ejemplo. Esta técnica proporciona un gran aumento en la sensibilidad y especificidad de los estudios con sondas de DNA, lo que resulta del aumento de señales producidas por las miles de replicaciones de determinadas secuencias repetitivas de DNA específicas de especie. Esto brinda la posibilidad de identificar de manera rápida y directa determinados antígenos en muy bajas concentraciones o en cantidades ínfimas en muestras clínicas. No obstante, en la actualidad la PCR sólo

Cuadro 22-1 Fármacos utilizados con frecuencia en el tratamiento de las infecciones parasitarias

FÁRMACO	TIPO DE AGENTE	MODO DE ACCIÓN	COMENTARIOS
Anfotericina B	Macrólido poliénico	Aumenta la permeabilidad de la membrana celular, lo que conduce a una pérdida por fuga, primero de iones y luego de otros componentes celulares. La unión se efectúa por los esteroides de la membrana	Las células de mamíferos también pueden ser afectadas con varios efectos colaterales. Utilizada en el tratamiento de infecciones por especies de <i>Acanthamoeba</i> y en casos avanzados de leishmaniasis mucocutáneas
Cloroquina	4 amino quinolina (quinina)	La concentración del fármaco alcanzada en los eritrocitos parasitados por paludismo es varios cientos de veces mayor que en los eritrocitos normales. El fármaco se une a la ferriprotoporfirina IX (FP), un producto de degradación de la hemoglobina presente en la vacuola alimentaria del parásito. El complejo cloroquina-FP produce la lisis del parásito.	El pilar del tratamiento antipalúdico durante dos décadas. En cepas de <i>P. falciparum</i> que pueden secuestrar algo de FP puede haber farmacoresistencia, de modo que no se une a la cloroquina. Este fármaco no es curativo para <i>P. vivax</i>
Emetina	Alcaloide (cicloheximida)	Directamente letal para los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> al causar cambios degenerativos en ellos. El fármaco interrumpe la división celular porque inhibe de manera irreversible la síntesis de proteínas al impedir el movimiento del mRNA a lo largo de la subunidad ribosómica 60S	Utilizada en el tratamiento de diversas amebiasis intestinales o en abscesos hepáticos amebianos como alternativa al metronidazol. También afecta las células de mamíferos y produce graves efectos colaterales, lo que limita su uso terapéutico
Dietilcarbamazina	Derivado de piperazina (dos nitrógenos en un anillo benceno)	Se considera que el fármaco altera las propiedades de superficie y la movilización de las microfilarias y determina que abandonen la circulación a través de un efecto neuromuscular específico. Las microfilarias quedan atrapadas en el hígado y sufren fagocitosis	Utilizada sobre todo en el tratamiento de las infecciones por filarias. El fármaco presenta buena absorción, alcanza las concentraciones séricas máximas en el transcurso de las 3 horas y se distribuye ampliamente por el cuerpo
Ivermectina	Un 22,23 dihidroderivado de avermectina B, un complejo lactónico macrocíclico producido por <i>Streptomyces avermitilis</i>	El fármaco actúa sobre los receptores para el ácido gamma-aminobutírico (GABA) en la musculatura del parásito. Se estimulan las neuronas inhibitorias que causan la liberación de GABA desde las terminales presinápticas, en esencia mediante el bloqueo de la transmisión de la señal desde las terminaciones a las neuronas excitadoras. El efecto es la pérdida de la actividad locomotora del parásito, lo que hace a los parásitos normalmente móviles muy susceptibles a las diversas defensas del huésped	El fármaco tiene un amplio espectro de actividad contra los nematodos, pero no tiene acción sobre los trematodos y las tenias. Se utilizó de manera eficaz contra la oncocercosis, la larva migrans cutánea y visceral, <i>Angiostrongylus meningitis</i> y diversas infecciones gastrointestinales por nematodos
Mebendazol	Benzimidazol-bencina + estructura de cinco anillos, que incluye tres moléculas de carbono y dos de nitrógeno	Inhibición selectiva de la captación de glucosa en los nematodos y cestodos, lo que conduce a un aumento de la utilización de glucógeno del parásito; por consiguiente, los parásitos quedan privados de sus fuentes principales de energía. Bajo la acción del fármaco, el parásito se inmoviliza y se interrumpe in vitro el desarrollo larvario	El mebendazol es activo contra nematodos y se utiliza sobre todo para el tratamiento de tricocefalosis, ascariasis, uncinariasis y estrogiloidiasis. El fármaco presenta una absorción mínima por el tubo digestivo, por lo tanto, es más eficaz para el tratamiento de los parásitos intraintraestinales
Melarsoprol	Arsenical (un derivado dimercaprol del óxido de <i>p</i> -melaminilfenilarsonato sódico [melarsen])	Los arsenóxicos se adhieren a los tripanosomas por enlaces covalentes; los grupos que contienen azufre en el arsenóxido ejercen un efecto letal mediante el bloqueo de grupos enzimáticos glucolíticos esenciales biológicamente activos. Los arsenicales reaccionan con los grupos sulfhidrilos, lo que inactiva diversas enzimas sintetizadas por el parásito para la glucólisis	Utilizado en el tratamiento de la tripanosomiasis. El fármaco ingresa en las células del parásito con más rapidez que en las células humanas y, por lo tanto, es más tóxico para el parásito. Atraviesa la barrera hematoencefálica e ingresa en el líquido cefalorraquídeo, por lo que es muy eficaz para el tratamiento de la infección del SNC

(Continúa)

Cuadro 22-1 Fármacos utilizados con frecuencia en el tratamiento de las infecciones parasitarias (cont.)

FÁRMACO	TIPO DE AGENTE	MODO DE ACCIÓN	COMENTARIOS
Metronidazol	5-nitroimidazol	El metronidazol se metaboliza en derivados, incluso radicales superóxidos, que interfieren en el metabolismo del DNA de los parásitos, causan amplias roturas en las cadenas de DNA e interrumpen la estructura helicoidal. Por esto se altera la síntesis proteica del parásito	Utilizado para el tratamiento de la amebiasis invasiva y también para infecciones por <i>Trichomonas vaginalis</i> y <i>Giardia lamblia</i> . Dado que sólo el 10% del fármaco se une a las proteínas séricas, alcanza concentraciones elevadas en los tejidos, incluso pulmón, bilis, hígado, hueso, hígado y cerebro, que exceden las concentraciones requeridas para inhibir los organismos contra los cuales es activo
Niclosamida	Derivado de pirazinoisoquinolina heterocíclica	Se interrumpe la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de los cestodos. El efecto sobre los parásitos adultos maduros es letal, ya que en ciertas especies induce la parálisis muscular completa. El fármaco induce el desprendimiento de los escólices y los parásitos se desintegran antes de ser eliminados por las heces	La niclosamida es un fármaco alternativo para el tratamiento de las tenias. Para el tratamiento de los parásitos <i>Hymenolepis</i> la administración aumenta a 5 días porque las oncosferas evolucionan en las vellosidades yeyunales y las larvas cisticercoides emergen en la luz intestinal cerca de 4 días más tarde
Praziquantel (pirazinoquinolina)	Derivado de 8-aminoquinolina	El fármaco actúa al aumentar la permeabilidad de la membrana al calcio, lo que causa contracciones y parálisis de la musculatura de los parásitos. Los efectos neuromusculares aumentan la movilidad y la parálisis espástica, lo que causa el desprendimiento y la desintegración de los parásitos en el intestino	Utilizado para el tratamiento de la esquistosomiasis, la cisticercosis, las infecciones por tenias y los trematodos hepáticos, pulmonares e intestinales. El fármaco alcanza excelentes niveles terapéuticos en el hígado, la bilis y los tejidos musculares y como atraviesa la barrera hematoencefálica, también en el líquido cefalorraquídeo
Primaquina	Pirimidina tetraédrica	El fármaco es gameticida y esquizonticida para todas las especies de paludismo humano. Se desconoce su mecanismo de acción, aunque lo más probable es que inhiba la síntesis de DNA	La primaquina es un mal esquizonticida sanguíneo, pero es eficaz contra los hipnozoítos exoeritrocíticos. Por consiguiente, es eficaz para evitar las recidivas por <i>P. vivax</i> y <i>P. ovale</i> . La curación radical del paludismo puede lograrse por una combinación de cloroquina y primaquina
Pamoato de pirantelo	Ácido sulfónico de naftilamina, un colorante polianiónico	El pirantelo (y sus análogos) actúa como un antagonista colinérgico y causa la despolarización de las células musculares dentro del parásito que producen contracciones irreversibles	Utilizado sobre todo para el tratamiento de infecciones con áscaris, uncinarias, oxiuros y <i>Trichostrongylus</i> . El fármaco es insoluble en agua y se absorbe mal por el tubo digestivo, por lo que tienen escasa toxicidad
Suramina		El fármaco inhibe la glicerol 3-fosfato oxidasa y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, que impide la reoxidación del nicotinamida-adenina dinucleótido y disminuye la síntesis de adenosintrifosfato. Esta interrupción del metabolismo es letal para el parásito	El fármaco se distribuye ampliamente por el cuerpo, porque tiene gran afección por las proteínas de unión del suero, no atraviesa la barrera hematoencefálica. El fármaco se utiliza para el tratamiento de la tripanosomiasis temprana; sin embargo, como no ingresa en el sistema nervioso central, no es eficaz para el tratamiento de la enfermedad progresiva del SNC
Tiabendazol	Benzimidazol	Mecanismo de acción desconocido	El fármaco se adapta bien para el tratamiento de la infección diseminada por <i>Strongyloides</i> y todas las formas larvarias que causan larva migrans visceral y cutánea. La mayor parte del fármaco absorbido se metaboliza en el hígado y se excreta como metabolitos por la orina
Estibogluconato de sodio	Un compuesto que contiene antimonio	Se considera que el fármaco actúa sobre las enzimas que contienen sulfhidrilo sódico dentro del parásito, lo que disminuye el flujo de glucosa en el ciclo del ácido tricarbóxico y causa la acumulación de subproductos glucolíticos que son tóxicos para los amastigotos en desarrollo	Utilizado sobre todo para el tratamiento de la leishmaniasis. A las 2 horas de la administración intramuscular o intravenosa se alcanza la concentración máxima en suero y más del 90% del fármaco se excreta en 8 horas. Sin embargo, se acumula de modo gradual en los tejidos, lo que explica la necesidad de ciclos prolongados de tratamiento

está al alcance de muy pocos laboratorios de diagnóstico porque es muy costosa y por la gran exigencia técnica del método.

Debe destinarse una instalación separada del laboratorio y tener gran cuidado en el manejo de las muestras a fin de evitar la contaminación con DNA extraño. Los costos elevados, la necesidad de una capacitación especial del personal y los requerimientos de equipos y reactivos especiales impedirán el uso amplio de la PCR en países en vías del desarrollo. Aun así está más cerca que lejos el día en que los métodos de amplificación se conviertan en procedimientos estándares en muchos de los laboratorios clínicos. Estas técnicas de diagnóstico directo no sólo ayudarán al diagnóstico temprano de las enfermedades parasitarias en los seres humanos, sino que también proporcionarán la oportunidad de estudiar los vectores que albergan parásitos, lo que conducirá a la prevención de enfermedades parasitarias a través del control más eficaz del vector. La automatización, las leyes de mercado, la especialización técnica y la necesidad de acortar el tiempo del procesamiento para establecer un diagnóstico de enfermedad parasitaria contribuirán a llevar la biología molecular "a las mesas de trabajo".

Fármacos utilizados con frecuencia en el tratamiento de las enfermedades parasitarias

La farmacoterapia de las enfermedades parasitarias está dirigida a suprimir la capacidad invasiva de los parásitos. Las infecciones que suceden sobre todo dentro del aparato digestivo se tratan mejor con compuestos que no se absorben bien, lo que produce concentraciones elevadas del principio activo en la luz intestinal. Los agentes que se absorben bien y alcanzan concentraciones elevadas en suero y tejidos son los requeridos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias invasivas, en especial las formas larvianas. En algunos casos de amebiasis extraintestinal, puede requerirse la combinación con un fármaco no absorbible para tratar los organismos restantes en el intestino. Muchos parásitos existen en la forma quística, en la cual los fármacos tienen dificultad de penetrar, lo que conduce a una probable reactivación posterior de la infección. Un ejemplo excelente lo constituyen las formas enquistadas e inactivas de *Toxoplasma gondii*, las que son resistentes a los fármacos y propensas a reactivarse cuando se pierde la inmunidad, en especial en los pacientes con SIDA, que raras veces se curan.

En el cuadro 22-1 se resume el modo de acción y otros atributos de los fármacos antiparasitarios utilizados con mayor frecuencia. Para una revisión completa de todos los fármacos actuales, incluso los más recomendados y las dosis por utilizar para la mayoría de las enfermedades parasitarias humanas, véanse el capítulo 25 del libro de García⁹⁶ y la publicación de Moore.¹⁸⁷

REFERENCIAS

- Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. *Parasitology Res* 1999; 85:844-849.
- Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:48-70.
- Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis: II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine (Baltimore)* 1977;56:325-334.
- Aikawa M, Tseki M, Barnwell JW, et al. The pathology of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:30-37.
- Aldras AM, Orenstein JM, Kotler DP, et al. Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1994;32:608-612.
- Allason-Jones E, Mindel A, Sargeant P, Williams P. *Entamoeba histolytica* as commensal intestinal parasite in homosexual men. *N Engl J Med* 1986;315:353-356.
- Amin OM. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:799-803.
- Anderson BX. Cryptosporidiosis. *Lab Med* 1983;14:55-56.
- Antonelli F, Cantelli L, De Maddi F, Lamba M. *Blastocystis hominis* infection: a case report. *Minerva Pediatrica* 1996;48:571-573.
- Arness M, Brown KJD, Dubey JP, et al. An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to human sarcocystis parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:548-553.
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993;33:2421-2426.
- Bailey JW, Smith DH. The quantitative buffy-coat for the diagnosis of trypanosomes. *Trop Doc* 1994;24:54-56.
- Baird JK, Mistrey M, Pimsler M, Connor DH. Fatal human ascariasis following secondary massive infection. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:314-318.
- Bartlett MS, Harper K, Smith N, et al. Comparative evaluation of a modified zinc sulfate flotation technique. *J Clin Microbiol* 1977;7:524-528.
- Beaver PC, Gadgel PK, Morera P. Sarcocystis in man: a review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:819-844.
- Beaver PC. Intraocular filariasis: a brief review. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:40-46.
- Berlin OGW, Novak SM, Porchen RK. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. *Clin Infect Dis* 1994;18:606-609.
- Bhatt RD, Chappell MS, Smilow PC, Das KM. Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1034-1036.
- Blessmann J, Buss H, Non Nu, PA, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:4413-4417.
- Britto C, Carso MA, Vanni CMM, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995;220: 241-247.
- Bruckner DA, Garcia LS, Voge M. Intestinal parasites in Los Angeles, California. *Am J Med Technol* 1979;45:1020-1024.
- Brumpt E. Etude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe á kystes quadrinucléées, parasite de l'homme. *Bull Acad Med Paris* 1925;94:943-952.
- Bryan RT, Cali A, Owen RL, Spencer HC. Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. In: Sun T, ed. *Progress in Clinical Parasitology*. Vol 2. Philadelphia: Field and Wood, 1991;1-26.
- Buijs J, Barsboom G, van Gemund J, et al. Toxocara seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. *Am J Epidemiol* 1994;140: 839-847.
- Bundy DA. Immunoepidemiology of intestinal helminthic infections: I. The global burden of intestinal nematode disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:259-261.
- Bullock W. The History of Bacteriology. London: Oxford University Press, 1938 (reprinted 1960).
- California Department of Health Services. Babesiosis in California. *Calif Morbid* 1992; January.
- Camous E. Treatment of cutaneous larva migrans. *Clin Infect Dis* 2000;30:811-814.
- Carlson JR, Sullivan PS, Harry DJ, et al. Enzyme immunoassay for the detection of *Giardia lamblia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:538-540.
- Centers for Disease Control and Prevention. Intestinal parasite surveillance: United States 1976. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1976;27:167.
- Centers for Disease Control and Prevention. Summary of malarial diseases 1988. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1988;37:3.
- Center for Disease Control and Prevention. Microsporidian keratoconjunctivitis in patients with AIDS. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;39:188-189.
- Centers for Disease Control and Prevention. Probable locally acquired mosquito transmitted *Plasmodium vivax* infection—Suffolk County, New York, 1999. *Morb Mortal Weekly Rep* 2000;49:495-498.
- Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM. Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1993;1:1710-1714.
- Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections—fifty years on. *Parasitol Today* 1997;13:438-443.
- Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, et al. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:1283-1288.
- Chaudhry AZ, Longworth DL. Cutaneous manifestations of intestinal helminth infection. *Dermatol Clin* 1989;7:275-290.
- Chen Q, Schlichterle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:439-450.
- Chu E, Whitlock WL, Dietrich RA. Pulmonary hyperinfection syndrome with *Strongyloides stercoralis*. *Chest* 1990;97:1475-1477.
- Chuley JD, Ockenhouse CF. Host receptors for malaria-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:6-14.
- Clark PS, Brownberger KM, Saslow AR, et al. Bear meat trichinosis: epidemiologic, serologic, and clinical observations from two Alaskan outbreaks. *Ann Intern Med* 1972;76:951-956.
- Clark CG, Diamond LS. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch Med Res* 1992;23:15-16.
- Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:554-563.

44. Cooper ES, Thyte-Alleng CA, Finzi-Smith JS, MacDonald TT. Intestinal nematode infection in children: the pathophysiological price paid. *Parasitology* 1992;104 (Suppl):S91-S103.
45. Couldwell WT, Apuzzo ML. *Cysticercosis cerebri*. *Neurosurg Clin North Am* 1992; 3:471-481.
46. Croft AM, Garner P. Mefloquine for preventing malaria in non-immune adult travelers. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD-000138.
47. Cross JH. Intestinal capillariasis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:120-129.
48. Cruz ME, Schantz PM, Cruz I, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in an Andean community. *Int J Epidemiol* 1999;28:799-803.
49. Cubitt WD, Ades AE, Peckham CS. Evaluation of five commercial assays for screening antenatal sera for antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Pathol* 1992;45:435-438.
50. Cummins AJ, Moody AH, Laloo K, Chiodini PL. Rapid latex agglutination test for extra-luminal amoebiasis. *J Clin Pathol* 1994;47:647-648.
51. Current WL, Owens RL. Cryptosporidiosis and microsporidiosis. In: Farthing MJG, Kusch FT, eds. *Enteric Infection: Mechanisms, Manifestations and Management*. London: Chapman & Hall Medical, 1989;223-249.
52. Daschner A, Alonso-Gomez A, Cabanas R, et al. Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease: clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:176-181.
53. Da Silva AJ, Piuvierzam MR, De Moura H, et al. Rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody reacting with a 15-kilodalton tegumental antigen of *Schistosoma mansoni* for serodiagnosis of schistosomiasis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2315-2319.
54. Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Del Aguila de la Puente C, et al. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stool samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:874-879.
55. Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura INS, et al. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol Diagn* 1999;4:57-63.
56. Davidson RA, Fletcher RH, Chapman EE. Risk factors for strongyloidiasis—a controlled study. *Arch Intern Med* 1984;144:321-325.
57. Davis A. Recent advances in schistosomiasis. *Q J Med* 1986;226:95-110.
58. Davis CE. Laboratory diagnosis of parasitic diseases. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th Ed. New York, McGraw Hill, 2001:1186.
59. Davis-Reed L, Theis JH. Cutaneous schistosomiasis: report of a case and review of the literature. *Am Acad Dermatol* 2000;42:678-680.
60. DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, et al. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B stains. *J Clin Microbiol* 1995;33:805-810.
61. De Groote MA, Visvesvara GS, Wilson ML, et al. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Entamoeba histolytica* in patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J Infect Dis* 1995;171:1375-1378.
62. De Jonge N, Rabello ALK, Kruger FW, et al. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in the serum diagnosis of schistosomiasis patients from Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1991;85:756-759.
63. DeKaminsky RG. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol* 1993;79:277-280.
64. Dennis DT, Kean BH. Isolation of microfilariae: report of a new method. *J Parasitol* 1971;57:1146-1147.
65. Diamond LS, Clark CG. A re-description of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryotic Microbiol* 1994;40:340-344.
66. Diaz JCP. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitol Today* 1987;3:336-341.
67. Didier ES, Dider PJ, Friedberg DN, et al. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis* 1991;163:617-621.
68. Deardorff TL, Kent ML. Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (*Salmonidae*) from Puget Sound, Washington. *J Wild-life Dis* 1991;25:416-419.
69. Dobroszycki J, Herwaldt BL, Bactor F, et al. A cluster of transfusion-associated babesiosis cases traced to a single asymptomatic donor. *JAMA* 1999;281:927-930.
70. Donelson JE. Antigenic variation in African trypanosomes. *Contrib Microbiol Immunol* 1987;8:138-175.
71. Dorman SE, Cannon ME, Telford SR III, et al. Fulminant babesiosis treated with clindamycin, quinine, and whole-blood exchange transfusion. *Transfusion* 2000; 40:375-380.
72. Duomo R, Rossignol JF, Pichard E, et al. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:637-639.
73. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2421-2426.
74. Dupouy-Camet, De Souza SL, Maslo C, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1866-1869.
75. Eberhard ML, Walker EM, Steurer FJ. Survival and infectivity of Babesia in blood maintained at 25°C and 2-4°C. *J Parasitol* 1995;38:790-792.
76. Ehnert KL, Roberto RR, Barrett L, et al. Cysticercosis: first 12 months of reporting in California. *Bull Pan Am Health Organ* 1992;26:165-172.
77. Espino AM, Finlay CM. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in human fascioliasis. *J Clin Microbiol* 1994;32: 190-193.
78. Esrey SA, Collett J, Mikoitis MD, et al. The risk of infection from *Giardia lamblia* due to drinking water supply, use of water and latrines among preschool children in rural Lesotho. *Int J Epidemiol* 1989;18:248-253.
79. Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, et al. Diagnosis of toxoplasma parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;32:2327-2331.
80. Fischer P, Liu XL, Lizotte-Waniewski M, et al. Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. *Parasitol Res* 1999;85:176-183.
81. Flanagan TP, Ramratnam B, Graeber C, et al. Prospective trial of paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS. *Am J Med* 1996;100:370-372.
82. Flieder DB, Moran CA. Pulmonary dirofilariasis: a clinicopathologic study of 41 lesions in 39 patients. *Hum Pathol* 1999;30:251-256.
83. Flynn PM. Emerging diarrheal pathogens: *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora* species, and microsporidia. *Pediatr Ann* 1996;25:480-487.
84. Foster WE. A History of Parasitology. Edinburgh: E & S Livingstone, 1965.
85. Franzen C, Muller A, Hegener P, et al. Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:2294-2296.
86. Fraser GG, Cooke KR. Endemic giardiasis and municipal water supply. *Am J Pub Health* 1991;81:760-762.
87. Frenkel J. Toxoplasmosis. *Pediatr Clin N Am* 1985;32:917-932.
88. Fricker CR, Crabb JH. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. *Adv Parasitol* 1998;40:241-278.
89. Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. *Giardiasis* surveillance—United States, 1992-1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:1.
90. Gallagher PG, Venglaric JS III. *Blastocystis hominis* enteritis. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:556-557.
91. Garcia LS, Bruckner DA, Clancy MN. Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. *Lancet* 1984;1:1233-1234.
92. Garcia LS, Schum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992;30:3255-3257.
93. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997;38:1526-1529.
94. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. *J Clin Microbiol* 1998;36:1974-1976.
95. Garcia LS. Flagellates and ciliates 1999. *Clin Lab Med* 1999;19:621-638.
96. Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2001.
97. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/E. *dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the EIA Triage parasite panel. *J Clin Microbiol* 2000;38:3337-3340.
98. Garza D. Diarrhea caused by a universal coccidian parasite. *Lab Med* 1983;14:283-286.
99. Genta RM. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:345-355.
100. Ginsberg M, Hung S, Ranzen M, et al. Mosquito-transmitted malaria—California and Florida. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40:106-108.
101. Godel LM, Tibbitts RS, Olson CL, et al. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 1995;33:2082-2085.
102. Gomes ML, Galvao LMC, Macedo AM, et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:205-210.
103. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, et al. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998;88:28-33.
104. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rehman T, et al. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* a fetal antigen by an invasive strain-specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1964-1970.
105. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguirre A, et al. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J Clin Pathol* 1994;47: 236-239.
106. Gordon SM, Gal AA, Solomon AR, Bryan JA. Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestation in an immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol* 1994;32:255-259.
107. Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:248-261.
108. Gould SE. The story of trichinosis. *Am J Clin Pathol* 1970;55:2-11.
109. Greensmith CT, Stanwick S, Elliot BE, Fast MV. Giardiasis associated with use of a water slide. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:91-94.
110. Grendon IH, Digiacoio RF, Frost FJ. *Dientamoeba fragilis* detection methods and prevalence: a survey of state public health laboratories. *Pub Health Rep* 1991;106: 322-325.
111. Griffiths JK, Balakrishnan R, Widmer G, Tzipori S. Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Infect Immun* 1998;66:3874-3883.

112. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future. *Clin Microbiol Res* 1993;6:230-250.
113. Grobusch MP, Bergmann F, Teishmann D, Klein E. Cutaneous gnathostomiasis in a woman from Bangladesh. *Int J Infect Dis* 2000;4:51-54.
114. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990;28:2295-2301.
115. Guerrant RL. The global problem of amebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. *Rev Infect Dis* 1986;8:218-227.
116. Hadley WK, Ng V. Pneumocystis. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 1999;1200-1211.
117. Hagar JM, Rahimtoola SH. Chagas' disease in the United States. *N Engl J Med* 1991;325:763-768.
118. Hamalogue E. Biliary ascariasis in fifteen patients. *Int Surg* 1942;77:77-79.
119. Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infections. *J Clin Microbiol* 1998;136:449-452.
120. Haque R, Mollah NU, Ibne Karim M, et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the Tech Lab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 2000;38:3235-3239.
121. Harcourt-Webster JN, Scaravilli F, Darwish AH. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an HIV positive patient. *J Clin Pathol* 1991;44:346-348.
122. Harms G, Feldmeier H. HIV infection and tropical parasitic diseases: deleterious interactions in both directions. *Trop Med Int Health* 2002;7:479-488.
123. Harris RA Jr, Musher DM, Fainstein V, et al. Disseminated strongyloidiasis: diagnosis made by sputum examination. *JAMA* 1980;244:65-68.
124. Hayes EB, Matte TD, O'Brien TR, et al. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N Engl J Med* 1989;320:1372-1376.
125. Hazil LR, Pearman F. Pathogenesis of onchocercal keratitis (river blindness). *Clin Microbiol Rev* 1999;12:445-453.
126. Helbig M, Frosch P, Kenn P, Frosch M. Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcus by use of recombinant larval antigens. *J Clin Microbiol* 1993;31:3211-3215.
127. Herrera LA, Ramirez T, Rodriguez U, et al. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocyte from neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;64:61-65.
128. Herwaldt BL, Akers ML, and the Cyclospora Working Group. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *N Engl J Med* 1997;336:1548-1556.
129. Herwaldt BL, Grijalva MJ, Newsome AL, et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose: the fifth reported US case of autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi* in Tennessee. *J Infect Dis* 1998;181:395-399.
130. Herwaldt BL, Kjemtrup AM, Conrad RC, et al. Transfusion-transmitted babesiosis in Washington state: first reported case caused by a WAI-type parasite. *J Infect Dis* 1997;175:1259-1262.
131. Heymans HS, Aronson DC, vanHooft MA. Giardiasis in childhood: an unnecessarily expensive diagnosis. *Eur J Pediatr* 1987;146:401-403.
132. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:36-39.
133. Hira PR, Naefie R, Prakash B, et al. Human gnathostomiasis: infection with an immature male *Gnathostoma spinigerum*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:91-94.
134. Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol* 1992;30:3181-3184.
135. Hoeppli R. Parasites and Parasitic Infections in Early Medicine and Science. Singapore: University of Malaya Press, 1959.
136. Hoge CW, Schlum DR, Rajah R, et al. Epidemiology of diarrhoeal illness associated with coccidian-like organisms among travelers and foreign residents in Nepal. *Lancet* 1993;349:1175-1179.
137. Hoge CW, Schlum DR, Ghimire M, et al. Placebo-controlled trial of cotrimoxazole for cyclospora infections among travelers and foreign residents in Nepal. *Lancet* 1995;345:691-693.
138. Holtan NR. Giardiasis. A crimp in the life-style of campers, travelers, and others. *Postgrad Med* 1988;83:54-57.
139. Hopkins DR, Ruiz-Tiben E, Reubush TK, et al. Dracunculiasis eradication: delayed, not denied. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:163-168.
140. Hotez PJ, Pritchard DI. Hookworm infection. *Sci Am* 1995;272:68-74.
141. Hulbert TV, Larsen RA, Chandrasoma PT. Abdominal angiostrongyliasis mimicking acute appendicitis and Meckel's diverticulum: report of a case in the United States and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:836-840.
142. Ikeda K, Kumashiro R, Kifune T. Nine cases of acute gastric anisakiasis. *Gastrointest Endosc* 1989;35:304-308.
143. Ingla-Siegmán Y, Kapila R, Sen P, et al. Syndrome of hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. *Rev Infect Dis* 1981;3:397-407.
144. Isaac-Renton JL. Immunological methods of diagnosis in giardiasis: an overview. *Ann Clin Lab Sci* 1991;21:116-122.
145. Jacquier P, Tottstein B, Stringelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 1991;29:1831-1835.
146. Jensen B, Kepley W, Guarner J, et al. Comparison of polyvinyl alcohol fixative with three less hazardous fixatives for detection and identification of intestinal parasites. *J Clin Microbiol* 2000;138:1592-1598.
147. Jokipih I, Jokipih AM. Timing of symptoms and oocysts excretion in human cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 1986;315:1643-1647.
148. Jones JE. String test for diagnosing giardiasis. *Am Fam Physician* 1986;34:123-126.
149. Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994;52:115-118.
- 149a. Kazura, JW. Filariasis. In: Guerrant, RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infectious Diseases—Principles, Pathogens, and Practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999:852-860.
150. Kehl KSC, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 1995;33:416-418.
151. Kelley PW, Takafuji ET, Wiener H, et al. An outbreak of hookworm infection associated with military operations in Grenada. *Mil Med* 1989;154:55-59.
152. Keystone JS, Kozarsky P. *Blastocystis hominis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2915.
153. Khalifa KES, Roth A, Roth B, et al. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2813-2819.
154. Kirchhoff LV. Toxoplasmosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practices of Infectious Disease*. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2858.
155. Klein RA, Cleri DJ, Doshi V, et al. Disseminated *Strongyloides stercoralis*: a fatal case eluding diagnosis. *South Med J* 1983;76:1438-1440.
156. Knight R. Giardiasis, isosporiasis, and balantidiasis. *Clin Gastroenterol* 1978;7:31-47.
157. Knisley CV, Englekirk PG, Pickering LK, et al. Rapid detection of Giardia antigen in stool with the use of enzyme immunoassays. *Am J Clin Pathol* 1989;91:704-708.
158. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, et al. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J Clin Microbiol* 1994;32:1947-1975.
159. Kyambade JW, Enyaru JC, Motavu E, et al. Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull WHO* 2000;78:119-124.
160. Lapham SC, Hopkins RS, White MC, et al. A prospective study of giardiasis and water supplies in Colorado. *Am J Pub Health* 1987;77:354-355.
161. Lebar WD, Larsen EC, Patei K. Afebrile diarrhea and *Blastocystis hominis*. *Ann Intern Med* 1985;103:806.
162. Leighton PM, MacSween HM. *Strongyloides stercoralis*. The cause of an unicarial-like eruption of 65 years' duration. *Arch Intern Med* 1990;150:1747-1748.
163. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980;27:37-58.
164. Li S, Maine G, Yasuhiro S, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with recombinant antigen. *J Clin Microbiol* 2000;38:179-184.
165. Lightowler MW, Flisser A, Gauci CG, et al. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today* 2000;16:191-196.
166. Long EG, Ebrahimzadeh A, White EH, et al. Alga associated with diarrhea in patients with acquired immunodeficiency syndrome and in travelers. *J Clin Microbiol* 1990;28:1101-1104.
167. Long EG, White EH, Charnichael WW, et al. Morphologic and staining characteristics of a cyanobacterium-like organism associated with diarrhea. *J Infect Dis* 1991;164:199-202.
168. Long GW, Rickman LS, Cross JH. Rapid diagnosis of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* filariasis by an acridine orange/microhematocrit tube technique. *J Parasitol* 1990;76:278-281.
169. Lopez-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, et al. Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:503-506.
170. Lopez-Valdez R, Laguna F, Alvar J, et al. Parasitic culture of buffy-coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:937-939.
171. Lotter H, Mannweiler E, Schreier M, Tahhich E. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1992;30:3163-3167.
172. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME. Massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331:161-167.
173. MacPherson EW, MacQueen WM. Morphological diversity of *Blastocystis hominis* in sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *J Clin Microbiol* 1994;32:267-268.
174. Madder GJ, Dennison AR, Blumgart LH. Fatal ascariasis pancreatitis: an uncommon problem in the west. *Gut* 1992;33:402-403.
175. Mahannop P, Chaicumpa W, Setasuban P, et al. Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory-secretory (ES) antigen. *J Helminthol* 1992;66:297-304.
176. Manzullo EC, Chuit R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl 1):S317-S320.
177. Markell EK, Udow MP. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler? *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1023-1026.
178. Marshall BG, Kropf P, Murray K, et al. Bronchopulmonary and mediastinal leishmaniasis: an unusual clinical presentation of *Leishmania donovani* infection. *Clin Infect Dis* 2000;30:764-769.
179. Martens P, Hall L. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Emerg Infect Dis* 2000;6:103-109.
180. Marx JL. Spread of AIDS sparks new health concern. *Science* 1983;219:42-43.
181. Mattia AR, Waldron MA, Sierra LS. Use of the quantitative buffy coat system for detection of parasitemia in patients with babesiosis. *J Clin Microbiol* 1993;32:2816-2818.

182. McCabe RE, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GI, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990;2090-2101.
183. McCormick GF, Zee CS, Heiden J. *Cysticercosis cerebri*: review of 127 cases. Arch Neurol 1982;39:534-539.
184. McHenry R, Bartlett MS, Lehman GA, O'Conner KW. The yield of routine duodenal aspiration for *Giardia lamblia* during esophagogastroduodenoscopy. Gastrointest Endosc 1987;33:425-426.
185. Mirelman D, Bracha R, Chayen A. *Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. Exp Parasitol 1986;62:142-148.
186. Moneo I, Caballero ML, Gomez F, et al. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol 2000;106:177-182.
187. Moore T. Therapy for parasitic infections. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th Ed. New York: McGraw Hill, 2001:1192.
188. Moorhead WP, Guasparini R, Donovan CA, et al. Giardiasis outbreak from a chlorinated community water supply. Can J Pub Health 1990;81:358-362.
189. Morgan UM, Thompson RCA. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? Parasitol Today 1998;14:241-246.
190. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, et al. A new and improved "quick-hot gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. Arch Pathol Lab Med 1997;121:888-893.
191. Murray HS. Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. AIDS Patient Care STS 1999;13:459-465.
192. Nagler J, Brown M, Soave R. *Blastocystis hominis* in inflammatory bowel disease. J Clin Gastroenterol 1993;16:109-112.
193. Nanduri J, Kazura JW. Clinical and laboratory aspects of filariasis. Clin Microbiol Rev 1989;2:39-50.
194. Nantulya VM, Doua F, Molisho S. Diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness using an antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:42-45.
195. Nantulya VM. TrypTect CIATT—a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense* infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997;91:551-553.
196. Navin TR, Juranek DD. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiological and parasitic review. Rev Infect Dis 1984;6:313-317.
197. Neimeister R, Logan AL, Eggleton JH. Modified trichrome staining technique with xylene substitution. J Clin Microbiol 1985;22:306-307.
198. Newell EF, Vyungimana S, Geerts IK, et al. Prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burundi. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997;92:389-391.
199. Orgeta YR, Sterling CR, Gilman RH, et al. *Cyclospora* species—a new protozoan pathogen of humans. N Eng J Med 1993;328:1308-1312.
200. Ogunrinade AF, Chandrashekar R, Ebberhard ML, Weil GK. Preliminary evaluation of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for serodiagnosis of onchocerciasis. J Clin Microbiol 1993;31:1741-1745.
201. Ogunrinade A, Boakye D, Merriweather A, Unnasch TR. Distribution of the blinding and nonblinding strains of *Onchocerca volvulus* in Nigeria. Infect Dis 1999;179:1577-1579.
202. Ormerod WE. Hypothesis: the significance of Winterbottom's sign. J Trop Med Hyg 1991;94:338-340.
203. Orozco E, Baez-Camargo M, Gamboa L, et al. Molecular karyotype of related clones of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1993;59:29-40.
204. Pappé JW, Verdier RL, Boney M, et al. *Cyclospora* infection in adults infected with HIV: clinical manifestations, treatment and prophylaxis. Ann Intern Med 1994;121:654-657.
205. Parnley SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:3000-3002.
206. Partona F. The spectrum of disease in lymphatic filariasis. Ciba Found Symp 1987;127:15-31.
207. Pearson RDD, De Queiroz Sousa A. *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GI, Bennett JE, Dolan R, eds. Principles and Practices of Infectious Diseases. 3rd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1995;2067-2077.
208. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to the benches. J Clin Microbiol 1991;29:1281-1285.
209. Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, et al. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:2097-2103.
210. Persing DH, Herwaldt BL, Glaser C, et al. Infection with a babesia-like organism in northern California. N Engl J Med 1995;332:298-303.
211. Peters CS, Kathalia SB, Chittin-Swialo AL, et al. *Isospora belli* and *Cryptosporidium* spp. from a patient not suspected of having acquired immunodeficiency syndrome. Diag Microbiol Infect Dis 1987;8:197-199.
212. Petri WA Jr, Clark CG, Diamond LS. Host-parasite relationships in amebiasis: conference report. J Infect Dis 1994;169:483-484.
213. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 1994;32:746-749.
214. Pickering LK, Englekirk PG. *Giardia lamblia*. Pediatr Clin North Am 1988;35:536-577.
215. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, et al. Evaluation of commercially available preservatives for the laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. J Clin Microbiol 2000;38:1959-1964.
216. Pol S, Romana CA, Richard S, et al. *Microsporidia* infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. N Engl J Med 1993;328:95-99.
217. Polly SM. Neurocysticercosis. Infect Dis Newslett 1986;5:89-91.
218. Pollak RCG, Bendall RP, Moody A, et al. Traveler's diarrhoea associated with cyanobacterium-like bodies. Lancet 1992;340:556-557.
219. Poretti D, Felleisen E, Grimm F, et al. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am J Trop Med Hyg 1999;60:193-198.
220. Putillo DT, Myers WM, Conner DH. Fatal strongyloidiasis in immunocompromised patients. Am J Med 1974;56:488-493.
221. Rakita RM, White AC Jr, Keilhofner MA. *Loa loa* infection as a cause of migratory angioedema: report of three cases from the Texas Medical Center. Clin Infect Dis 1993;17:691-694.
222. Ravdin JL. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytotoxicity. Rev Infect Dis 1986;8:247-260.
223. Ravdin JL. *Entamoeba histolytica*—amebiasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practices of Infectious Disease. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000;2035-2049.
224. Rawlins SC, Chailet P, Ragoonanansingh RN, et al. Microscopical and serological diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. West Indian Med J 1994;43:75-79.
225. Rinder H, Janitschke K, Aspöck H, et al. A blinded, externally controlled multicenter evaluation for the detection of microsporidia by light microscopy and PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1814-1818.
226. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol 1994;32:2246-2252.
227. Roman G, Sotelo J, Del Brutto O, et al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bull WHO 2000;78:399-406.
228. Rosenthal EP, Marty P, le Fichoux Y, Sassuto IP. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis associated with HIV infection: a retrospective study of 91 French cases. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:37-42.
229. Rossitch E Jr, Carranza EJ, Samuels MA. Cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. Am Fam Physician 1990;42:867-873.
230. Rostoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, et al. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect giardia-specific antigen 65 (GAS 65). J Clin Microbiol 1989;27:1997-2002.
231. Ruffer MA. Note on the Presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the 20th dynasty (1250-1000 B.C.). BMJ 1910:16.
232. Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, et al. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool and nasopharyngeal specimens. J Clin Microbiol 1993;31:3264-3269.
233. Sakanari JA, McKerrrow JH. Anisakiasis. Clin Microbiol Rev 1989;2:278-284.
234. Sargeant PG, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978;72:164-166.
235. Sargeant PG. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. Parasitol Today 1987;3:40-43.
236. Sarti E, Schantz PM, Avila G, et al. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94:85-89.
237. Sarwaut MA, al-Shaiba AL. Parasitic infections among patients of Al Nour specialized hospital. J Egypt Soc Parasitol 1993;23:821-827.
238. Schantz PM, McAuley J. Current status of food-borne parasitic zoonoses in the United States. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;22(Suppl):65-71.
239. Scheffler EH, Van Etta LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. J Clin Microbiol 1994;32:1807-1808.
240. Schlim DR, Cohen MT, Eaton M, et al. An alga-like organism associated with an outbreak of prolonged diarrhea among foreigners in Nepal. Am J Trop Med Hyg 1991;45:383-389.
241. Schwartz DA. Cholangiocarcinoma with liver fluke infection: a preventable source for morbidity in Asian immigrants. Am J Gastroenterol 1986;81:76-79.
242. Shadduck JA, Greeley E. Microsporidia and human infections. Clin Microbiol Rev 1989;2:158-165.
243. Shandera WX. From Leningrad to the day-care center: the ubiquitous *Giardia lamblia*. West J Med 1990;153:154-159.
244. Shepherd RC, Reed CL, Sinha GP. Shedding of oocysts of *Cryptosporidium* in immunocompetent patients. J Clin Pathol 1988;42:1104-1106.
245. Sher L, Shumzaburo I, Lebeau G, Zaiko AB. Hilar cholangiocarcinoma associated with *Clonorchis*. Dig Dis Sci 1989;34:1121-1123.
246. Shetty N, Brabhu T. Evaluation of fecal preservation and staining methods in the diagnosis of acute amoebiasis and giardiasis. J Clin Pathol 1988;41:694-699.
247. Sifuentesosorio J, Porrascortes G, Bendall RP, et al. *Cyclospora cayentanensis* infection in patients with and without AIDS: biliary disease as another clinical manifestation. Clin Infect Dis 1995;21:1092-1097.
248. Simonson PE, Dunyo SK. Comparative evaluation of three new tools for diagnosis of bancroftian filariasis based on detection of specific circulating antigens. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999;93:278-282.
249. Singh BN. Pathogenic and Non-pathogenic Amoebae. New York: Wiley, 1975.
250. Sloan L, Schneider S, Rosenblatt J. Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis. J Clin Microbiol 1995;33:3124-3128.

251. Soave R. State of the art clinical article. *Cyclospora*: an overview. Clin Infect Dis 1996;23:429-437.
252. Smith JW, Patterson WJ, Hardie R, et al. 1989. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination. Epidemiol Infect 103:703-715.
253. Smith JW, Wolfe MS. Giardiasis. Annual Rev Med 1980;32:373.
254. Smith J. Institute of Parasitology at McGill. martin.parasitology.mcgill.ca/incid-nec.htm 2003.
255. Starko KM, Lippy EC, Domínguez LB, et al. Campers' diarrhea outbreak traced to water-sewage link. Public Health Rep 1986;101:527-531.
256. Stehr-Green JK, McCaig L, Remsen HM, et al. Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. Am J Trop Med Hyg 1987;36:338-342.
257. Steketee RW, Reid S, Cheng T, et al. Recurrent outbreaks of giardiasis in a child day center, Wisconsin. Am J Pub Health 1989;79:485-490.
258. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev 1996;9:563-584.
259. Stibbs HH. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. J Clin Microbiol 1989;27:2582-2588.
260. Steketee RW, Reid S, Cheng T, et al. Recurrent outbreaks of giardiasis in a child day care center, Wisconsin. Am J Pub Health 1989;79:485-490.
261. Strickland GT, Abdel-Wahab M. Schistosomiasis. In: Strickland CT, ed. Hunter's Tropical Medicine. 7th Ed. Philadelphia: Saunders, 1991;781-802.
262. Tan JS. Common and uncommon parasitic infections in the United States. Med Clin North Am 1978;62:1959-1081.
263. Tantowitz HB, Korchhoff LV, Simon D, et al. Chagas' disease. Clin Microbiol Rev 1992;5:400-419.
264. Tietze PE, Tietze PH. The roundworms. *Ascaris lumbricoides*. Primary Care 1991;18:23-41.
265. Todorov T, Bopeva V. *Echinococcus* in children and adolescents in Bulgaria: a comparative study. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:135-144.
266. Tremblay A, MacLean JD, Gyorkos T, Macpherson DW. Outbreak of cutaneous larva migrans in a group of travelers. Trop Med Int Health 2000;5:330-334.
267. Ungar BLP. Cryptosporidiosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practices of Infectious Diseases. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2903.
268. van Etten L, Folman CC, Eggelte TA. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with are agent strip. J Clin Microbiol 1994;2404-2406.
269. Vannatta JB, Adamson D, Mujilican K. *Blastocystis hominis* infection presenting as recurrent diarrhea. Ann Intern Med 1985;102:495-496.
270. Vargas MA, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: changes in the zymodeme of cloned nonpathogenic trophozoites cultured under different conditions. Parasitol Res 1993;19:353-356.
271. Verastegui M, Moro P, Guevera A, et al. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. 1992;L30:1557-1561.
272. Vermud SH, Lalleur F, MacLoed S. Parasitic infections in a New York City hospital: trends from 1971 to 1984. Am J Pub Health 1986;76:1024-1026.
273. Walden J. Parasitic diseases: other roundworms: trichiurias, hookworm, and strongyloides. Primary Care 1991;18:53-74.
274. Walls KW, Smith JW. Serology of parasitic infections. Lab Med 1979;10:329-336.
275. Wamae CN. Advances in the diagnosis of human lymphatic filariasis: a review. E Afr Med J 1994;74:171-182.
276. Warren KS, Mahmoud AAF. Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases: XII. Prevention of exotic diseases: advice to travelers. J Infect Dis 1976;133:596-601.
277. Watt G, Saiom S, Jongsakul K, et al. Blinded, placebo-controlled trial of antiparasitic drugs for trichinosis myositis. J Infect Dis 2000;182:371-374.
278. Webbe G. Human cysticercosis: parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. Pharmacol Ther 1994;64:175-200.
279. Weber R, Bryan RT, Juraneck DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J Clin Microbiol 1992;30:2869-2873.
280. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidian infections. Clin Microbiol Rev 1994;7:426-461.
281. Weil GJ, Jain DC, Santhanasa S, et al. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. J Infect Dis 1987;165:350-355.
282. Weinke T, Friedrich-Janichke B, Hopp P, Janitschke D. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. J Infect Dis 1990;161:1029-1031.
283. Weiss JB. DNA probes and PCR for the diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995;8:113-130.
284. Welch TP. Risk of giardiasis from consumption of wilderness water in North America: a systematic review of epidemiologic data. Int J Infect Dis 2000;4:100-103.
285. Welsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986;8:118-238.
286. White AC Jr, Tato P, Molinari JL. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. Infect Agents Dis 1992;1:185-193.
287. Whittner M, Tanowitz HB, Weiss LM. Parasitic infection in AIDS patients: cryptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, cyclosporiasis. Infect Dis Clin 1993;7:569-586.
288. Williams HA, Robens J, Kachur P. Malaria surveillance—United States, 1995. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, Epidemiology Program Office, 1995.
289. Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. Br J Biomed Sci 1999;56:293-306.
290. Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, et al. Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. Br J Biomed Sci 2002;59:154-157.
291. Witoonpanich R, Chuahirun S, Soranatapom S, Rojanasunon P. *Eosinophilic meningoencephalitis* caused by *Angiostrongylus cantonensis*: a report of three cases. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;22:262-267.
292. Wolf MS. Giardiasis. Clin Microbiol Rev 1992;5:93-100.
293. Wong SY, Jaidu MP, Ramirez R, et al. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1993;32:2952-2959.
294. Woo PT, Paterson WB. *Giardia lamblia* in children in day-care centers in southern Ontario, Canada, and susceptibility to animals to *G. lamblia*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986;80:56-59.
295. World Health organization. Epidemiology and control of African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee. WHO Tech Rep Ser 1986;739:36-58.
296. Wurtz R, Koka FE, Peters CS, et al. Clinical characteristics of seven cases of diarrhea associated with a novel acid-fast organism in the stool. Clin Infect Dis 1991;16:136-138.
297. Wunz R. *Cyclospora*: A newly identified intestinal pathogen of humans. Clin Infect Dis 1994;18:620-626.
298. Woo PT, Paterson WB. *Giardia lamblia* in children in daycare centers in southern Ontario, Canada, and susceptibility of animals to *G. lamblia*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986;80:56-59.
299. Yamasaki H, Araki K, Lim PK, et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocarasis. J Clin Microbiol 2000;38:1409-1413.
300. Yang J, Scholton T. *Dientamoeba fragilis*: a review with notes on epidemiology, pathogenicity, modes of transmission, and diagnosis. Am J Trop Med Hyg 1979;26:16-22.
301. Yaquihashi A, Sato N, Takahashi S, et al. A serodiagnostic assay by microenzyme-linked immunosorbent assay for human anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis larvæ* antigen. J Infect Dis 1990;161:995-998.
302. Yau YC, Crandall I, Kain KC. Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. J Clin Microbiol 2001;39:716-719.
303. Yen C-M, Chen E-R. Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid of patients with eosinophilic meningitis. Int J Parasitol 1991;21:17-21.
304. Young DK, Bullock SL, Melvin DM, et al. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. J Clin Microbiol 1979;10:852-853.
305. Yu S, Xu L, Jiang Z, et al. Report on the first nationwide survey of the distribution of human parasites in China. Chin J Parasitol Dis 1994;12:241-247.
306. Zhu G, Marchewka MJ, Ennis JG, Keithly JS. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. J Infect Dis 1998;177:1443-1446.
307. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*: an intestinal protozoan parasite of man. Pub Health Lab 1978;36:147-160.
308. Zierdt CH, Gill VJ, Zierdt WS. Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. J Clin Microbiol 1993;31:3071-3074.
309. Zimmerman PA, Guderian RH, Araujo E, et al. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. J Infect Dis 1994;169:686-689.

Diagnóstico de infecciones causadas por virus, *Chlamydia*, *Rickettsia* y microorganismos relacionados

Introducción

- Reseña histórica
- Evolución de las técnicas de cultivos celulares
- Evolución de los servicios de diagnóstico virológico
- Niveles de servicio

Taxonomía y nomenclatura

Manifestaciones clínicas de las infecciones virales

- Ortomixovirus
- Paramixovirus
 - Virus parainfluenza
 - Virus de la parotiditis
 - Virus del sarampión
 - Virus sincitial respiratorio
 - Otros paramixovirus
- Picornavirus
- Rhabdovirus
- Arenavirus
- Filovirus
- Togavirus
- Bunyavirus
 - Virus de la encefalitis de California
 - Hantavirus
- Virus de la gastroenteritis humana
 - Rotavirus

- Calicivirus
- Astrovirus
- Adenovirus entéricos
- Coronavirus
- Coltivirus
- Retrovirus
- Herpesvirus
 - Virus del herpes simple
 - Citomegalovirus
 - Virus de Epstein-Barr
 - Virus de la varicela-zóster
 - Herpesvirus humanos 6 y 7
 - Herpesvirus humano 8
 - Virus B

Adenovirus

Poxvirus

Papovavirus

- Virus del papiloma
- Virus del polio

Parvovirus

Virus de las hepatitis

- Virus de la hepatitis A
- Virus de la hepatitis B
- Virus de la hepatitis C
- Virus de la hepatitis D
- Virus de la hepatitis E

Enfermedades causadas por priones
(encefalopatías espongiformes
transmisibles)

Clasificación clínica de las infecciones virales

Diagnóstico de las infecciones virales

- Obtención de muestras para el diagnóstico
- Transporte y conservación de las muestras
- Aislamiento de virus en cultivo
- Preparación y mantenimiento de cultivos celulares
- Contaminación de cultivos celulares
- Aspectos técnicos de los cultivos celulares
- Selección de cultivos celulares para el aislamiento de virus
- Siembra e incubación de cultivos celulares
- Detección de virus e identificación provisoria
 - Efecto citopático
 - Hemaglutinación y hemadsorción
 - Microscopia óptica
 - Microscopia electrónica
 - Diferenciación bioquímica
 - Asociación con las células
 - Detección de antígenos virales
 - Artefactos y alteraciones no causados por virus
- Identificación definitiva de los aislamientos
- Conservación de los aislamientos virales
- Resumen de la detección e identificación de los virus en cultivo

Detección directa de virus en muestras clínicas

- Detección de cuerpos de inclusión por microscopia óptica
- Detección de partículas virales por microscopia electrónica
- Detección inmunológica de antígenos virales
 - Virus respiratorios
 - Virus del grupo herpes
 - Otros virus
- Técnicas moleculares
 - Virus de la inmunodeficiencia humana
 - Virus de la hepatitis C
 - Virus de la hepatitis B
 - Virus del papiloma humano
 - Parvovirus B19
 - Virus del Nilo Occidental
 - Virus del herpes simple
 - Citomegalovirus
 - Enterovirus

Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG)

Otras infecciones virales

Selección de pruebas para diagnóstico rápido

Diagnóstico serológico de las infecciones virales

- Virus de la inmunodeficiencia humana
- Virus de la hepatitis B y virus de Epstein-Barr
- Virus de la hepatitis A
- Virus de la hepatitis C
- Parvovirus
- Virus del herpes simple
- Virus de la varicela-zóster
- Citomegalovirus
- Virus del Nilo Occidental
- Rubéola
- Coronavirus del SRAG
- Anticuerpos IgM
- Procedimientos serológicos diversos
- Diagnóstico de otras infecciones virales
- Pruebas de sensibilidad a los antivirales

Infecciones causadas por especies de *Chlamydia*

Chlamydia trachomatis

- Características clínicas y epidemiología
- Obtención de muestras
- Aislamiento de *Chlamydia trachomatis* en cultivos celulares
- Detección directa de *Chlamydia trachomatis* en muestras clínicas
- Diagnóstico serológico
- Otros métodos de diagnóstico
- Diagnóstico de abuso sexual

Chlamydia psittaci

Chlamydia pneumoniae

Infecciones por *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*

Rickettsia y *Coxiella*

- Características clínicas y epidemiología
- Obtención de muestras
- Aislamiento de *Rickettsia* y *Coxiella* en cultivo
- Detección directa de antígeno y ácidos nucleicos en muestras clínicas
- Diagnóstico serológico

Especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*

Introducción

El diagnóstico virológico es un agregado reciente a los servicios ofrecidos por los laboratorios de microbiología clínica. Se han recorrido tres etapas bien definidas a medida que los laboratoristas han proporcionado datos objetivos a los médicos para evaluar a los pacientes con infecciones virales.

Reseña histórica

La primera etapa de interés histórico abarca los años durante los cuales se estableció la existencia de infecciones por partículas submicroscópicas. Durante muchas décadas después de que Carlos Finlay adelantara la hipótesis de que la fiebre amarilla era transmitida por la picadura de un mosquito, los únicos medios disponibles para el aislamiento de agentes virales eran la inoculación de animales o huevos embrionados. Los huevos embrionados de gallina todavía se inoculan para la vigilancia de las infecciones causadas por el virus de la influenza A si no se cuenta con cultivos celulares. Los nuevos agentes continúan siendo descubiertos sólo por el uso de primates no humanos (kuru y virus de Creutzfeldt-Jakob)¹⁷¹ e incluso voluntarios humanos (agente Norwalk de la gastroenteritis infecciosa).²⁷²

Evolución de las técnicas de cultivos celulares

El siguiente gran adelanto en virología diagnóstica fue proporcionado por Enders y cols., quienes demostraron que el virus que causaba la poliomielitis podía ser aislado en células de origen no neurológico in vitro.¹⁴³ En las décadas de 1950 y 1960 hubo una rápida expansión del conocimiento de las características clínicas, la epidemiología y el diagnóstico de las infecciones virales comunes, proporcionado en su mayoría por la utilización masiva de los cultivos celulares. Los esfuerzos diagnósticos, que constituyeron parte integral de los estudios clínicos, fueron incorporados a los planes de los laboratorios de investigación estatales y universitarios. El elevado costo de la

identificación definitiva de los aislamientos, la ausencia de una terapéutica antiviral eficaz y la escasez de instalaciones para cultivos de tejidos se combinaron para limitar la incorporación de estas pruebas al laboratorio de microbiología clínica. Levine ha presentado una descripción más detallada del desarrollo histórico de la virología.³⁰⁸

Evolución de los servicios de diagnóstico virológico

El primer paso fue la incorporación de servicios de diagnóstico en los laboratorios de microbiología clínica, muchos de los cuales ya habían limitado sus servicios a la bacteriología (incluida la micobacteriología), la micología y la parasitología. En el recuadro 23-1 se resumen algunos de los factores que facilitaron y estimularon esta transferencia de los laboratorios de investigación de un departamento clínico a los laboratorios de diagnóstico, ubicados casi siempre en un departamento de anatomía patológica o de microbiología. En las ediciones anteriores de este libro puede consultarse una exposición más detallada de esta transición.

La complejidad y la modernización del diagnóstico virológico tradicional hicieron que la mayoría de los laboratorios clínicos capaces de asumir este desafío se encontraran en centros médicos importantes, muchos de los cuales estaban asociados con centros académicos. En la década pasada, el ritmo de desarrollo tecnológico se ha acelerado, de modo que ciertas pruebas de diagnóstico virológico pudieron introducirse en los hospitales de la comunidad. En el recuadro 23-1 se resumen algunos de los desarrollos que favorecieron la concentración adicional de servicios de diagnóstico en los laboratorios clínicos, ya sea de hospitales o privados. Además de los problemas científicos, un determinante sustancial fue la promulgación y entrada en vigor de las CLIA '88 (Enmiendas para la mejora del laboratorio clínico, 1988), el primer proyecto importante acerca de la vigilancia de laboratorios desde la Ley de mejora de laboratorios clínicos de 1967 (CLIA '67). Los numerosos requisitos para el personal y la realización de las pruebas eran

Recuadro 23-1 Algunos factores que facilitan la remisión de un laboratorio de investigación a un laboratorio de diagnóstico

Factores que promueven la remisión de pruebas al laboratorio clínico

Aparición de cuadros clínicos en los que el diagnóstico viral es esencial; por ejemplo, herpes simple en las mujeres embarazadas.

Desarrollo de terapéutica antiviral.

Disponibilidad de fuentes comerciales fiables de células de mamífero para cultivo.

Aplicación de la técnica de anticuerpos monoclonales al diagnóstico, con disponibilidad comercial de reactivos fiables.

Posibilidad de un diagnóstico más rápido por la aplicación de las técnicas de anticuerpos monoclonales y de amplificación por centrifugación (*shell vial*).

Aplicación de enzimoanálisis para el diagnóstico directo.

Reglamentación de los laboratorios de hospital según la CLIA '67.

Apoyo para la epidemiología de salud pública de las enfermedades transmisibles.

Desarrollos recientes en virología diagnóstica

Frecuencia creciente de cuadros clínicos que dependen del diagnóstico viral; por ejemplo, aumento de la capacidad en virología de la inmunodeficiencia humana, control de infecciones en los receptores de trasplantes.

Aumento del número de enfermedades para las que es posible la terapéutica antiviral, incluso la terapia de combinación.

Fuentes comerciales de células sobre cubreobjetos para cultivos en frascos ampolla; desarrollo de mezclas de células.

Desplazamiento de la técnica de amplificación de ácidos nucleicos del laboratorio de investigación a la clínica; disponibilidad comercial de sistemas o reactivos validados para la amplificación.

Introducción del diagnóstico sumamente rápido por la aplicación de la PCR en tiempo real a la detección de agentes en muestras clínicas.

Desarrollo de inmunoanálisis sobre membranas, que pueden realizarse en forma rápida y sencilla.

Extensión de la reglamentación a todos los laboratorios, incluso los consultorios médicos, según la CLIA '88.

Apoyo a la investigación de amenazas bioterroristas.

Recuadro 23-2 Niveles de servicios de diagnóstico

Nivel 1	No presta ningún servicio de virología. Las muestras se obtienen para el traslado a un laboratorio de referencia.
Nivel 2	Se realizan procedimientos virológicos limitados. Estos laboratorios pueden o no tener la capacidad para detectar antígenos virales o de clamidias en las secreciones y líquidos corporales. Estos laboratorios pueden o no tener la capacidad de sembrar muestras en cultivo de tejidos para el traslado a los laboratorios de referencia.
Nivel 3	Estos laboratorios pueden aislar determinados grupos virales que se desarrollan en los cultivos celulares normalmente usados. También pueden realizar la identificación limitada de determinados agentes para los que existen en el comercio sistemas de transporte, de aislamiento celular y de confirmación simple inmunológica, y envían otros aislamientos a los laboratorios de referencia.
Nivel 4	Estos laboratorios deben disponer de personal con un grado alto de especialización en virología, que pueda aislar todos los grupos virales comunes y realizar las identificaciones clínicamente pertinentes.
Nivel 5	Laboratorios con capacidad para realizar las pruebas de amplificación molecular complejas, incluso la amplificación en tiempo real.

familiares para la mayoría de los laboratorios clínicos, pero extraños (y muy mal recibidos) para gran parte de los laboratorios de investigación, y casi fuera del alcance de los laboratorios de los consultorios médicos.

Niveles de servicio

Cada director o supervisor de laboratorio debe decidir el nivel de servicios conveniente para las necesidades clínicas locales. Es mucho mejor limitar los alcances del esfuerzo a las pruebas que puedan realizarse con alta eficiencia que intentar una cobertura amplia cuando los recursos son insuficientes. Pueden determinarse diferentes niveles posibles de servicio, que se enumeran en el recuadro 23-2.

La mayoría de los laboratorios de los hospitales pequeños probablemente caen dentro de los niveles 1 o 2,⁴⁵⁴ en tanto que los laboratorios de hospitales comunitarios grandes y los laboratorios universitarios pueden ofrecer servicios de nivel 3, 4 o 5. Estos hospitales tienen mayores probabilidades de atender a pacientes que necesiten servicios de virología integrales. Es posible utilizar dichos laboratorios como recursos de diagnóstico regional.

Taxonomía y nomenclatura

La taxonomía es la ciencia de clasificación sistemática que usa reglas y principios generales; el término se emplea con mayor frecuencia para el estudio de los seres vivos. La nomenclatura es la actividad de atribuir nombres a los sujetos taxonómicos.

Muchas infecciones virales, como la gripe, la varicela, el sarampión y la hepatitis, se caracterizaron perfectamente desde el punto de vista clínico mucho antes de que se descubriera el agente etiológico. Una vez aislado, se adjudicó al virus el nombre del correspondiente cuadro clínico. En un intento de poner orden en el esquema de clasificación, los taxonomistas han utilizado los modernos conocimientos de estructura viral y composición antigénica para construir una clasificación sistemática.¹⁰⁷ Los órdenes, las familias y los géneros tienen raíz latina, pero el concepto de especie ha sido más difícil para los virólogos.^{56,491} A menudo, se utilizan los nombres vernáculos como designación de especie.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) ha propues-

to el Sistema Universal de Taxonomía Viral ICTV. En el recuadro 23-3 se resumen las convenciones de nomenclatura viral. Los nombres jerárquicos se escriben en bastardilla y pueden ser precedidos por el taxón, que no se escribe en bastardilla. En el caso del nombre de las especies, nos encontramos con la situación peculiar de que las mismas palabras pueden ponerse en bastardilla o no, según formen parte de una designación taxonómica o se usen como nombre vernáculo. La designación taxonómica sólo debe utilizarse una vez en una publicación científica. Por ejemplo, una descripción podría referirse al virus del sarampión (*virus del sarampión*, género *Morbillivirus*, familia *Paramyxoviridae*). Si bien en este momento este enfoque de la taxonomía y de la nomenclatura parece tener preferencia, el tema no se ha resuelto en forma definitiva.

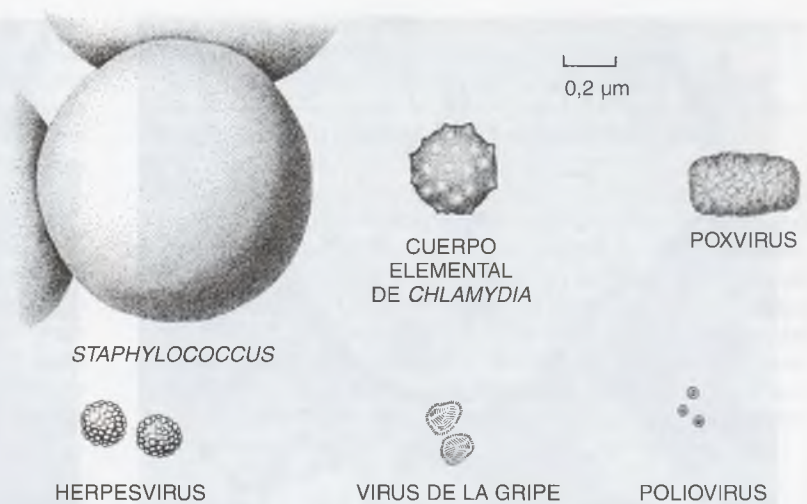
Gran parte de la taxonomía viral deriva del conocimiento detallado de la estructura de los virus. Éstos se encuentran entre los más pequeños agentes infecciosos (fig. 23-1). Los poxvirus, que son los miembros más grandes de la familia de los virus y que tienen un tamaño similar a las bacterias más pequeñas, están cerca del límite de resolución del microscopio óptico; para los otros virus se necesita un microscopio electrónico.

Casi sin excepción, los virus contienen DNA o RNA, pero no ambos. El centro de cualquier partícula viral, el core de nucleoproteína, contiene ácido nucleico espiralado y proteína.²¹⁵ Alrededor del core se encuentra una cubierta protectora compuesta por unidades repetitivas denominadas capsómeros, que en su conjunto forman la cápside. Junto con la nucleoproteína, se completa la nucleocápside. La arquitectura de la mayoría de los virus tiene una simetría que puede ser helicoidal, similar a la de los ácidos nucleicos, o icosaédrica, que es

Recuadro 23-3 Convenciones para la nomenclatura de virus

Jerarquía taxonómica	Desinencia	Ejemplo
Orden	- <i>virales</i>	<i>Mononegavirales</i>
Familia	- <i>viridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>
Subfamilia	- <i>virinae</i>	<i>Pneumovirinae</i>
Género	- <i>virus</i>	<i>Pneumovirus</i>
Especie	Ninguna	Virus sincitial respiratorio humano

Figura 23-1 Los virus son los agentes infecciosos más pequeños. En la figura se compara el tamaño relativo de una bacteria, *Staphylococcus*, con *Chlamydia*, con el grupo de virus de mayor tamaño (poxvirus) y con uno de los virus más pequeños (poliovirus, miembro del grupo de los enterovirus).



la estructura de una cúpula geodésica. Estas dos simetrías, ilustradas en la figura 23-2, proporcionan la forma más eficiente de ensamblaje de las capas estructurales, economía esencial para estas partículas extremadamente pequeñas con recursos genéticos limitados.

Como regla, los virus de DNA se replican y se ensamblan en el núcleo; los virus de RNA se ensamblan en el citoplasma. Los complejos eventos que se suceden después de que un virus infecta a una célula se reflejan sólo de forma incompleta como

alteraciones morfológicas celulares. Sin embargo, en algunos casos se ve con claridad cómo el virus se ha apropiado de los recursos genéticos de la célula (fig. 23-3A y B). El ensamblaje final de algunos virus tiene lugar en la membrana citoplasmática o nuclear. A medida que el virión se desplaza del núcleo al citoplasma o del citoplasma al espacio extracelular, se agrega a la nucleocápside una envoltura externa que contiene lípidos (véanse figs. 23-2, 23-3A y F, y cuadro 23-2). Los solventes de los lípidos inactivan a estos virus envueltos, en tanto que no

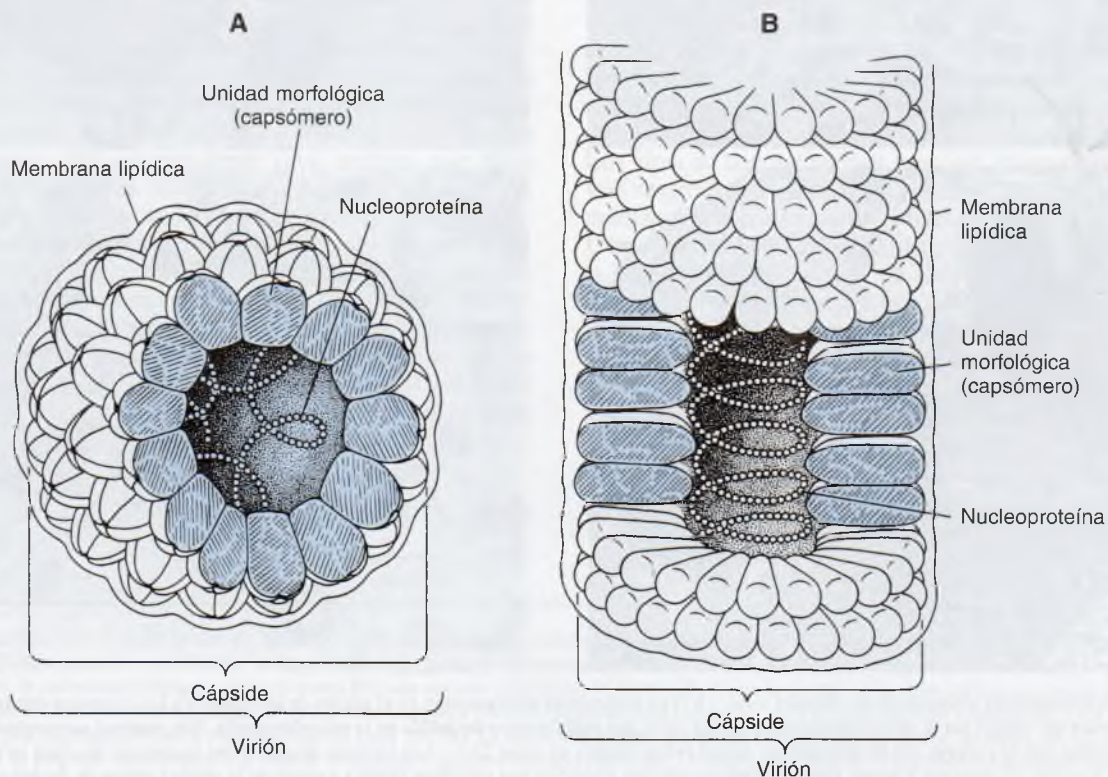


Figura 23-2 Estructura viral. Los virus están organizados de una manera muy ordenada. Un core central de nucleoproteína se encuentra rodeado por una cápside proteica, constituida por capsómeros individuales. Algunos virus también tienen una membrana lipoproteica alrededor de la nucleocápside. Los dos patrones de simetría de organización más comunes son la simetría icosaédrica (A) y la helicoidal (B). Cuando se los observa con el microscopio electrónico, los virus icosaédricos parecen esféricos, aunque a veces se visualizan sus facetas (véase la ilustración del adenovirus del cuadro 23-2).

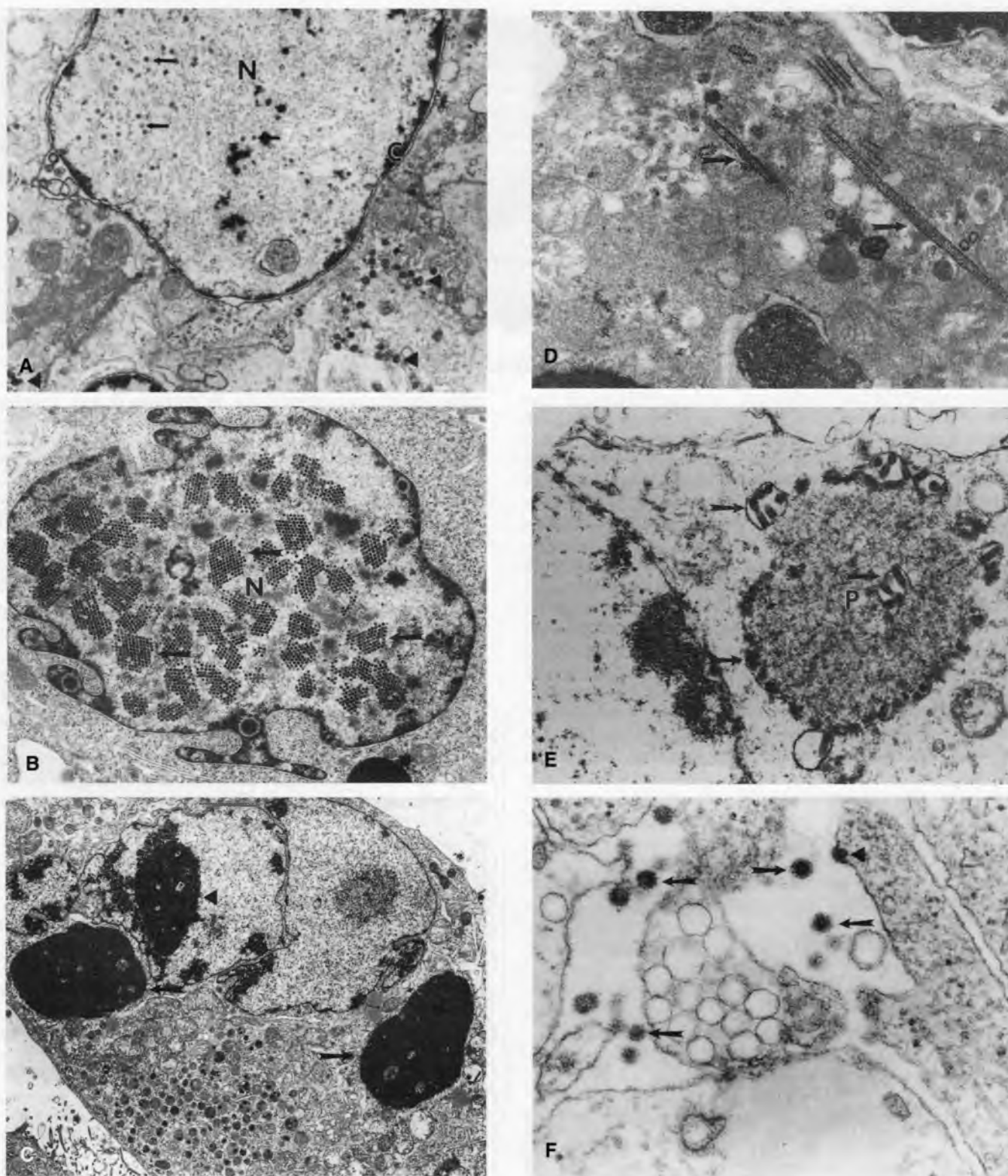


Figura 23-3 Microfotografías electrónicas de diversos virus. (A) Los herpesvirus se ensamblan en el núcleo de la célula (N). La cromatina celular (C) es desplazada hacia los bordes del núcleo por la desoxirribonucleoproteína viral, que está ligeramente teñida en la microfotografía. Este material corresponde a la inclusión intranuclear eosinófila que se observa con el microscopio óptico (véase lámina en color 23-1). Los viriones desnudos (no envueltos) (flechas) se ensamblan en el núcleo. Fuera de la célula, se observan algunos viriones maduros que han adquirido una envoltura lipídica a partir de la célula (puntas de flecha) (células MRC-5, infectadas por virus del herpes simple tipo 1, 22 400×). (B) Los adenovirus se ensamblan en el núcleo (N). Tienen simetría icosaédrica y son no envueltos. Con frecuencia se encuentran agrupados densamente en disposición paracristalina (flechas). A medida que los virus se acumulan, la totalidad del núcleo puede estar repleta de viriones, que producen las inclusiones que se observan con el microscopio óptico (véase lámina en color 23-1E) (células HEp-2 infectadas, 22 400×). (C) El virus sincitial respiratorio se ensambla en el citoplasma y madura a nivel de la membrana celular. Pueden verse inclusiones en el citoplasma de las células infectadas, tanto in vivo como in vitro (véase lámina en color 23-1G). Las inclusiones (flechas) son intracitoplasmáticas y están compuestas por ribonucleoproteína fibrilar.

afectan a sus congéneres no envueltos. La replicación de algunos virus causa la muerte de la célula, con liberación de las nucleocápsides ensambladas. Los virus envueltos que maduran a nivel de la membrana citoplasmática se liberan de la célula por "brotación" a través de la membrana (véanse figs. 23-3F y 23-16). Durante este proceso, la envoltura incorpora porciones de la membrana lipídica, así como glucoproteínas especificadas por el virus, que se insertan dentro de la membrana.

En los cuadros 23-1 y 23-2 se resumen los principales grupos de virus. Se han agregado microfotografías electrónicas ilustrativas de partículas virales con tinción negativa (proporcionadas por Frederick A. Murphy) yuxtapuestas a una breve descripción de las familias y los géneros. La lista no es exhaustiva, pero incluye los patógenos humanos más importantes. Las características taxonómicas se resumen en los cuadros, pero en el texto se siguen usando los nombres vernáculos.

Las características estructurales y bioquímicas que se utilizan para la clasificación son el tipo de ácido nucleico (DNA o RNA), la configuración o simetría de la nucleocápside (helicoidal, icosaédrica o compleja), la presencia o la ausencia de una envoltura lipídica, el tamaño del virión, la cantidad de capsómeros, la estabilidad del virión frente a los tratamientos químicos y la composición antigénica. Los virus contienen RNA o DNA. La mayoría de los virus de RNA son de cadena simple y se replican en el citoplasma; los virus de DNA son de doble cadena y se reproducen en el núcleo. Las principales excepciones respecto del sitio de replicación son los virus de la gripe (RNA), cuya replicación empieza en el núcleo, y los poxvirus (DNA), que se replican en el citoplasma. Los reovirus son virus de RNA de cadena doble; los parvovirus son virus de DNA de cadena simple.

La polaridad de los virus de RNA se considera positiva si un virus puede funcionar como mRNA (es decir, las proteínas necesarias para construir el virión pueden sintetizarse directamente a partir del ácido nucleico viral, una vez que es liberado en el interior de la célula por la disgregación de la cápside del virión). Un virus de RNA con polaridad negativa debe usar una RNA polimerasa RNA-dependiente (una enzima que debe encontrarse empaquetada con el ácido nucleico en el virión infectante) para sintetizar un RNA con polaridad positiva, después de lo cual pueden sintetizarse las proteínas necesarias. El genoma de la mayoría de los virus de RNA está contenido en un segmento lineal, pero en algunos casos hay segmentos múltiples. El genoma segmentado permite un mayor potencial de reordenamiento genético cuando dos cepas infectan la misma célula. Una de las explicaciones para la asombrosa habilidad del virus de la gripe para cambiar y adaptarse es su genoma

segmentado, que facilita la recombinación de segmentos cuando dos viriones diferentes infectan la misma célula.

Manifestaciones clínicas de las infecciones virales

Las manifestaciones clínicas de una infección viral son muy numerosas. Los síntomas generales son fiebre con escalofríos o no, malestar general y mialgias. Los síntomas específicos derivan fundamentalmente de la propensión del virus para infectar diferentes células y tejidos (tropismo), pero también pueden depender de la vía de infección, de la virulencia de la cepa, del nivel inmunitario del paciente y de otros factores predisponentes, como las cardiopatías o neumopatías subyacentes. El lector puede consultar varios excelentes libros de texto para obtener otros detalles.^{284,418}

Ortomixovirus

Los ortomixovirus, que incluyen los virus de la gripe o virus influenza A, B y C, causan una amplia variedad de infecciones respiratorias.^{58,393} El síndrome gripal comienza súbitamente con cefalea, fiebre, escalofríos y tos seca; luego, aparecen fiebre alta, mialgias, malestar general y anorexia. En los niños pequeños los síntomas gastrointestinales pueden ser considerables. Casi todos los casos de gripe se registran durante el invierno. Los virus influenza A y B son responsables de la mayor parte de las enfermedades respiratorias epidémicas en las que hay exceso de mortalidad. Rara vez se aíslan en ausencia de infección. El virus influenza A infecta diversas especies de mamíferos y aves. Se describió la transmisión ocasional de influenza porcina del cerdo al hombre.⁵¹² La preocupación acerca de la infección humana con el virus porcino originó una campaña de vacunación de alcance nacional en 1976, con la aparición de casos inesperados e indeseables de síndrome de Guillain-Barré como resultado. El virus influenza C es una causa poco frecuente de infección humana, pero puede causar bronquitis y neumonía.³⁵⁶ Los virus de la gripe pueden provocar infecciones graves de las vías respiratorias bajas por sí mismos o, con mayor frecuencia, predisponer al paciente a una infección bacteriana secundaria.⁵⁰⁹ Un giro reciente en los cuadros de infección secundaria ha sido la producción de síndrome de shock tóxico por la invasión de *Staphylococcus aureus*.³¹⁹ Otras complicaciones de la gripe son la miocarditis¹⁴⁴ y la encefalopatía,^{233,468} aunque el virus casi nunca se detecta en estas situaciones.

La estructura y la función del virus de la gripe están íntimamente relacionadas con la patogenia y el diagnóstico de labo-

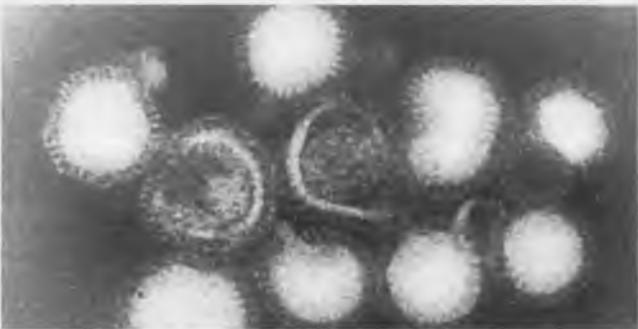
Compárese la densidad del nucléolo (*punta de flecha*) con la de las inclusiones (células HEp-2 infectadas, 3 150×). (D) Coxsackievirus B. Los enterovirus son pequeños virus de RNA con simetría icosaédrica y suelen ordenarse en masas paracristalinas (*flechas*). Se ensamblan en el citoplasma. Con el microscopio óptico, no se observan cuerpos de inclusión (células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas, 56 000×). (E) Virus de la rabia. Este rhabdovirus con forma de bala se ensambla en el citoplasma. La nucleoproteína fibrilar (P) y los virus alargados (*flechas*) se encuentran juntos. La masa de material viral corresponde a los cuerpos de Negri que se observan por microscopía óptica (véase lámina en color 23-1H). La estructura interna que puede verse dentro del cuerpo de Negri clásico es el resultado de la incorporación de material citoplasmático al cuerpo de inclusión (cerebro humano infectado, 25 000×). (F) Virus de la encefalitis equina del Este. Este togavirus ilustra la maduración de partículas virales en la superficie de la célula. Los viriones maduros (*flechas*) se encuentran en el espacio extracelular. Se destaca un virión en proceso de maduración (*brotación*) por el core denso de nucleoproteína y una condensación de la membrana celular en el punto en que se está formando la envoltura (*punta de flecha*). Algunos virus, como los mixovirus, insertan sus hemaglutininas dentro de la membrana en esta etapa; pueden detectarse por la adherencia de eritrocitos a la hemaglutinina viral presente en la membrana celular (hemadsorción) (cerebro de ratón infectado, 60 000×). (E, cortesía de Daniel Perl; F, cortesía de Frederick Murphy).

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre)

Familia: *Orthomyxoviridae*
Género *Influenza virus A*
Género *Influenza virus B*
Género *Influenza virus C*
Género *Influenza virus D*
(*Thogotovirus*)

Tamaño: 100 nm, esféricos o pleomorfos
Ácido nucleico: RNA segmentado, de polaridad negativa, cadena simple
Simetría: helicoidal
Envoltura lipídica: presente
Antígenos: hemaglutinina y neuraminidasa
Hábitat natural: hombre y animales
Distribución: mundial

Forma de transmisión: diseminación por microgotas en aerosol de una persona a otra; rara vez de animales al hombre
Vía de infección: respiratoria
Enfermedades: infecciones respiratorias incluidas coriza (resfriado común), traqueobronquitis y neumonía. Los síntomas extrapulmonares son prominentes en el síndrome gripal; raras veces se presenta enfermedad extrapulmonar, como miocarditis



Virus influenza A. Las partículas son groseramente esféricas pero irregulares. La estructura helicoidal interna es difícil de observar, pero las proyecciones similares a flecos de la hemaglutinina y la neuraminidasa son evidentes. 135 000x.

Familia: *Paramyxoviridae*
Subfamilia *Paramyxovirinae*
Género *Respirovirus*
Especie *Virus parainfluenza humano 1*
Especie *Virus parainfluenza humano 3*
Género *Rubulavirus*
Especie *Virus parainfluenza humano 2*
Especie *Virus parainfluenza humano 4*
Especie *Virus de la parotiditis*
Género *Morbillivirus*
Especie *Virus del sarampión*
Subfamilia *Pneumovirinae*
Género *Pneumovirus*
Especie *Virus sincitial respiratorio*
Género *Metapneumovirus*
Especie *Metapneumovirus humano*

Tamaño: 150-300 nm, esféricos o pleomorfos
Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad negativa, cadena simple
Simetría: helicoidal
Envoltura lipídica: presente
Antígenos: hemaglutinina, neuraminidasa, proteína de fusión, nucleocápside (depende del virus)
Hábitat natural: hombre y animales
Distribución: mundial

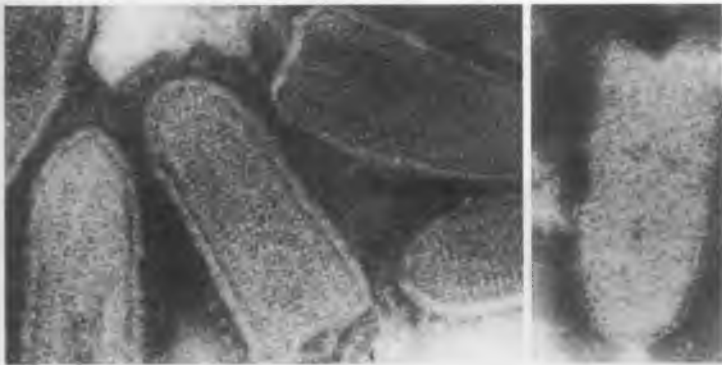
Forma de transmisión: aerosoles de gotitas o inoculación directa
Vía de infección: respiratoria
Enfermedades: resfriado común, traqueobronquitis, rara vez neumonía (parainfluenza); traqueobronquitis, bronquiolitis y neumonía (virus sincitial respiratorio); parotiditis, pancreatitis, orquitis, meningitis (virus de la parotiditis); exantema, neumonía, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda (virus del sarampión)



Virus parainfluenza 1. El virión irregular ha sido destruido y libera una larga cadena de RNA no helicoidal. Son evidentes las proyecciones de la hemaglutinina en el virión. 72 000x.

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: <i>Rhabdoviridae</i> Género <i>Lyssavirus</i> Especie <i>Virus de la rabia</i>	Tamaño: 50-95 nm por 130-389 nm, en forma de bala Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad negativa, cadena simple Simetría: helicoidal Envoltura lipídica: presente Hábitat natural: animales domésticos y salvajes Distribución: mundial	Forma de transmisión: secreciones infectadas, la rabia se transmite habitualmente por mordeduras Vía de infección: cutánea o respiratoria Enfermedades: encefalitis (rabia)
--	--	---



Virus de la estomatitis vesicular. La forma de bala del virión es evidente. La naturaleza helicoidal de la ribonucleoproteína interna se refleja en las estriaciones. 216 000x.

Familia: <i>Filoviridae</i> Género “Virus tipo Marburg”, tentativamente <i>Marburgvirus</i> Especie <i>Marburgvirus</i> Género “Virus tipo Ébola”, tentativamente <i>Ebolavirus</i> Especie <i>Zaire</i> Especie <i>Sudan</i> Especie <i>Reston</i> Especie <i>Côte d’Ivoire</i>	Tamaño: 80 nm por 800-1 000 nm, filamentosos Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad negativa, cadena simple Simetría: helicoidal Envoltura lipídica: presente Hábitat natural: primates Distribución: África, Filipinas	Forma de transmisión: desconocida, pero se requiere contacto estrecho Enfermedades: fiebre hemorrágica con tasas de mortalidad de hasta el 90%
--	---	---



Virus Ébola. La forma larga, filamentososa, ha adoptado una morfología en “cayado”. 59 000x.

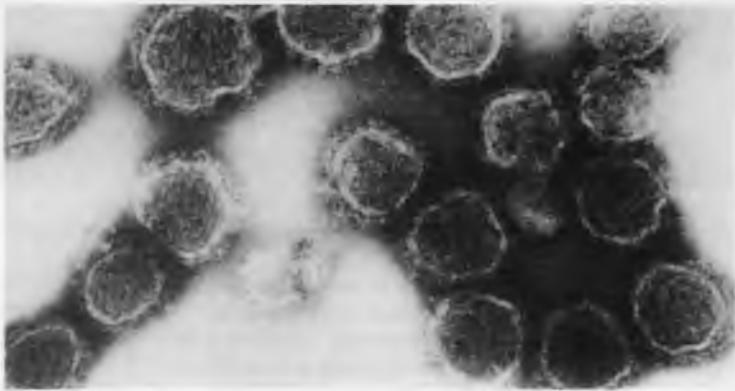
(Continúa)

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: *Bunyaviridae*
Género *Bunyavirus*
Especie *Virus de la encefalitis de California*
Especie *Virus LaCrosse*
Género *Hantavirus*
Especie *Virus Hantaan*
Especie *Virus Sin Nombre*
Género *Nairovirus*
Especie *Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo*
Género *Phlebovirus*
Especie *Virus de la fiebre del Valle del Rift*
Especie *Virus de la fiebre siciliana por flebotomos*

Tamaño: 90-120 nm
Ácido nucleico: RNA segmentado, de cadena simple. Puede tener polaridad negativa (*Bunyavirus*, *Hantavirus* y *Nairovirus*) o contener ejemplos de cada polaridad (*Phlebovirus*)
Simetría: helicoidal
Envoltura lipídica: presente
Antígenos: hemaglutinina de superficie
Hábitat natural: pequeños animales

Distribución: mundial.
Forma de transmisión: picadura de mosquitos infectados (*Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*) o exposición a excretas de roedores (*Hantavirus*)
Enfermedades: enfermedad febril; meningitis aséptica (*Bunyavirus*); enfermedad febril, fiebre hemorrágica, insuficiencia respiratoria (*Hantavirus*); enfermedad febril, fiebre hemorrágica (*Nairovirus*); enfermedad febril, encefalitis, fiebre hemorrágica (*Phlebovirus*)

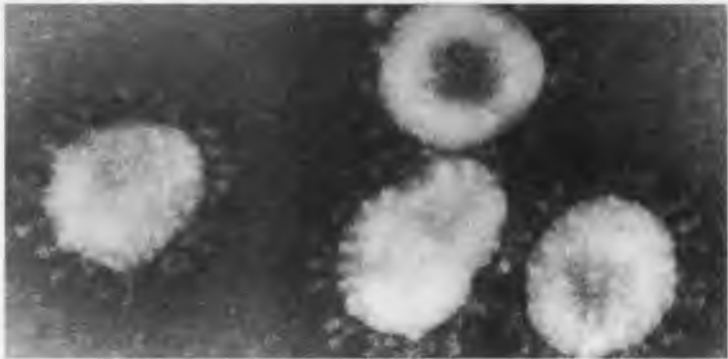


Virus LaCrosse. Partículas virales irregulares; la envoltura lipídica y las proyecciones superficiales son evidentes. 117 000x.

Familia: *Coronaviridae*
Género *Coronavirus*
Especie *Coronavirus humano 229E*
Especie *Coronavirus humano OC43*
Especie *Virus del SARS humano* (tentativa)

Tamaño 80-130 nm
Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple
Simetría: helicoidal
Envoltura lipídica: presente
Hábitat natural: seres humanos o animales (*Coronavirus*)

Distribución: mundial
Transmisión: persona a persona, presumiblemente por aerosoles
Vía de infección: respiratoria
Enfermedades: Resfriado común; en raras ocasiones enfermedades de las vías respiratorias bajas; síndrome respiratorio agudo grave



Coronavirus humano OC43. Las proyecciones en forma de maza son la característica más distintiva de estas partículas pleomorfas. 180 000x.

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)
Familia: Picornaviridae

Género *Enterovirus*

Especie *Poliovirus* (3 serotipos)

Especie *Coxsackievirus* (23 serotipos)

Especie *Echovirus* (28 serotipos)

Especie *Enterovirus* (4 serotipos)

Género *Hepatovirus*

Especie *Virus de la hepatitis A humana*

Género *Parechovirus*

Especie *Parechovirus humano* (2 serotipos, antes incluidos en el género *Echovirus* como serotipos 22 y 23)

Género *Rhinovirus*

Especie *Rinovirus humanos* (103 serotipos)

Tamaño: 22-30 nm

Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple

Simetría: icosaédrica

Envoltura lipídica: ausente

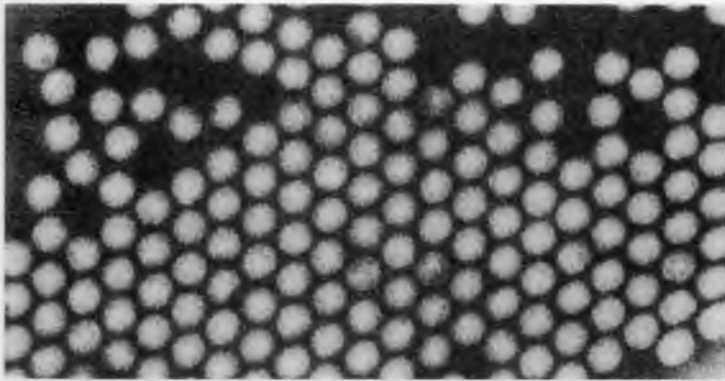
Hábitat natural: aparato gastrointestinal humano; sobrevive en el medioambiente (*Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*); vías respiratorias altas del hombre (*Rhinovirus*)

Distribución: mundial

Forma de transmisión: fecal-oral interhumana o por agua contaminada (*Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*); por aerosoles del aparato respiratorio humano o por las manos (*Rhinovirus*)

Vía de infección: gastrointestinal (*Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*); respiratoria (*Rhinovirus*)

Enfermedades: enfermedad febril, meningitis, encefalitis, miocarditis (*Enterovirus*, *Parechovirus*); hepatitis (*Hepatovirus*), resfriado común (*Rhinovirus*)



Poliovirus 1. Las partículas son pequeñas, regulares y sin envoltura. 180 000x.

Familia: Caliciviridae

Género *Virus tipo Norwalk* (tentativo)

Género *Virus tipo Sapporo* (tentativo)

Tamaño: 35-39 nm

Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple

Simetría: icosaédrica

Envoltura lipídica: ausente

Hábitat natural: aparato gastrointestinal humano

Distribución: mundial

Forma de transmisión: fecal-oral; agua contaminada

Vía de entrada: gastrointestinal

Enfermedades: gastroenteritis



Virus del exantema porcino. Partículas muy pequeñas, regulares, con notables depresiones en forma de taza. Las depresiones superficiales de los virus humanos similares al agente Norwalk no son tan pronunciadas.

(Continúa)

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: Reoviridae

Género *Orthoreovirus* Serotipos 1-3

Género *Rotavirus* Serotipos A-G (D-G sólo en animales)

Género *Coltivirus*

Especie tipo *Virus de la fiebre por garrapatas de Colorado*

Tamaño: 60-80 nm, morfología variable

Ácido nucleico: RNA segmentado, de cadena doble

Simetría: icosaédrica

Envoltura lipídica: ausente

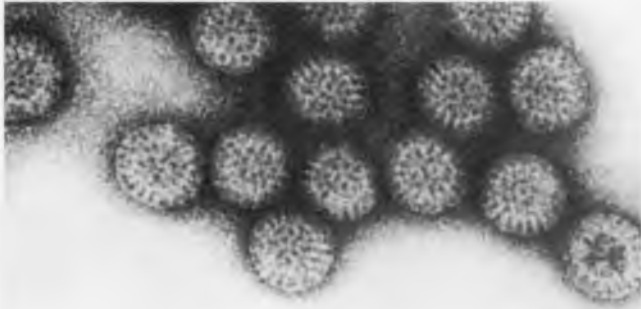
Hábitat natural: aparato gastrointestinal del hombre (*Reovirus* y *Rotavirus*) y de los animales (*Rotavirus*)

Distribución: mundial

Forma de transmisión: fecal-oral por contacto directo; animales al hombre

Vía de entrada: aparato gastrointestinal

Enfermedades: gastroenteritis (*Rotavirus*); ninguna (*Reovirus*)



Rotavirus humano. La característica distintiva de los *Reoviridae* es la presencia de una doble envoltura, cada una de las cuales tiene simetría icosaédrica. 135 000x.

Familia: Astroviridae

Género *Astrovirus*

Especie *Astrovirus humano*

Tamaño: 28-30 nm

Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple

Simetría: icosaédrica

Envoltura lipídica: ausente

Hábitat natural: aparato gastrointestinal del hombre

Distribución: mundial

Forma de transmisión: fecal-oral; agua contaminada

Vía de entrada: aparato gastrointestinal

Enfermedades: gastroenteritis

Familia: Togaviridae

Género *Alphavirus*

Especie *Virus de la encefalitis equina del Este*

Especie *Virus de la encefalitis equina venezolana* (otras especies de arbovirus)

Género *Rubivirus*

Especie *Virus de la rubéola*

Tamaño: 70 nm

Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple

Simetría: icosaédrica

Envoltura lipídica: presente

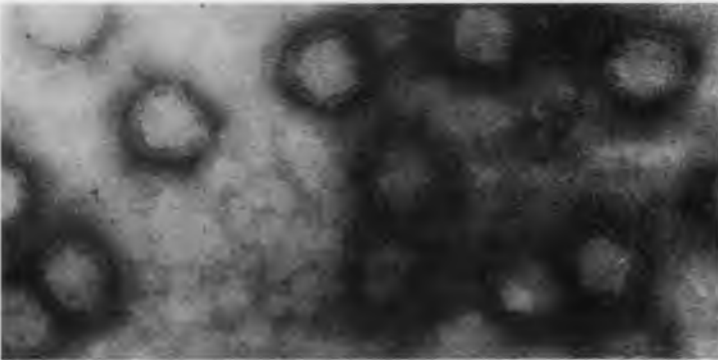
Hábitat natural: pequeños mamíferos e insectos (*Alphavirus*); hombre (*Rubivirus*)

Distribución: mundial

Forma de transmisión: por picadura de mosquitos (*Alphavirus*); aerosoles o transplacentaria (*Rubivirus*)

Vía de entrada: cutánea (*Alphavirus*); respiratoria o vascular (*Rubivirus*)

Enfermedades: hepatitis, meningitis, encefalitis, artritis, enfermedades febriles (*Alphavirus*); enfermedad eruptiva, infección congénita (rubéola)

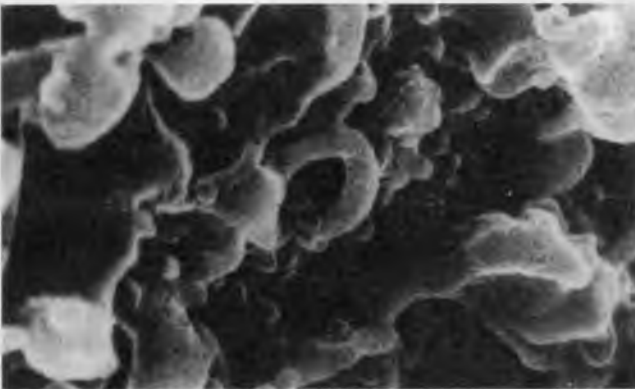


Virus de la rubéola. Los viriones esféricos tienen una membrana lipídica y proyecciones de una hemaglutinina de superficie. 135 000x.

(Continúa)

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: <i>Flaviviridae</i> Género <i>Flavivirus</i> Especie <i>Virus de la fiebre amarilla</i> Especie <i>Virus de la encefalitis de San Luis</i> Especie <i>Virus de la encefalitis japonesa</i> Especie <i>Virus del Nilo Occidental</i> Especie <i>Virus del dengue</i> (Numerosas especies más, muchas transmitidas por artrópodos) Género <i>Hepacivirus</i> Especie <i>Virus de la hepatitis C</i> Virus no asignados (agentes GB)	Tamaño: 40-60 nm Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad positiva, cadena simple Simetría: icosaédrica Envoltura lipídica: presente Hábitat natural: pequeños mamíferos e insectos (<i>Flavivirus</i>); seres humanos (<i>Hepacivirus</i>)	Distribución: mundial Forma de transmisión: picadura de mosquitos o garrapatas (<i>Flavivirus</i>); por sangre (<i>Hepacivirus</i>) Vía de entrada: cutánea (<i>Flavivirus</i>) vascular, sexual (<i>Hepacivirus</i>) Enfermedades: hepatitis, meningitis, encefalitis, enfermedades febriles, fiebre hemorrágica (<i>Flavivirus</i>); hepatitis, cirrosis, carcinoma hepatocelular (<i>Hepacivirus</i>)
Familia: <i>Retroviridae</i> Género <i>Deltaretrovirus</i> Especie <i>Virus linfotrópicos T humanos</i>, tipos 1 y 2 (HTLV) Género <i>Lentivirus</i> Especie <i>Virus de la inmunodeficiencia humana</i>, tipos 1 y 2 (HIV)	Tamaño: 100 nm Ácido nucleico: RNA no segmentado, de polaridad negativa, dímero de cadena simple (envuelto por DNA polimerasa RNA dependiente) Simetría: variable Envoltura lipídica: presente Hábitat natural: hombre	Distribución: mundial Forma de transmisión: sexual, agujas contaminadas, transfusiones, materno-fetal/recién nacido. Vía de entrada: mucosas, vascular Enfermedades: leucemia y linfoma de células T (HTLV); síndrome de inmunodeficiencia adquirida (HIV)



Virus de la inmunodeficiencia humana. Microfotografía electrónica por barrido de un linfocito T humano con partículas virales que brotan de su superficie.

(Continúa)

ratorio.²⁹⁴ El antígeno de la nucleoproteína presente en el core viral define el tipo de virus; por ejemplo, influenza A o B. Este antígeno es estable y es reconocido por muchos de los antisueños diagnósticos, que son capaces de detectar todas las cepas circulantes de un tipo determinado. Existen dos antígenos glucoproteicos en la superficie del virión de influenza que son importantes para la patogenia, la epidemiología y la inmunoterapia. El antígeno dominante es la hemaglutinina, que es responsable de la adsorción del virus a las células epiteliales respiratorias y, por lo tanto, una diana importante de las vacunas antivirales. La enzima de superficie neuraminidasa participa en la penetración del virus en la célula. Estos antígenos de superficie están en constante cambio, de modo que constituyen un blanco móvil para los anticuerpos que se utilizan con fines terapéuticos y diagnósticos. Las epidemias recurrentes de gripe son provocadas por los cambios constantes y acumulados (desplazamiento antigénico) y por los cambios periódicos y cuantitativos (variación antigénica).

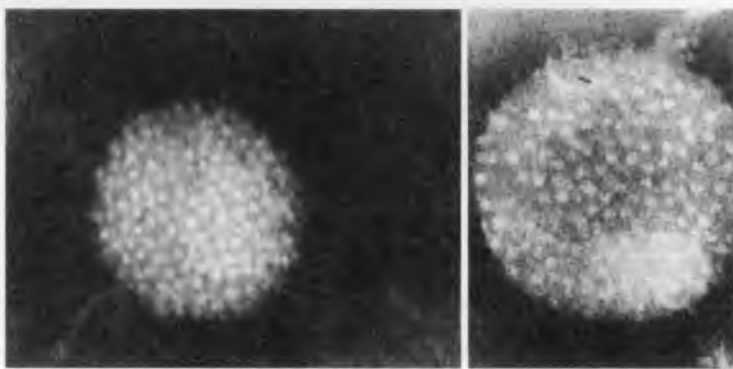
Los virus se denominan según su estructura y consideraciones geográficas. Por ejemplo, un aislamiento puede denomi-

narse influenza A/Leningrado/360/86 (H3N2), lo cual significa que esta cepa es el aislamiento número 360 de influenza A en Leningrado, realizado en 1986 y que contiene el tercer tipo de hemaglutinina y el segundo tipo de neuraminidasa. La hemaglutinina y la neuraminidasa no son antígenos útiles desde el punto de vista diagnóstico, pero su estudio es esencial para el epidemiólogo, de manera que la vacuna del año próximo pueda inducir la formación de anticuerpos contra los antígenos actuales en circulación. Aunque todavía no se ha logrado, se continúa tratando de predecir el desplazamiento futuro de las cepas de virus influenza A, para que la vacuna para la próxima temporada de gripe pueda formularse en forma más racional.⁵⁰

Hasta la fecha se han encontrado nueve hemaglutininas diferentes. Se supuso que el antígeno inicial (H1) era un constituyente de la cepa que causó la pandemia de gripe en 1918, sobre la base de análisis serológicos. Hace muy poco, se obtuvo evidencia de otro tipo usando las técnicas moleculares modernas en tejidos de víctimas de la gripe.⁴¹³ Dos muestras provenían de tejido pulmonar fijado con formalina en Inglaterra, pero la muestra que proporcionó la secuencia más completa se tomó

Cuadro 23-1 Clasificación de los virus de RNA (géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: <i>Arenaviridae</i>	Tamaño: $62 \geq 200$ nm	Distribución: mundial (LCM); Sudamérica (Junín, Machupo, Sabiá, Guanarito); África (Lassa)
Género <i>Arenavirus</i>	Ácido nucleico: RNA bisegmentado, bipolar, de cadena simple	Forma de transmisión: contacto con secreciones provenientes de roedores o seres humanos
Grupo del Viejo Mundo	Simetría: pleomorfa	Vía de entrada: respiratoria, cutánea (laceraciones)
Especie <i>Virus de la coriomeningitis linfocítica</i> (LCM)	Envoltura lipídica: presente	Enfermedades: enfermedad febril, meningitis (LCM); fiebre hemorrágica (virus <i>Junín</i> , <i>Machupo</i> , <i>Sabiá</i> , <i>Guanarito</i>)
Especie <i>Virus Lassa</i>	Hábitat natural: roedores	
Grupo del Nuevo Mundo		
Especie <i>Virus Junín</i>		
Especie <i>Virus Machupo</i>		
Especie <i>Virus Sabiá</i>		
Especie <i>Virus Guanarito</i>		



Virus de la coriomeningitis linfocítica. El virus esférico tiene grandes proyecciones en su superficie. El nombre deriva de la palabra latina *arenosus* (arenoso) y fue sugerido por las partículas internas similares a ribosomas que se ven con el microscopio electrónico de transmisión. 225 000x.

del cuerpo de una mujer inuit sepultada en las nieves eternas de Alaska. Se encontró una homogeneidad notable entre las tres muestras provenientes de distintas localidades geográficas.

Las epidemias mayores siguientes se han asociado con variaciones importantes en la hemaglutinina: H2 durante la epidemia de gripe asiática en 1957 y H3 durante la epidemia de gripe de Hong Kong de 1968. Más tarde, circularon cepas con las hemaglutininas H1 o H3 hasta que una nueva cepa de gripe aviar (hemaglutinina H5) mató a 6 de 18 personas infectadas en Hong Kong. Este virus, que se diseminó en forma directa de los pollos a los seres humanos sin otro intermediario, parece tener características particularmente virulentas.²¹⁶ Por fortuna, la diseminación interhumana parece ser limitada. Luego apareció en Hong Kong otra cepa (hemaglutinina H9) con características epidemiológicas similares, pero con menos mortalidad. Hace poco, el virus H5 ha reaparecido en el Sudeste asiático, una vez más con tasas de mortalidad altas, en pacientes expuestos a aves de corral, pero sin transmisión interhumana importante.^{224,282}

La frecuencia con la que los virus de la gripe aviar han cruzado la barrera de las especies para infectar a los seres humanos es desconcertante. Está claro que la enfermedad pandémica devastadora espera sólo la combinación de virulencia alta y la transmisión interhumana eficaz. Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) han formulado recomendaciones provisionales para procesar muestras provenientes de pacientes con posible gripe aviar. Se recomienda el uso de instalaciones con nivel de bioseguridad 3 para algunas manipulaciones; se aconseja el envío de las muestras a una institución, como los CDC, que tengan las instalaciones adecuadas.⁸²

Paramixovirus VIRUS PARAINFLUENZA

Los paramixovirus constituyen un grupo variado. Los cuatro serotipos de virus parainfluenza son causas importantes de enfermedad respiratoria, que suele ser leve en los adultos, pero que puede ser grave en los niños pequeños.²⁰⁷ Los virus parainfluenza 1 y 2 causan crup (laringotraqueobronquitis) en los niños entre los 2 y 6 años de edad durante la temporada de invierno de virosis respiratorias. El virus parainfluenza 3 es una causa importante de bronquiolitis en los niños menores de 2 años; las infecciones se presentan durante todo el año, con picos en el otoño y la primavera.

VIRUS DE LA PAROTIDITIS

El virus de la parotiditis causa parotiditis epidémica ("pape-ras"). Con frecuencia produce meningitis aséptica, que suele ser leve, y puede afectar también el páncreas, las gónadas y, en raras ocasiones, las articulaciones. La introducción de vacunas eficaces ha reducido en gran medida la incidencia de esta infección. En la Mayo Clinic, se aisló virus de la parotiditis en 185 ocasiones en la década de 1960, pero sólo 3 veces en la década de 1970.⁴⁵³ Cabe destacar que desde la introducción de la vacuna contra la parotiditis, las cepas circulantes, que habían sido homogéneas, se hicieron más divergentes.²⁵⁹

VIRUS DEL SARAMPIÓN

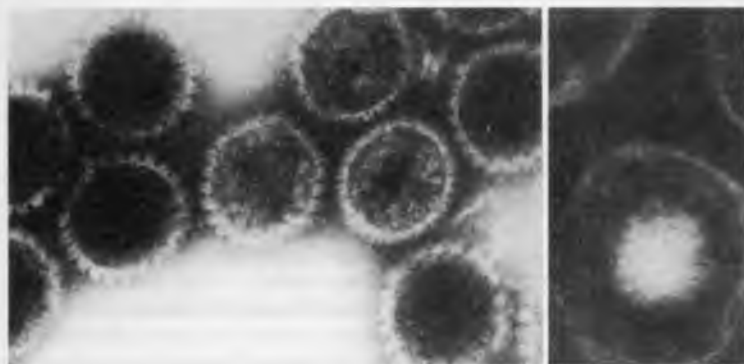
Es poco probable encontrar virus del sarampión en el laboratorio,⁴⁵³ pero lamentablemente el virus está reapareciendo clí-

Cuadro 23-2 Clasificación de los virus de DNA (Géneros y especies seleccionados que infectan al hombre)

Familia: *Herpesviridae*
Subfamilia *Alphaherpesvirinae*
Género *Simplexvirus*
 Especie *Virus del herpes simple 1* (HHV1)
 Especie *Virus del herpes simple 2* (HHV2)
Género *Varicellovirus*
 Especie *Virus varicela-zóster* (VZV)
Subfamilia *Betaherpesvirinae*
Género *Citomegalovirus*
 Especie *Citomegalovirus humano* (CMV)
Género *Roseolovirus*
 Especie *Herpesvirus humano 6A* (HHV6A)
 Especie *Herpesvirus humano 6B* (HHV6B)
 Especie *Herpesvirus humano 7* (HHV7)
Subfamilia *Gammaherpesvirinae*
Género *Lymphocryptovirus*
 Especie *Virus de Epstein-Barr* (EBV)
Género *Rhadinovirus*
 Especie *Herpesvirus humano 8* (*Herpesvirus con el sarcoma de Kaposi*) (HHV8)

Tamaño: 120-300 nm
 Simetría: icosaédrica
 Envoltura lipídica: presente
 Hábitat natural: hombre
 Distribución: mundial
 Forma de transmisión: por secreciones bucales o genitales infectadas, por sangre o a través de la placenta
 Vía de entrada: respiratoria, cutánea, intravascular, transplacentaria

Enfermedades: faringitis, cervicitis, lesiones localizadas de piel, neumonía, esofagitis, encefalitis, infecciones diseminadas (HSV1); lesiones cutáneas, meningitis, sepsis neonatal (HSV2); infección congénita, hepatitis, mononucleosis, neumonía (CMV); varicela, infecciones diseminadas, zóster/culebrilla (VZV); faringitis, mononucleosis, hepatitis (EBV); exantema súbito (HHV6, HHV7); sarcoma de Kaposi, linfoma (HHV8)

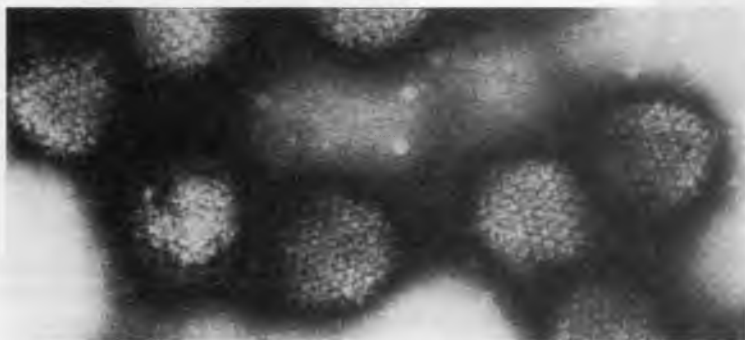


Virus del herpes simple (izquierda). Las nucleocápsides no envueltas muestran la estructura regular del virión. Las unidades estructurales claramente definidas parecen tener una depresión central (derecha). La partícula envuelta tiene, además, una membrana lipídica derivada de la célula infectada. 189 000x.

Familia: *Adenoviridae*
Género *Mastadenovirus*
 Especie *Adenovirus* (49 serotipos)

Tamaño: 70-90 nm
 Simetría: icosaédrica
 Envoltura lipídica: ausente
 Hábitat natural: hombre

Distribución: mundial
 Forma de transmisión: fecal-oral, gotitas en aerosol?
 Vía de entrada: respiratoria, gastrointestinal
 Enfermedades: conjuntivitis, queratitis, faringitis, traqueobronquitis, neumonía, cistitis; gastroenteritis (tipos 40 y 41)



Adenovirus tipo 5. La disposición regular de las unidades estructurales del virión es claramente evidente. 234 000x.

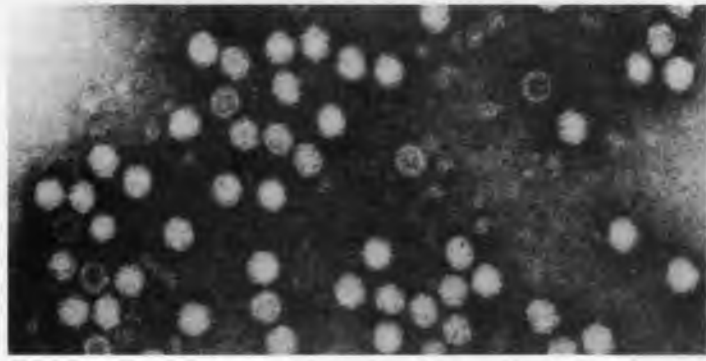
Cuadro 23-2 Clasificación de los virus de DNA (Géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: <i>Papovaviridae</i> Género <i>Papillomavirus</i> Especie <i>Virus de las verrugas humanas</i> (>100 genotipos) Género <i>Polyomavirus</i> Especie <i>Virus simiano 40</i> (SV40) Especie <i>Virus JC</i> (JCV) Especie <i>Virus BK</i> (BKV)	Tamaño: 45-55 nm Simetría: icosaédrica Envoltura lipídica: ausente Hábitat natural: hombre (virus de las verrugas, JCV y BKV); monos (SV40)	Distribución: mundial Forma de transmisión: por contacto con secreciones infectadas, contacto sexual; los virus permanecen latentes en los tejidos o se integran al genoma (virus de las verrugas) Vía de entrada: cutánea, genital, respiratoria (papi-loma); ¿respiratoria? (polioma) Enfermedades: papilomas cutáneos, genitales y del aparato respiratorio (verrugas); neoplasias epite-liales (virus del papiloma); leucoencefalopatía multifocal progresiva (virus polioma)
--	--	--



Virus de las verrugas humanas. Estos virus nunca han sido pro-pagados con éxito en cultivos celulares. Las enfermedades se han asociado por demostración de los viriones, de antígenos virales o del ácido nucleico en las lesiones. 135 000x.

Familia: <i>Parvoviridae</i> Subfamilia <i>Parvovirinae</i> Género <i>Erythrovirus</i> Especie <i>Virus B19</i>	Tamaño: 18-26 nm Ácido nucleico: DNA no segmentado de cade-na simple Simetría: icosaédrica Envoltura lipídica: ausente Hábitat natural: hombre	Distribución: mundial Forma de transmisión: interhumana (vía descono-cida); transfusiones Vía de entrada: desconocida; vascular Enfermedades: eritema infeccioso (quinta enfer-medad); enfermedad hemolítica del recién naci-do, anemia
--	---	--



Virus H-1. Los viriones son muy pequeños y regulares en forma y tamaño. Los parvovirus tienen la particularidad de contener DNA de cadena simple.

(Continúa)

nicamente. La relajación de los controles y de las prácticas de refuerzo de la vacunación ha dado origen a brotes explosivos tanto en los adultos jóvenes, que pueden tener inmunidad en desaparición, como en los niños, sobre todo en zonas urbanas en las que los niveles de vacunación son bajos.⁶⁴ La afección de equipos deportivos universitarios y la cancelación de contien-das deportivas de afluencia masiva atraerán sin duda la aten-

ción de los medios de comunicación y del gran público. El aná-lisis molecular sugiere la presencia de múltiples casos impor-tados, más que la existencia de una sola cepa endémica.⁴²³

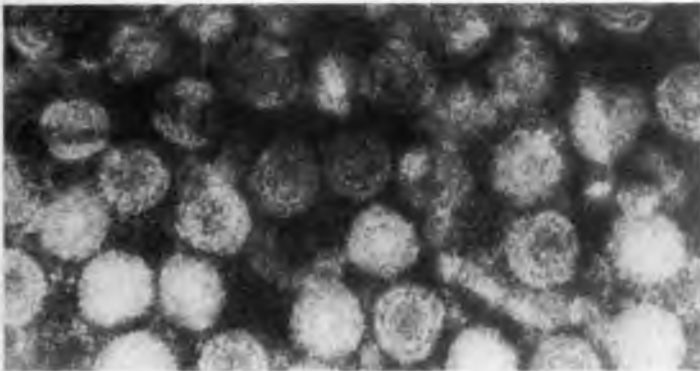
Las implicaciones que los frecuentes desplazamientos actua-les de personas tienen en la salud pública por exposición a enfermedades quedó ilustrada por una epidemia de 247 casos que comenzó en una zona de práctica del esquí en Brecken-

Cuadro 23-2 Clasificación de los virus de DNA (Géneros y especies seleccionados que infectan al hombre) (cont.)

Familia: *Hepadnaviridae*
 Género *Hepadnavirus*
 Especie *Virus de la hepatitis B*

Tamaño: 42-47 nm
 Ácido nucleico: DNA circular no segmentado
 Simetría: compleja
 Envoltura lipídica: presente
 Hábitat natural: hombre
 Antígenos:
 Antígeno de superficie (HBsAg)
 Antígeno del core (HBcAg)
 Antígeno temprano (HBeAg)

Distribución: mundial
 Forma de transmisión: secreciones y sangre infectadas, sexual, transfusiones
 Vía de entrada: cutánea, vascular, genital
 Enfermedades: hepatitis, cirrosis, carcinoma hepatocelular



Virus de la hepatitis B. Estas partículas de 42 nm, que son el agente infeccioso, se conocían antiguamente como partículas de Dane. 225 000x.

Familia: *Poxviridae*
 Subfamilia *Chordopoxvirinae*
 Género *Orthopoxvirus*
 Especie *Virus variola* (viruela)
 Especie *Virus vaccinia*
 Especie *Virus de la viruela vacuna* (Cowpox)
 Especie *Virus de la viruela simiana*
 Género *Parapoxvirus*
 Especie *Virus orf*
 Género *Molluscipoxvirus*
 Especie *Virus del molusco contagioso*
 Género *Yatapoxvirus*
 Especie *Tanapoxvirus*

Tamaño: 300-450 × 170-260 nm
 Ácido nucleico: DNA no segmentado de doble cadena
 Simetría: compleja
 Envoltura lipídica: ausente
 Hábitat natural: hombre y animales

Distribución: mundial; la viruela está "extinguida"
 Forma de transmisión: respiratoria, cutánea
 Vía de entrada: respiratoria, cutánea
 Enfermedades: lesiones cutáneas ulceradas, enfermedad diseminada (*Orthopoxvirus*); lesiones cutáneas ulceradas (*Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*); molusco contagioso (*Molluscipoxvirus*)



Virus vaccinia. La cubierta externa enrollada de esta gran partícula en forma de ladrillo es evidente. Cuando existía la viruela, la microscopia electrónica con tinción negativa era una herramienta útil para la diferenciación de las vesículas de la viruela de las producidas por la varicela. 49 500x.

ridge, Colorado.⁶⁹ Después de la dispersión de las personas infectadas, se detectaron casos de sarampión en 10 estados.

Dos factores disminuyen la probabilidad de aislar virus del sarampión: el diagnóstico suele ser clínico y casi nunca se envían muestras al laboratorio. Además, el virus se aísla en secreciones respiratorias y de orina sólo en las primeras etapas de la infección. El exantema diagnóstico es producido por complejos de antígeno viral y anticuerpos. Por lo tanto, en el momento en que se realiza el diagnóstico, el virus está siendo neutralizado y es probable que los cultivos sean negativos. En el pasado se veían síntomas clínicos atípicos en pacientes que habían recibido las primeras vacunas inactivadas,¹² pero este fenómeno ya no es habitual. La neumonía y la encefalitis son las complicaciones más graves del sarampión.^{142,265} Además, el virus del sarampión (o una de sus variantes) causa, en raras ocasiones, una encefalitis crónica conocida como panencefalitis esclerosante subaguda.³⁹⁰

VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

El virus sincital respiratorio (RSV) causa infecciones respiratorias recidivantes desde la infancia hasta la edad adulta. Las epidemias son frecuentes y pueden ser intrahospitalarias. Existen dos grupos serológicos bien definidos de virus sincital respiratorio (A y B). En la mayoría de las epidemias predomina un único grupo,³⁶⁴ pero el tipo viral no se relaciona con la gravedad de la infección.³³² Los casos de enfermedad se concentran en los meses invernales, aunque pueden ocurrir infecciones en verano en los climas calurosos.⁵⁰⁷

La infección se disemina por medio de grandes gotas con partículas y por fómites (partículas ambientales contaminadas, como el polvo doméstico), más que por aerosoles de partículas pequeñas. Esta infección viral es una causa importante de infecciones intrahospitalarias; la observación cuidadosa de los principios de control de infecciones es esencial.¹⁹² Se requiere un buen apoyo diagnóstico de laboratorio, no sólo para el manejo de cada paciente, sino también para limitar la diseminación hospitalaria de la infección.

El virus sincital respiratorio puede causar laringitis estridulosa, bronquitis, bronquiolitis o neumonía intersticial.²⁰⁷ Es la causa más frecuente de enfermedad respiratoria en los lactantes hospitalizados menores de 1 año. Las infecciones causadas por este virus suelen ser graves en los niños pequeños. Si existen cardiopatías congénitas o inmunodeficiencias, la enfermedad puede ser mortal; en un estudio, murieron 8 (73%) de 11 lactantes con cardiopatías congénitas e hipertensión pulmonar.³²⁰ Muchos niños antes sanos, sobre todo lactantes, se enferman lo suficiente como para necesitar asistencia respiratoria. La apnea es un componente prominente del síndrome.

La inmunidad contra el virus sincital respiratorio es de corta duración e incompleta. Se pensó durante mucho tiempo que era una enfermedad de lactantes y niños pequeños, pero la infección de adultos, con producción de enfermedad grave, se considera un problema clínico actual importante.^{152,208} Se han informado epidemias en instituciones geriátricas.¹⁵³

Se ha demostrado la naturaleza grave de las infecciones causadas por el virus sincital respiratorio en adultos inmunodeprimidos.³³³ También se observan infecciones graves en ancianos y en adultos con enfermedades crónicas, como diabetes, cirrosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.²⁰⁵

OTROS PARAMIXOVIRUS

Varios paramixovirus nuevos han aparecido en la última década. El metaneumovirus humano fue reconocido inicial-

mente en Hong Kong, pero ya se ha encontrado en todo el mundo. Es un miembro de la subfamilia *Pneumovirinae*, que incluye el RSV;³⁴⁵ el virus humano está estrechamente relacionado con dos virus aviarios. Clínica y epidemiológicamente se parece al RSV.³⁴ Se han obtenido aislamientos en células LLC-MK2 (una línea celular continua de riñón de mono *Macaca mulatta* que no suele usarse en los laboratorios de diagnóstico). El virus se reconoció por su efecto citopático, pero la identificación se ha hecho por técnicas moleculares.

Otros dos paramixovirus encontrados hace poco se han asociado con enfermedades neurológicas graves, en lugar de con infecciones respiratorias. El virus Nipah ha causado encefalitis en criadores de cerdos en Malasia y Singapur.¹⁹¹ Está estrechamente relacionado con el virus Hendra, que produjo enfermedad en caballos y algunas infecciones humanas en Australia. Se han observado infecciones adquiridas en el laboratorio.

Picornavirus

Los picornavirus, que incluyen los rinovirus y los enterovirus, constituyen otro grupo importante y grande de virus del RNA. Los rinovirus son causas frecuentes de resfriado común. Son sensibles a los ácidos y no infectan el aparato gastrointestinal. Su transmisión probablemente tiene lugar por la generación de aerosoles respiratorios,¹¹⁰ como se ha sugerido para otros virus respiratorios. Estos resistentes virus también pueden transmitirse a través del contacto con superficies inanimadas contaminadas.

Existen tantos serotipos de rinovirus (hasta el momento 100), que el diagnóstico inmunológico es poco práctico. Los cultivos se solicitan con muy escasa frecuencia ya que las infecciones causadas por rinovirus son incómodas, pero casi nunca potencialmente mortales.

Los enterovirus clásicos son los virus de la poliomieltis 1 a 3, los virus Cocksackie A y B y los echovirus.³⁸² El grupo de virus Cocksackie recibió su nombre por una pequeña ciudad del estado de Nueva York, en la que se realizaron los primeros aislamientos. "Echo" significa enteric cytopathic human orphan, nombre que se utilizaba antes de reconocer el potencial patógeno de estos virus. Luego, se encontraron otros miembros del género, designados enterovirus 68 a 71. Pueden aislarse enterovirus en el 40% al 80% de los pacientes con meningitis aséptica.⁹⁶ Es probable que existan muchos casos más de meningitis aséptica esporádica y epidémica causados por enterovirus, según se desprende del hallazgo de que la curva epidémica de todos los casos de meningitis aséptica sigue un curso exactamente paralelo a la curva de los casos en los que se aíslan enterovirus. El pico de incidencia es en el verano y comienzos del otoño.

Los enterovirus, sobre todo el virus Cocksackie B, también causan miocarditis, pericarditis y pleurodinia epidémica. Se ha sugerido una asociación entre estos virus y la miocardiopatía, trastorno no inflamatorio del músculo cardíaco, pero el tema es controvertido.⁴⁸² El virus Cocksackie A causa herpangina y enfermedad de mano, pie y boca. Los enterovirus también producen enfermedad febril con exantema, que suele ser maculopapular, pero en raras ocasiones vesicular. Dos enterovirus patógenos recién encontrados son el enterovirus 70, que causa conjuntivitis hemorrágica epidémica, y el enterovirus 71, que provoca infecciones del sistema nervioso central (SNC), entre ellas una parálisis similar a la poliomieltis.

La infección por enterovirus es mucho más frecuente en los lactantes y los niños pequeños. Paradójicamente, la enfermedad parálisis producida por poliovirus es más frecuente en los adultos jóvenes. La diseminación de los enterovirus se facilita

por la mala higiene, los servicios sanitarios deficientes y el hacinamiento. En las poblaciones en las que el virus se disemina activamente (de nivel socioeconómico bajo), la infección tiene lugar en edades tempranas y la enfermedad paralítica es infrecuente. Las personas pertenecientes a grupos socioeconómicos más altos escapan a la infección cuando niños y tienen mayores probabilidades de sufrir una parálisis cuando la contraen en la adolescencia. Se ha demostrado un fenómeno similar con los virus de la varicela-zóster, de Epstein-Barr y de la rubéola. Por fortuna, la enfermedad paralítica era causada casi en forma exclusiva por serotipos virulentos de poliovirus que han sido virtualmente erradicados por la vacunación en la mayoría de los países. En la actualidad el tipo silvestre de poliovirus ha sido erradicado en tres de las seis regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), con casos recalcitrantes en África, el Mediterráneo oriental y el sudeste asiático.⁷⁹ La enfermedad paralítica puede ser causada por los virus Coxsackie y los enterovirus tradicionales, pero sólo en muy raras ocasiones. Se ha registrado la producción de enfermedad paralítica por enterovirus 71.

La patogenia de la mayoría de las infecciones causadas por enterovirus consiste en la infección primaria del aparato respiratorio o gastrointestinal, seguida de viremia e infección de un órgano diana distante, como la piel, el corazón o las meninges. La vacuna inactivada (Salk) contra la poliomiелitis estimula la formación de anticuerpos séricos neutralizantes, pero no de anticuerpos en las mucosas. La vacuna funciona porque los anticuerpos séricos bloquean la diseminación del virus a las meninges durante la viremia. La incapacidad de la vacuna Salk para prevenir la infección gastrointestinal leve no es un problema grave para el individuo, pero permite la circulación continua de la cepa virulenta.

En los últimos años la mayoría de los casos de poliomiелitis paralítica en los países desarrollados han sido causados por cepas atenuadas de vacunas (Sabin). Por consiguiente, la vacuna inactivada (Salk) se recomienda una vez más para el uso en los Estados Unidos.

Los síntomas de la mayoría de las infecciones causadas por enterovirus son ocasionados por el efecto citopático directo sobre el órgano diana. La meningoencefalitis se acompaña por una infección productiva del SNC por parte del virus que se replica activamente. Sin embargo, el síndrome clínico de miocarditis se produce por una reacción inmunitaria contra el tejido cardíaco infectado por el enterovirus. En el momento en que el paciente se torna sintomático, el virus casi siempre ya ha sido eliminado del corazón.

Del conocimiento de la patogenia de la infección por enterovirus surge con claridad que el cultivo tiene sentido en los pacientes con meningitis aséptica (infección productiva), pero que en los pacientes con miocarditis (enfermedad inmunopatológica) es improbable que dé como resultado el aislamiento del virus.

Rhabdovirus

Se describieron otros virus importantes de RNA, algunos de los cuales causan infecciones con alta mortalidad. Estos virus son fundamentalmente tropicales y, por lo tanto, es menos probable hallarlos en los laboratorios clínicos, en comparación con los picornavirus y los mixovirus. Entre estos virus se encuentran los rhabdovirus, que incluyen el agente productor de la rabia, de importancia mundial.

El diagnóstico de rabia se realiza por detección de antígeno viral en muestras clínicas provenientes de animales o seres

humanos. El cultivo del virus de la rabia se hace con poca frecuencia, debido a la simplicidad, precisión y rapidez de la inmunofluorescencia directa. Este flagelo histórico es endémico en los animales salvajes en los Estados Unidos, pero es excepcional en el hombre. Sin embargo, la exposición humana sigue existiendo, por contacto con perros de caza expuestos a animales salvajes infectados, murciélagos infectados y animales domésticos.³⁷⁵ Los murciélagos pueden ser insectívoros y el contacto puede ser sólo casual. En algunos casos el único contacto reconocido fue encontrar un murciélago en una alcoba, en ausencia de una mordedura evidente. Puede ser imposible identificar una fuente para la rabia humana. No es raro que el diagnóstico no se sospeche hasta la autopsia.

Las posibles exposiciones causan gran ansiedad debido a la letalidad de la infección. El costo de la prevención de la enfermedad humana puede ser enorme, como quedó demostrado en New Hampshire cuando numerosas personas estuvieron potencialmente expuestas a un gato rabioso en una tienda de mascotas.⁷⁰ Los costos calculados de la investigación epidemiológica y de la profilaxis fueron de 1,5 millones de dólares. La enfermedad epizootica actual de los mapaches del este de los Estados Unidos causa particular preocupación, debido a la frecuencia con la que estos agresivos animales invaden las viviendas humanas. La estructura molecular de las cepas del virus de la rabia refleja su huésped animal. En la actualidad, es posible identificar el origen probable de un aislamiento viral de la composición de su ácido nucleico. Se ha publicado un caso de transmisión quirúrgica inadvertida de rabia en ocasión de un trasplante de córnea.²⁴⁵

Arenavirus

Los arenavirus son una familia de virus de RNA que comparten características biológicas fascinantes.⁴⁸ Sus huéspedes naturales son una variedad de roedores, que persisten infectados sin que haya una respuesta inmunitaria eficaz por parte del huésped ni enfermedad sintomática. El virus infeccioso se excreta por orina, que es la fuente de infección humana. Por lo tanto, las personas que tienen riesgo de infección son las que entran en contacto con excretas de roedores infectados, ya sea en sus casas o durante el trabajo en el campo. La transmisión interhumana se observa con regularidad sólo en el caso del virus Lassa, por lo general entre miembros del personal sanitario que han estado expuestos a líquidos corporales infectados, sobre todo durante autopsias. Aparentemente, varias de las fiebres hemorrágicas han sido transmitidas por varones convalecientes a sus parejas sexuales. El paciente infectado no representa un riesgo particular para los individuos que entran en contacto ocasional con él. Las infecciones de laboratorio por estos agentes han sido un riesgo infrecuente pero constante. Hace muy poco, un investigador se infectó con el virus Sabia.⁶⁷ El origen de la infección fue la formación de aerosoles de medios de cultivo infectados y probablemente de orina de roedores. Se han registrado epidemias de coriomeningitis linfocítica entre investigadores que trabajaban con hámsters o en personas que poseían esos animales como mascotas.²⁰¹

Los principales patógenos humanos, su distribución geográfica, el roedor reservorio, la enfermedad clínica y la fecha de descubrimiento se resumen en el cuadro 23-3. El virus de la coriomeningitis linfocítica (CML) fue descubierto en el curso de las investigaciones de la epidemia de encefalitis de St. Louis en 1933. Pronto se reconoció que este virus producía meningitis aséptica en el hombre. Es probable que la frecuencia de la infección esté subestimada ya que los médicos no la sospechan

Cuadro 23-3 Características de los arenavirus patógenos para el hombre

VIRUS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	HUÉSPED ROEDOR	ENFERMEDAD HUMANA	TASA DE MORTALIDAD	AÑO DE DESCUBRIMIENTO
Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM)	Europa, América del Norte y del Sur	<i>Mus domesticus</i> ; <i>Mus musculus</i>	Meningitis aséptica	< 1%	1939
Virus Junín	Argentina	<i>Calomys musculus</i>	Fiebre hemorrágica	15-30%	1958
Virus Machupo	Bolivia	<i>Calomys callosus</i>	Fiebre hemorrágica	25%	1963
Virus Lassa	África Occidental	Especies de <i>Mastomys</i>	Fiebre hemorrágica	15%	1969
Virus Guanarito	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i> ; <i>Sigmodon alsoni</i>	Fiebre hemorrágica	25%	1990
Virus Sabiá	Brasil	Desconocido	Fiebre hemorrágica	Demasiado pocos casos para determinarla	1990
Virus Arroyo White Water	Sudoeste de los Estados Unidos	<i>Neotoma albigula</i>	Fiebre hemorrágica	Varios casos identificados presuntamente	1999

y no se dispone fácilmente de medios diagnósticos. Los investigadores han encontrado anticuerpos contra el virus de la CML en el 5,1% de las mujeres sanas de Birmingham, Alabama.⁴⁶⁹ El virus Junín fue el primer arenavirus conocido como productor de fiebre hemorrágica, la fiebre hemorrágica argentina de la región pampeana. Los misterios de su epidemiología fueron revelados algunos años después por Karl Johnson y cols. durante la investigación de un brote de fiebre hemorrágica boliviana en la provincia del Beni, causado por el virus Machupo.²⁶¹ Estos virus ganaron más notoriedad por la aparición de casos de enfermedad hemorrágica grave en varios países de África Occidental, causados por el virus Lassa. Los agregados más recientes provienen de Sudamérica: el virus Guanarito de Venezuela y el virus Sabiá de Brasil. Los antiguos virus todavía conviven con nosotros: ha ocurrido un brote de fiebre hemorrágica boliviana en 1994 en las provincias de El Beni y Santa Cruz.⁶⁸

Los arenavirus tienen una morfología distintiva (véase cuadro 23-1), que ha conducido al reconocimiento del grupo.³⁶⁷ Son partículas aproximadamente esféricas, envueltas, con prominentes estructuras similares a ribosomas en su interior. El nombre del grupo deriva del latín *arenosus* (arenoso), que fue sugerido por estas partículas internas. La propuesta original, arenavirus, fue luego modificada para evitar la confusión con los adenovirus.

Filovirus

Durante muchos años, el único miembro conocido de este grupo fue el virus Marburg, que produjo una misteriosa y mortal enfermedad entre cuidadores de monos en Marburg, Alemania, en 1967.⁴²⁹ El origen del virus fueron monos verdes africanos, pero los intentos de aislarlo en monos recién capturados en África no tuvieron éxito. En el curso de la siguiente década, hubo pocos aislamientos del virus, que quedó como curiosidad, aunque una curiosidad mortal. En 1977, un nuevo virus, denominado virus Ébola, se aisló en brotes simultáneos de enfermedad en Zaire y Sudán. Los brotes compartían características clínicas y epidemiológicas y los virus estaban estrechamente relacionados, aunque eran antigénicamente diferentes. La enfermedad se caracterizaba por fiebre alta, shock, compromi-

so de varios sistemas orgánicos y hemorragias difusas. La tasa de mortalidad del virus Marburg era del 25%; la del Ébola-Sudán, 50% y la del Ébola-Zaire, 90%. Como sucedió con el virus Marburg, el origen de la infección no se conoció, pero la transmisión estaba claramente asociada con la exposición a líquidos corporales de pacientes infectados. El personal médico de algunos de los pequeños hospitales misioneros fue diezmado por la misteriosa enfermedad.

Las dos epidemias en zonas remotas del Sudán y del Zaire produjeron alarma en los círculos dedicados a la salud pública y a las enfermedades infecciosas, pero no alcanzaron al público general. Esta situación cambió radicalmente cuando sucedió un gran brote en 1995 en Kikwit, Nigeria. Se registraron más de 300 casos en un corto período; más de un tercio de los casos tuvieron lugar en personal sanitario y la mortalidad fue de aproximadamente el 80%. La epidemia pudo controlarse por la puesta en vigencia de estrictas precauciones de barrera para evitar que los miembros de la familia y el personal sanitario entraran en contacto con las secreciones de los pacientes infectados. El origen de esta extensa epidemia no se aclaró.

Una tercera cepa de virus Ébola se detectó en Costa de Marfil en 1994. Las conjeturas acerca del origen en la naturaleza de este virus se han concentrado en los monos debido al origen simiano del virus Marburg, pero no se han encontrado evidencias sólidas para apoyar esta hipótesis. Una cepa de virus Ébola muy estrechamente relacionada con el tipo Zaire se aisló en la sangre de un investigador que probablemente adquirió la infección mientras realizaba la autopsia de un chimpancé infectado. La epidemia, muy letal entre los chimpancés, fue la primera demostración de la infección natural en los animales salvajes. El acicalamiento y otros tipos de contacto íntimo no eran factores de riesgo para adquirir la infección para los chimpancés, pero el consumo de carne sí lo era.¹⁶³ Esta observación hace que la costumbre de comer carne de caza (de animales silvestres) sea una práctica de mal augurio. Debido a la alta mortalidad entre los chimpancés, es improbable que estos primates sean el reservorio natural de la infección.

Las pruebas adicionales del origen simiano del virus Ébola provienen de una epidemia de infecciones letales entre macacos de Java (*Macaca fascicularis*) en dos instalaciones de cría de animales: la primera en Reston, Virginia, y la segunda en

Texas. En ambos casos los animales habían sido importados de las Filipinas, y el virus era antigénicamente diferente de las cepas aisladas en Sudán, Zaire y Costa de Marfil. Se han demostrado sólo cinco casos de infección humana con la cepa Reston del virus Ébola, todos ellos asintomáticos. Existen evidencias de transmisión de la infección entre animales por aerosoles, característica epidemiológica terrorífica, que por fortuna no se ha encontrado en las epidemias humanas. También se han publicado datos que indican la existencia de enfermedad epidémica entre *Macaca fascicularis* en cautiverio en las Filipinas antes de su exportación. La mortalidad en los monos infectados fue del 82% y los monos mantenidos en grupo en una misma jaula tenían mayor probabilidad de contraer la infección que los alojados en jaulas individuales.

Los filovirus son virus de RNA con una ultraestructura (véase cuadro 23-1) y una morfología filamentosa características que dan su nombre a la familia. Los dos virus, Marburg y Ébola, pueden diferenciarse por su morfología ultraestructural, y los tipos de virus Ébola son antigénicamente diferentes.

Es improbable que estos agentes de nivel 4 de bioseguridad se encuentren en los laboratorios de diagnóstico clínico. Los lectores interesados pueden consultar varios análisis excelentes de la biología de estos virus fascinantes y de las enfermedades que provocan.^{394,429}

Togavirus

En la actualidad, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* incluyen la mayoría de los virus antes conocidos como arbovirus (virus transmitidos por artrópodos).⁵⁵ Ambos grupos comprenden virus de RNA de cadena simple, con una envoltura lipídica.^{437,439} Los togavirus reciben su nombre por la "toga" lipídica que rodea al virus. Estos agentes biológicamente diversos tienen una ecología compleja; suelen infectar pequeños mamíferos o aves (reservorios) y son transmitidos de un animal a otro por garrapatas o mosquitos (vectores). Muchos de ellos también se mantienen por pasaje transovárico desde el insecto adulto a las larvas. El hombre es un huésped accidental cuando es infectado inadvertidamente en lugar de los reservorios animales habituales.

Dos miembros de la familia *Togaviridae* no coinciden con el perfil y se tratarán en su contexto tradicional. Se trata del virus de la rubéola, un alfavirus, y del virus de la hepatitis C, un flavivirus.

Existen dos divisiones dentro de *Togaviridae*. Los alfavirus (antes arbovirus del grupo A) están constituidos por los agentes de la encefalitis equina del Este, la encefalitis equina del Oeste y la encefalitis venezolana. Los flavivirus (antes arbovirus del grupo B) incluyen los agentes de la encefalitis de San Luis, el dengue (fiebre quebrantahuesos), la fiebre amarilla y la fiebre del Nilo Occidental.

Todos los años se registran pequeñas cantidades de casos de encefalitis equina del Este y de encefalitis equina del Oeste. La enfermedad humana puede presagiarse por un aumento de la incidencia de la enfermedad en los caballos. Las epidemias de encefalitis de San Luis ocurren aproximadamente cada 10 años en la zona sur de los Estados Unidos, sobre todo en Texas, los estados de la Costa del Golfo y en Florida. El reservorio de la encefalitis de San Luis son las aves y los mosquitos vectores varían de acuerdo con la localidad geográfica. La enfermedad es más grave en el anciano y los casos se encuentran concentrados en zonas densamente arboladas con casas mal protegidas de los insectos.

El dengue es prevalente en el Caribe y en el sudeste asiático. En los Estados Unidos se ven casos importados cada vez más a

menudo y se describió la transmisión doméstica ocasional del virus dentro del país, en especial en Texas. Una vía de entrada en los Estados Unidos muy poco habitual se descubrió cuando se encontraron mosquitos infectados en el agua estancada que se había acumulado en neumáticos de automóvil importados del sudeste asiático. La infección por dengue no complicada es una enfermedad febril indiferenciada, a veces acompañada por exantema y artralgias o artritis. El diagnóstico diferencial incluye otras infecciones virales, como la rubéola. Existen cuatro serotipos de virus del dengue. Halstead propuso la hipótesis de que la infección sucesiva con diferentes serotipos desencadena mecanismos inmunopatológicos que causan el síndrome de fiebre hemorrágica del dengue.^{210,327} Limitada años atrás al sudeste asiático, la forma hemorrágica letal de la enfermedad se ha observado en el Caribe con frecuencia creciente.

Entre estos virus, el que más recientemente ha concitado la atención es el virus del Nilo Occidental, que causa un espectro de enfermedades neurológicas como encefalitis, meningitis y un síndrome similar a la poliomiелitis.⁴⁴³ Hasta 1999 había producido infecciones localizadas en África, Medio Oriente y Europa Oriental. En ese año hizo su aparición sorpresiva en la ciudad de Nueva York y desde entonces se ha expandido a todos los Estados Unidos.

Se creyó que los primeros casos de encefalitis estaban causados por el virus de la encefalitis de San Luis, relacionado inmunológicamente con el virus del Nilo Occidental. Ambos virus comparten otras características, como tener las aves como huésped frecuente (una característica que puede estar vinculada a su rápida diseminación). Así, en unos pocos años, el virus del Nilo Occidental ha pasado de ser una trivialidad exótica a tener importancia cotidiana.³⁹⁶

Bunyavirus

La familia *Bunyaviridae* está constituida por un grupo grande y heterogéneo de virus transmitidos al hombre por artrópodos vectores, sobre todo garrapatas y mosquitos, y por las excretas de roedores. Existen cuatro géneros de importancia médica: 1) los bunyavirus, que incluyen el grupo de la encefalitis de California; 2) los nairovirus, que incluyen los virus de la fiebre hemorrágica del Congo-Crimea; 3) los flebovirus, que incluyen los virus de la fiebre del valle del Rift y el virus de la fiebre por flebotomos y 4) los hantavirus, que incluyen los agentes de la fiebre hemorrágica de Corea, la nefropatía epidémica y el síndrome pulmonar por hantavirus.^{55,374}

VIRUS DE LA ENCEFALITIS DE CALIFORNIA

Los bunyavirus más importantes en los Estados Unidos son los pertenecientes al grupo de virus de la encefalitis de California. A pesar del nombre "de California" estos virus causan enfermedad con mayor frecuencia en los estados centrooccidentales y del centro y norte. Los virus de la encefalitis de California suelen producir meningitis aséptica, enfermedad que aparece en verano y que es clínicamente indistinguible de la enfermedad causada por enterovirus.^{55,374} El virus de la encefalitis de California propiamente dicho es poco frecuente; el virus LaCrosse es el patógeno humano más frecuente del grupo. La mayoría de los pacientes se recuperan de la infección sin secuelas.

HANTAVIRUS

Los hantavirus son un grupo de virus en constante expansión que se han transformado de agentes infecciosos exóticos en

amenazas endémicas en los Estados Unidos.⁴³⁹ Las características uniformes del grupo son la infección persistente, asintomática de un huésped roedor, la probable transmisión al hombre a través de excretas de roedores infectados y la infección del endotelio vascular. El estado de conocimiento actual de estos virus, su huésped roedor y las enfermedades clínicas asociadas se resumen en el cuadro 23-4.

Durante la guerra de Corea, se detectó una grave fiebre hemorrágica entre los soldados norteamericanos. El shock y la insuficiencia renal, que eran los síntomas más destacados, proporcionaron el descriptivo nombre de fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR). El cuadro clínico clásico comprende fiebre, plaquetopenia e insuficiencia renal. La recuperación de las plaquetas presagia la recuperación de la función renal normal. El shock y el fallo multiorgánico, similares a los de una sepsis bacteriana, caracterizan a los casos más graves. Las manifestaciones menos frecuentes son hemorragias retroperitoneales y edema pulmonar. Algunos pacientes tienen una enfermedad febril indiferenciada con función renal normal. En Grecia, donde las cepas prevalentes recuerdan al virus asociado con las infecciones de Corea, se describió un síndrome clínico con enfermedad hepática grave.

Luego de la demostración de la enfermedad en Corea, se reconoció que este grave síndrome clínico ocurría en el este de la Unión Soviética y en Manchuria. El agente etiológico no fue aislado hasta 1982, cuando se aisló el virus Hantaan (cuyo nombre deriva del río de Corea donde se observó enfermedad epidémica). Este virus causa una infección asintomática persistente en su huésped roedor, *Apodemus agrarius*. Más tarde, se aisló un segundo agente relacionado, el virus Seúl, que causa una infección menos grave. Los huéspedes roedores del virus Seúl son las ratas urbanas, *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*. Este virus se ha encontrado en ratas de laboratorio y ha causado infección en personal de laboratorio. No existen casos documentados de infección por virus Hantaan en los Estados Unidos, pero se han demostrado serológicamente casos de FHSR causada por el virus Seúl en Baltimore. Los hantavirus asociados con ratas en los Estados Unidos se han relacionado con frecuencia con la enfermedad renal hipertensiva, pero no con otras enfermedades renales crónicas.¹⁸⁶ Aunque la enfermedad hipertensi-

va renal no suele asociarse con agentes infecciosos, la lección proporcionada por *Helicobacter pylori* y la gastritis debe alertarnos acerca de no despreciar esta asociación.

Una versión más leve de esta infección, conocida como nefropatía epidémica, es causada por el virus Puumala y se observa en Escandinavia (cuadro 23-4).⁴³⁹ El virus produce infecciones asintomáticas en ratones campestres; en el hombre es una enfermedad febril aguda con dolor lumbar y poliuria, pero con manifestaciones hemorrágicas leves o sin ellas, y sin shock. Los pacientes se recuperan sin secuelas. Los síntomas son casi siempre inespecíficos y el diagnóstico clínico fue correcto sólo en el 28% de los casos en un estudio finlandés.

La atención se centró en los hantavirus en 1993, cuando se observó un brote de enfermedad respiratoria grave en la zona de Four Corners, en el sudoeste de los Estados Unidos.^{395,439} Los pacientes tenían un síndrome prodrómico con fiebre, mialgias, tos o disnea, síntomas gastrointestinales y cefalea, que progresaba rápidamente al edema pulmonar irreversible. El agente causal fue reconocido con sorprendente rapidez como un nuevo miembro del género hantavirus, denominado virus Sin Nombre (inicialmente virus Four Corners). El huésped roedor del virus Sin Nombre es el ratón ciervo, *Peromyscus maniculatus*. Se ha adelantado la hipótesis de que las lluvias copiosas incrementan las fuentes de alimentación, lo que ocasiona un gran aumento del número de ratones y del contacto del hombre con éstos, alterando así la epidemiología, que pasa de ser una enfermedad esporádica, endémica, a una infección epidémica. No existen evidencias de transmisión interhumana del síndrome pulmonar por hantavirus. El diagnóstico retrospectivo de casos de infección por virus Sin Nombre o un virus relacionado, ocurridas hace tanto como en 1978, se ha hecho por tinción con inmunoperoxidasa de tejidos incluidos en parafina y conservados desde esa fecha.⁵³⁴ La totalidad de las 12 infecciones identificadas retrospectivamente habían ocurrido al oeste del río Misisipi, la mayoría en el Lejano Oeste.

Con posterioridad al descubrimiento del virus Sin Nombre se han identificado otros hantavirus relacionados en los Estados Unidos: en Louisiana, Florida y en el este (cuadro 23-4). Se desconoce la frecuencia de la infección por hantavirus fuera de las áreas endémicas.

Cuadro 23-4 Hantavirus seleccionados: huéspedes y enfermedades clínicas^a

VIRUS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	HUÉSPED ROEDOR	ENFERMEDAD CLÍNICA
Hantaan	Lejano Oriente	<i>Apodemus agrarius</i> (forma oriental)	Fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR)
Seúl	Mundial	<i>Rattus rattus</i> ; <i>Rattus norvegicus</i> (ratas de ciudad)	FHSR leve
Dobrava	Balcenes	<i>Apodemus flavicollis</i>	FHSR
Puumala	Escandinavia; Europa	<i>Clethrionomys glareolus</i> (ratones campestres)	Nefropatía endémica
Sin Nombre	Sudoeste de los Estados Unidos	<i>Peromyscus maniculatus</i> (ratón ciervo)	Síndrome pulmonar por hantavirus (SPH)
Bayou	Louisiana	<i>Oligoryzomys palustris</i> (rata del arroz)	SPH
Black Creek Canal	Florida	<i>Sigmodon hispidus</i> (rata del algodón)	Desconocida
New York	Noreste de los Estados Unidos	<i>Peromyscus leucopus</i> (ratón de patas blancas)	SPH
Monongahela	Este de los Estados Unidos	<i>Peromyscus maniculatus nubiterrae</i> (forma silvestre del ratón ciervo)	SPH
Andes	América del Sur y Central	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SPH

^a Para más información sobre otros virus, consultar referencia ⁴³⁹.

El pulmón es el órgano diana, tanto desde el punto de vista anatomopatológico como clínico.³⁹⁵ El edema y los depósitos de fibrina con membranas hialinas localizadas en los espacios aéreos se acompañan por un exudado intersticial mononuclear. Grandes células inmunoblásticas infiltran muchos órganos. Los hallazgos hematológicos son leucocitosis con neutrofilia y desviación a la izquierda, plaquetopenia, inmunoblastos circulantes y (en los casos graves) hemoconcentración. El antígeno viral se concentra en las células endoteliales, sobre todo en el lecho vascular pulmonar, y pueden verse partículas similares a virus dentro de estas células.⁵³³ Los antígenos de hantavirus también se encuentran en las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos foliculares.

Virus de la gastroenteritis humana

La gastroenteritis viral ocupa el segundo lugar, después de las enfermedades virales respiratorias, como causa de morbilidad en los Estados Unidos. Su incidencia se ha estimado en cerca del 11% por año.¹²⁷ La mortalidad es rara. En la década pasada, se aprendió mucho acerca de sus agentes etiológicos, pero puede asignarse una etiología a sólo el 50% de las gastroenteritis virales. La mayoría de estos agentes han sido identificados por inmunomicroscopia electrónica. En esta técnica, se mezcla suero inmune con una suspensión de virus o una muestra de heces. Puede observarse la aglutinación de partículas submicroscópicas examinando con el microscopio electrónico preparaciones con tinción negativa. La mayoría de estos agentes no son fáciles de cultivar. Por lo tanto, no se conocen detalles acerca de su composición; por razones de conveniencia, serán tratados junto con el agente patógeno más frecuente: los rotavirus.

Los agentes de la gastroenteritis viral pueden dividirse en seis grupos. La clasificación se encuentra en etapa embrionaria debido al limitado conocimiento que se posee acerca de algunos de ellos:

- Rotavirus
- Calicivirus (virus redondos pequeños)
- Agentes similares al Norwalk (norovirus)
- Sapovirus
- Astrovirus
- Adenovirus entéricos

La frecuencia de estos virus en los Estados Unidos se resume en el cuadro 23-5. Los datos provienen de un estudio multicéntrico, realizado con microscopia electrónica.³⁰⁹ La identificación de los agentes en este estudio fue puramente morfológica; es probable que los adenovirus estén representados en exceso, porque el enfoque ultraestructural no diferencia los serotipos gastrointestinales de los respiratorios.

Muchos aspectos de estas infecciones gastrointestinales virales son similares. Causan vómitos o diarrea agudos, casi siempre leves, autolimitados y no inflamatorios. No hay diarrea sanguinolenta. El análisis microscópico de biopsias provenientes de voluntarios humanos que han ingerido estos agentes infecciosos muestra aplanamiento de las vellosidades intestinales y cambios inflamatorios leves de la submucosa, alteraciones que son indicativas de malabsorción del intestino delgado. Las células deterioradas en las puntas de las vellosidades son reemplazadas por células de la base de las criptas en el término de 5 a 10 días. La diarrea que dura más de 7 a 10 días tiene pocas probabilidades de ser de etiología viral. El tratamiento es la reposición de los líquidos y electrolitos perdidos, en general

por los vómitos. Lamentablemente, la inmunidad parece ser sólo parcial.¹²⁷

Cabe destacar la ausencia de virus intestinales convencionales en la lista de agentes patógenos. Existen pocas evidencias de que los enterovirus o los adenovirus respiratorios produzcan enfermedad gastrointestinal.

ROTAVIRUS

Los rotavirus son los patógenos humanos más importantes dentro de los *Reoviridae*. En sí mismos no se asocian con enfermedades humanas, pero han sido útiles para el estudio de los mecanismos moleculares de la patogenia viral. "Reo" significa *respiratory-enteric-orfan*, nombre proveniente del origen de los aislamientos del virus y de la falta de asociación con enfermedad clínica. Los rotavirus recibieron su nombre por el aspecto en rueda del virión en las microfotografías electrónicas (véase cuadro 23-1).

Los rotavirus incluyen patógenos tanto humanos como animales, pero los rotavirus animales no infectan al hombre. Los rotavirus humanos han sido clasificados serológicamente y la mayoría de las cepas patógenas para el hombre encontradas en los Estados Unidos y Europa pertenecen al grupo A. Los rotavirus humanos son causa frecuente de gastroenteritis en lactantes y niños pequeños.²⁷¹ La presentación clínica es variable, pero los vómitos y la deshidratación son características clínicas prominentes en comparación con la gastroenteritis causada por otros virus. La combinación de vómitos y la aparición estacional en los meses de invierno han llevado a los investigadores a denominar a este cuadro "enfermedad de vómitos del invierno". La frecuencia y la especificidad de los síntomas respiratorios en la infección por rotavirus son controvertidas. Es posible que la prevalencia de los vómitos en las infecciones por rotavirus refleje la edad del paciente más que una propiedad del virus, ya que el agente Norwalk causa mucho más vómitos en los niños. Uhnou y Svensson compararon las características del grupo A, subgrupos 1 y 2 en lactantes suecos.⁴⁸⁵ Los pacientes con infecciones por cepas del subgrupo 1 tuvieron fiebre de hasta 39 °C en forma significativamente más frecuente que los infectados por el subgrupo 2, pero los lactantes que tenían infecciones por el subgrupo 2 estaban más enfermos, fueron hospitalizados con mayor frecuencia y tenían mayores probabilidades de sufrir síntomas respiratorios. La frecuencia de diarrea y vómitos en los dos grupos fue similar.

Cuadro 23-5 Prevalencia de los agentes virales productores de gastroenteritis en los Estados Unidos y Canadá

Cantidad de positivos	8 262
Rotavirus	48%
Astrovirus	2,4%
Calicivirus	1,3%
SRV/SRSV ^a	10,0/0,4%
Adenovirus	17,2% ^b
Coronavir	6,6% ^b
Otros	14,6%

^a Virus redondos pequeños/virus redondos pequeños estructurados, incluso los similares al agente Norwalk.

^b Incluye tanto cepas respiratorias como intestinales.

Adaptado de la referencia³⁰⁹.

Puede haber infecciones crónicas por rotavirus en niños inmunosuprimidos. En los adultos, la infección suele ser asintomática. Estos virus son notorios causantes de infecciones intrahospitalarias, incluso de epidemias, en los niños.

CALICIVIRUS

Estos virus, identificados al principio por microscopía electrónica, se caracterizaron descriptivamente como virus pequeños de estructura redonda.²⁰⁰ Existen dos grupos principales de virus dentro de los calicivirus, que se describen a continuación. **Virus similares al Norwalk (Norovirus).** El agente Norwalk de la gastroenteritis se reconoció como una partícula de 27 nm en muestras de heces de un brote de gastroenteritis en la comunidad de Norwalk, Ohio. Más tarde, se han aislado virus de RNA similares en otras epidemias. El análisis molecular ha revelado que existen dos grupos principales.¹¹ Estos agentes se denominan norovirus.²⁷⁴

Los virus similares al Norwalk han causado epidemias de enfermedad con frecuencia y también producen infecciones esporádicas;²⁰⁰ originan infección y enfermedad activa en personas de todas las edades, a diferencia de la mayoría de otros agentes virales, que producen enfermedad sintomática sobre todo en lactantes y niños pequeños. Son la principal causa de gastroenteritis infecciosa en los adultos. Los agentes similares al Norwalk se han asociado con alimentos y agua contaminados y son una de las posibilidades para considerar cuando un paciente ha ingerido recientemente mariscos. Se describió enfermedad epidémica en ámbitos que varían desde juegos de fútbol hasta cruceros de placer o institutos geriátricos.

Virus similares al Sapporo (Calicivirus clásicos). Estos agentes son morfológicamente parecidos a los virus similares al Norwalk, pero difieren desde el punto de vista inmunitario y genético. Algunos autores los consideran agentes importantes de gastroenteritis en los niños, a veces transmitida por alimentos.⁹³ Otras autoridades en la materia se reservan su juicio.²⁰⁰

ASTROVIRUS

Los astrovirus también contienen RNA y han sido difíciles de cultivar in vitro, aunque algunas cepas se han desarrollado con éxito.³³⁹ Su nombre proviene de su aspecto ultraestructural en forma de estrella. Los astrovirus son eliminados en grandes cantidades en las heces, pero parecen ser menos patógenos que los agentes tipo Norwalk. Han causado enfermedades epidémicas en niños pequeños, en guardias pediátricas, en guarderías y en sanatorios. Se describió la infección simultánea con astrovirus y calicivirus.

ADENOVIRUS ENTÉRICOS

No puede establecerse una relación causal de los serotipos clásicos de adenovirus con la enfermedad diarreica, pero se han demostrado serotipos "no cultivables" por inmunomicroscopía electrónica. Los adenovirus tipos 40 y 41, que no se desarrollan bien en los tipos habituales de cultivo de tejidos, son patógenos intestinales.²⁴⁴ Estos adenovirus entéricos son la segunda causa en orden de frecuencia de gastroenteritis viral en los lactantes. Causan infecciones esporádicas, aunque se notificaron epidemias. La mayoría de los pacientes son menores de 2 años.

Coronavirus

Los coronavirus clásicos son causantes del resfriado común.²³⁶ La mayoría requiere el uso de cultivos de órganos para

el aislamiento fiable y es improbable que se los encuentre en el laboratorio clínico.

En 2003 se produjo un espectacular agregado al género, cuando un nuevo coronavirus se identificó como la causa de una nueva y misteriosa enfermedad respiratoria en China. Esta infección se llamó síndrome respiratorio agudo grave (SRAG). A diferencia de las infecciones conocidas antes por coronavirus, el SRAG se caracteriza por una infección de las vías respiratorias bajas que a menudo requiere la hospitalización en una unidad de cuidados intensivos; puede ser mortal.^{36,94} Otra característica problemática de esta infección es su propensión a infectar al personal de los hospitales, en especial a los que han estado en contacto estrecho con los pacientes.²³⁰ Con asombrosa rapidez, con la colaboración de científicos de todo el mundo y por medio de técnicas moleculares, la causa de la infección fue identificada como un nuevo coronavirus. La importancia de un metaneumovirus humano que fue aislado en algunos pacientes no se ha aclarado.⁸⁶ Cabe destacar que un coronavirus convencional, OC243, produjo un brote reciente de infecciones respiratorias que incluyeron neumonías.

Cultivirus

Este grupo incluye el virus de la fiebre por garrapatas del Colorado, una enfermedad febril indiferenciada, casi siempre leve y autolimitada, pero que puede ser grave o incluso mortal.⁴²⁴ Se transmite por la picadura de garrapatas. Este virus estaba incluido antes en el grupo *Orbivirus*, que está compuesto por patógenos para los animales. Los orbivirus son miembros de la familia *Reoviridae*, junto con los rotavirus.

Retrovirus

Los retrovirus son virus de RNA; reciben ese nombre porque contienen una enzima que transcribe el RNA a DNA, a la inversa de lo que sucede normalmente, que el DNA se transcribe a RNA. Durante muchos años, estos virus fueron conocidos como causantes de tumores en los animales. En la década de 1970, se encontraron dos virus que causaban linfomas linfocíticos de células T en seres humanos, que se denominaron virus del linfoma humano de células T (HTLV-I y HTLV-II). Este descubrimiento fue importantísimo desde el punto de vista biológico, pero los tumores son poco frecuentes.¹⁹⁰

El grupo de los retrovirus adquirió un súbito aumento de su notoriedad en 1983, cuando se identificó un tercer retrovirus como causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹⁶⁵ El SIDA había sido reconocido clínicamente varios años antes, cuando se detectaron infecciones oportunistas en varones jóvenes homosexuales, bisexuales o drogadictos, pero que no tenían los factores de riesgo convencionales para la neumonía por *Pneumocystis* ni para la candidiasis.

Se han aislado virus similares en varios laboratorios, que han recibido indistintamente el nombre de HTLV-III, virus asociado con linfadenopatía (LAV) y virus relacionado con el SIDA (ARV). Un panel de expertos determinó el nombre definitivo: virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Aunque el HIV fue aislado por primera vez en 1983, el análisis retrospectivo de sueros y tejidos congelados sugiere que un virus similar había infectado a un adolescente sexualmente activo en St. Louis en 1968.¹⁷⁶ Más tarde, se aisló un virus serológicamente relacionado que se denominó HIV-2. La distribución del HIV-1 es mundial. El HIV-2, que se encuentra fundamentalmente en África Occidental, también causa un síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Se han informado casos de infección por

HIV-2 en los Estados Unidos, pero la mayoría de estos pacientes tenían alguna conexión con África Occidental. Existen reacciones inmunitarias cruzadas entre el HIV-1 y el HIV-2. Deben realizarse inmunoanálisis específicos para distinguir entre ambas infecciones y también para detectar los antígenos tipo específicos con la máxima sensibilidad. Para complicar aún más las cosas, se ha identificado al menos un paciente infectado por ambos virus. El HIV es miembro de la subfamilia lentivirus (*lenti* = lento) de *Retroviridae*. Otros virus de este grupo causan infecciones crónicas con largos períodos de latencia clínica. Algunos retrovirus de animales también producen inmunodeficiencias, como el virus de la inmunodeficiencia simiana y el virus de la leucemia felina. No se ha demostrado la infección entre especies.

Al contrario de otros lentivirus, el HIV es muy heterogéneo desde el punto de vista genético, al extremo que cada aislamiento es casi único (denominados cuasi-especies). Sin embargo, existen grupos relacionados genéticamente, que a su vez se dividen en subtipos o clados. Las cepas del grupo M (major) representan el 95% de los aislamientos y se dividen en por lo menos ocho subtipos (A, B, C, D, F, G, H y J). Todos los clados se encuentran en África; en los Estados Unidos y Europa el clado B es el subtipo predominante. (Cabe hacer notar que los clados genéticos no mapean en serotipos virales definidos).

Las cepas del grupo O, que predominan en África Occidental, tienen menos del 50% de homología con las cepas del grupo M. Los virus del grupo N (no-M u O) se encuentran en Camerún.

Todos los retrovirus tienen además tendencia a la recombinación cuando se superponen múltiples cepas. Se supuso que los pacientes infectados por el HIV deberían ser resistentes a la infección por una segunda cepa. Lamentablemente, la ausencia de inmunidad completa y la frecuencia de exposiciones múltiples al virus han tenido como resultado las infecciones por varias cepas, situación en la que puede tener lugar la recombinación.³⁰

No existen dudas acerca de que el HIV es la peste más devastadora que enfrentamos al entrar en el siglo XXI. Este virus ha alterado el rostro de nuestra sociedad y continuará causando estragos durante muchos de los años venideros, sobre todo en el Tercer Mundo. Si bien la aparición del tratamiento antirretroviral de alta actividad ha reducido la velocidad de avance de la infección y disminuido la mortalidad en los países que pueden conseguir los fármacos, la epidemia continúa avanzando. En el cuadro 23-6 se resume el estado actual de la epidemia mundial.

El análisis que sigue es un breve intento de presentar algunas de las características más prominentes de este virus multifacético y de la enfermedad que causa. Es un tributo a la ciencia moderna que un agente infeccioso haya sido aislado sólo 3 años después de los primeros informes del síndrome clínico. Sin el moderno arsenal de la biología y la virología moleculares, todavía estaríamos indefensos ante este flagelo.

El virión del HIV-1 es icosaédrico y tiene 72 espículas externas.¹⁶⁵ Es considerablemente más complejo que el HTLV-1 y el HTLV-2, en consonancia con su evolución natural más complicada. Los productos genéticos pueden dividirse en tres grupos. Las proteínas virales que representan los antígenos más importantes para el diagnóstico se resumen en el cuadro 23-7.

La proteína de envoltura gp120 tiene la información para el ingreso del virus HIV-1 en el paciente.¹⁶⁵ Esta proteína tiene una afinidad destacable por un complejo de receptores existente en la superficie de células distribuidas por todo el organismo. El principal componente del complejo, el receptor CD4, se

Cuadro 23-6 La epidemia mundial de HIV en el año 2003

PARÁMETRO	REGIÓN GEOGRÁFICA	PERSONAS AFECTADAS
Personas que viven con SIDA	Todo el mundo	34 a 46 millones
	Norteamérica	790 000 a 1,2 millones
	África subsahariana	25 a 28,2 millones
Nuevos casos de adultos y niños infectados por el HIV	Todo el mundo	4,2 a 5,8 millones
	Norteamérica	36 000 a 54 000
	África subsahariana	3 a 3,4 millones
Muertes de adultos y niños debidas al SIDA	Todo el mundo	2,5 a 3,5 millones
	Norteamérica	12 000 a 18 000
	África subsahariana	2,2 a 2,4 millones

Fuente: Annual UN AIDS Epidemic Update Report en <http://www.unaids.org>.

encuentra en los linfocitos T helper, macrófagos y células de Langerhans de la piel. La segunda parte del complejo de receptores es una quimiocina receptora. Las cepas virales que interactúan con el receptor CXCR4 (virus X4) tienen mayores probabilidades de infectar los linfocitos T in vitro; las cepas que interactúan con el receptor CCR5 (virus R5) se asocian in vitro con líneas celulares de macrófagos. Algunos virus, que interactúan con ambas quimiocinas correceptoras, pueden infectar tanto linfocitos como macrófagos.

Se ha adelantado la hipótesis de que los hombres no circuncidados tienen mayores probabilidades de desarrollar infecciones por HIV porque el prepucio tiene abundantes células de Langerhans, así como macrófagos y linfocitos.³ La mayor susceptibilidad a la infección por el HIV de los pacientes con úlceras genitales puede ser el resultado de la accesibilidad de los macrófagos y linfocitos CD4+ en las bases inflamadas de las úlceras.⁴⁴⁴

Sin embargo, las células diana más importantes del virus son los linfocitos T CD4+.¹⁰³ Estos linfocitos *helper* representan el centro neural del sistema inmunitario celular. Sin ellos, el organismo tiene mayores riesgos de sufrir muchas infecciones oportunistas. Además de la anormalidad de las células T, se ha demostrado también una respuesta defectuosa de las células B a antígenos T independientes. Los macrófagos son muy importantes, ya que proporcionan un sitio donde el virus queda oculto, incluso después de que las células T han sido destruidas y la mayor parte del virus ha sido eliminada por la quimioterapia.

La primoinfección por el virus HIV causa una enfermedad febril transitoria, que puede estar acompañada por linfadenopatía, faringitis o una erupción cutánea difusa.¹⁰³ Durante la enfermedad aguda se encuentran altos niveles de virus circulante, en ausencia de anticuerpos específicos. En el curso natural de la infección, los anticuerpos se desarrollan después de varias semanas a varios meses.

La siguiente fase subclínica de la enfermedad está acompañada por la presencia de anticuerpos, antígeno p24 circulante, inmunocomplejos y bajos niveles de virus circulante. Se ha introducido la realización de pruebas para detectar el virus en hemoderivados, en un intento de reducir al mínimo el riesgo de transfundir unidades infectadas. Durante la fase de viremia crónica, mutaciones repetitivas del genoma viral abortan los inten-

Cuadro 23-7 Principales antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1	
GEN	PRODUCTOS GENÉTICOS
Antígeno grupoespecífico/core (GAG)	p (proteína)18, p24, p55
Polimerasa (POL)	p31, p51, p66
Envoltura (ENV)	gp(glucoproteína)41, gp120, gp160
Adaptado de la referencia ⁶² .	

tos del sistema inmunitario del huésped para eliminar la infección. El comienzo de la enfermedad clínica se asocia con un aumento de la cantidad de virus, tanto en las células mononucleares de sangre periférica como en el plasma.

Después de la infección por el HIV-1 puede aparecer un amplio espectro de cuadros clínicos. La clasificación de los CDC de la enfermedad por HIV se resume en los cuadros 23-8 y 23-9.⁶¹ Ciertas enfermedades (grupo C del cuadro 23-9) se asocian con alta frecuencia con el HIV y se denominan enfermedades definitorias del SIDA.

Las complicaciones infecciosas de la infección por el HIV incluyen infecciones virales, micóticas, micobacterianas, bacterianas y parasitarias. La práctica de la infectología y de la microbiología clínica ha sido irrevocablemente alterada por este virus. Numerosas infecciones, antes consideradas exóticas o poco frecuentes, se han transformado en cuadros comunes en centros que atienden a gran cantidad de pacientes infectados por el HIV. Las antiguas reglas deben descartarse cuando el enfermo está tan intensamente inmunosuprimido como lo están los pacientes con SIDA o los pacientes con trasplante de órganos importantes. Todo es posible y la respuesta inflamatoria del huésped que se ha asociado con un agente infeccioso en particular puede estar presente o no. Lo que en un paciente normal sería microbiología indiscriminada, se transforma en buena práctica en este grupo de enfermos. Es necesaria la integración de datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio para decidir cuáles son los recursos de laboratorio que deben aplicarse a un paciente determinado.

Las infecciones oportunistas más frecuentes que afectan a los pacientes infectados por el HIV se encuentran entre las enfermedades definitorias de SIDA enumeradas en el cuadro 23-9. Algunas de esas infecciones son características de una fase particular de la enfermedad. Por ejemplo, la candidiasis bucal suele ser una característica de presentación de la enfermedad. La neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*) aparece por primera vez cuando los recuentos de linfocitos se encuentran relativamente altos, al comienzo del proceso patológico. Las infecciones por el complejo *Mycobacterium avium* tienden a presentarse tardíamente en el curso de la enfermedad, cuando los recuentos de linfocitos CD4+ son bajos. Aunque las infecciones con agentes patógenos asociados con células (microorganismos intracelulares facultativos) se relacionan más estrechamente con defectos de la inmunidad celular, las infecciones bacterianas para las cuales la inmunidad humoral es importante para la defensa del huésped también son más frecuentes en los pacientes infectados por el HIV. La búsqueda de la etiología de una infección oportunista no debe detenerse cuando se identifica el primer agente, ya que muchas de las infecciones en los pacientes con SIDA son polimicrobianas.

No todas las enfermedades relacionadas con el HIV son causadas por infecciones oportunistas. El virus es citopatógeno por sí mismo y causa enfermedades clínicas como encefalitis y demencia relacionada con el SIDA. El colapso del sistema inmunitario celular y sus mecanismos de vigilancia conduce a complicaciones neoplásicas, algunas de las cuales pueden ser producidas por virus. Los linfomas son frecuentes.³⁵⁰ Una neoplasia antes rara, el sarcoma de Kaposi, se ha registrado a menudo en los pacientes con SIDA, muchas veces como manifestación precoz de la enfermedad. Otras manifestaciones pueden tener un mecanismo inmunopatológico o ser de mecanismo desconocido. Algunas infecciones que deberían afectar a pacientes con SIDA, como la legionelosis o la aspergilosis, son bastante infrecuentes. Sin duda, el sistema inmunitario celular contribuye al control de la aspergilosis y la legionelosis invasoras, pero otros mecanismos, no destruidos por el HIV-1 son tal vez de importancia.

A medida que ha mejorado el tratamiento para la infección por el HIV y para las complicaciones infecciosas de la inmunodeficiencia, el patrón de infecciones encontradas ha cambiado. Un análisis de autopsias realizadas en Los Ángeles entre 1982 y 1993 demostró una disminución del número de infecciones mortales causadas por *Pneumocystis jiroveci*, sepsis

Cuadro 23-8 Sistema de clasificación revisado en 1993 para adolescentes y adultos positivos para HIV			
CATEGORÍAS CLÍNICAS			
CATEGORÍAS SEGÚN LINFOCITOS T CD4+	(A) Asintomático, HIV primario (agudo) o linfadenopatía persistente generalizada	(B) Sintomático, cuadros diferentes de (A) o (C) (véase cuadro 23-9)	(C) Cuadros marcadores de SIDA (véase cuadro 23-9)
(1) ≥ 500/μL	A1	B1	C1 ^a
(2) 200-499/μL	A2	B2	C2 ^a
(3) < 200/μL	A3	B3	C3 ^a
^a Estas categorías indican SIDA. Para la clasificación debe utilizarse el menor recuento de linfocitos T CD4+ confirmado, pero no necesariamente el más reciente. Adaptado de la referencia ⁶¹ .			

Cuadro 23-9 Enfermedades accesorias (categoría B) y enfermedades incluidas en la definición de vigilancia de casos (categoría C) de SIDA de 1993
Categoría B

Angiomatosis bacilar
 Candidiasis orofaríngea (muguet)
 Candidiasis vulvovaginal; persistente, frecuente, o con mala respuesta al tratamiento
 Displasia cervical (moderada o grave)/carcinoma in situ
 Enfermedad inflamatoria pelviana, particularmente si está complicada con abscesos tuboováricos
 Herpes zóster (zona), que incluya al menos dos episodios diferentes o más de un dermatoma
 Leucoplasia vellosa bucal
 Listeriosis
 Neuropatía periférica
 Otros cuadros no especificados
 Púrpura trombocitopénica idiopática
 Síntomas generales, como fiebre (38.5 °C) o diarrea de más de un mes de duración

Categoría C^a

Candidiasis de bronquios, tráquea o pulmonar
 Candidiasis de esófago
 Cáncer cervical invasor
 Coccidioidomicosis, diseminada o extrapulmonar
 Complejo *Mycobacterium avium* o *Mycobacterium kansasii*, diseminado o extrapulmonar
 Criptococosis extrapulmonar
 Criptosporidiosis intestinal crónica (de más de un mes de duración)
 Encefalopatía relacionada con el HIV
 Enfermedades producidas por citomegalovirus (excepto hígado, bazo, ganglios linfáticos)
 Herpes simple: úlceras crónicas (de más de 1 mes de duración); o bronquitis, neumonitis o esofagitis
 Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar
 Isosporiasis intestinal crónica (de más de un mes de duración)
 Leucoencefalopatía multifocal progresiva
 Linfoma de Burkitt (o término equivalente)
 Linfoma inmunoblástico (o término equivalente)
 Linfoma primitivo de cerebro
Mycobacterium tuberculosis en cualquier localización (pulmonar o extrapulmonar)
 Neumonía por *Pneumocystis jiroveci*
 Neumonía recidivante
 Otras especies de *Mycobacterium* o especies no identificadas, diseminadas o extrapulmonares
 Retinitis por citomegalovirus con pérdida de visión
 Sarcoma de Kaposi
 Septicemia recidivante por *Salmonella*
 Síndrome de emaciación producido por el HIV
 Toxoplasmosis cerebral

^a Estas categorías indican SIDA.
 Adaptado de la referencia⁶¹.

bacteriana, citomegalovirus, complejo *Mycobacterium avium* y *Toxoplasma gondii* entre 1989 y 1993, en comparación con el período 1982-1988.²⁸¹ En el curso del tiempo, la institución de la profilaxis para las infecciones relacionadas con el SIDA y de tratamientos más eficaces ha cambiado las causas de muerte de las personas con SIDA.³¹⁴ Aunque las enfermedades definitorias de SIDA siguen siendo importantes, otras enfermedades crónicas y las complicaciones del tratamiento han cobrado mayor relevancia.

Estos cambios también afectan la forma en que se lleva a cabo la vigilancia para la infección.⁷² La nueva definición del cuadro conserva los criterios clínicos e inmunológicos que eran el cuerpo central de los estándares de vigilancia previos (cuadros 23-8 y 23-9), pero agrega un criterio virológico (cuadro 23-10). Según el nuevo enfoque, se incluyen los pacientes infectados, pero en los cuales todavía no se ha desarrollado la enfermedad clínica. En el nuevo estándar se incluyen pautas para niños. Las recomendaciones revisadas para la detección

Cuadro 23-10 Definiciones de caso revisadas para la vigilancia de la enfermedad por HIV

GRUPO DE PACIENTES	CRITERIOS DE LABORATORIO	CRITERIOS CLÍNICOS Y OTROS CRITERIOS (SI NO SE CUMPLEN LOS CRITERIOS DE LABORATORIO)
Adultos, adolescentes o niños ≥ 18 meses	Serología positiva para HIV ^a O BIEN Prueba viral positiva ^b	Diagnóstico de infección por el HIV, sobre la base de criterios de laboratorio, consignado en una historia clínica por un médico O BIEN Enfermedades incluidas en la definición de casos de SIDA (cuadros 23-8 y 23-9)
Niños < 18 meses	Prueba viral positiva en dos oportunidades diferentes (excluida sangre del cordón) O BIEN Prueba viral positiva (presuntiva) en una oportunidad (excluida sangre del cordón) y ninguna prueba viral o resultados de serología posteriores	Diagnóstico de infección por el HIV, sobre la base de criterios de laboratorio, consignado en una historia clínica por un médico O BIEN Enfermedades que cumplan la definición de caso de SIDA de la vigilancia pediátrica de 1987 ⁵²
Los niños < 18 meses nacidos de una madre infectada por el HIV se consideran no infectados si el niño NO reúne los criterios para infección por el HIV pero SÍ cumple los criterios de la columna adyacente	≥ 2 pruebas para anticuerpos negativas en diferentes muestras tomadas cuando el niño tiene ≥ 6 meses de edad O BIEN Por lo menos dos pruebas virales negativas, ambas realizadas a la edad de ≥ 1 mes y una realizada a los ≥ 4 meses de edad Y Ninguna otra evidencia de laboratorio o clínica de infección por el HIV O BIEN Una prueba para anticuerpos negativa (presuntiva) efectuada a los ≥ 6 meses de edad y ninguna prueba viral positiva O BIEN Una prueba viral negativa realizada a los ≥ 4 meses de edad y ninguna prueba viral positiva O BIEN Una prueba viral positiva con ≥ 2 pruebas virales posteriores negativas (por lo menos una de ellas realizada a los ≥ 4 meses de edad) o una prueba de anticuerpos negativa (por lo menos una de ellas realizada a los ≥ 6 meses de edad)	Definido por un médico como “no infectado” y con los resultados de las pruebas de diagnóstico de HIV consignados en la historia clínica Y Ninguna otra evidencia de laboratorio o clínica de infección por el HIV
Se considera que los niños < 18 meses nacidos de una madre infectada por el HIV han tenido exposición perinatal si el niño no reúne los criterios para infección por HIV o los criterios de “no infectado por el HIV”		

^a Serología positiva para HIV = enzimoimmunoanálisis reiteradamente positivo, seguido de una prueba confirmatoria positiva, p. ej., Western blot.

^b Prueba viral positiva para HIV = prueba positiva para ácido nucleico del HIV, prueba positiva para antígeno p24 o cultivo viral positivo.
Adaptado de la referencia⁷¹.

sistemática en mujeres embarazadas se han publicado por separado.⁷⁶

El HIV-1 se excreta en la saliva, la leche, el semen y otros líquidos corporales, pero se ha demostrado que la transmisión de la infección sólo ocurre después de la exposición a secreciones genitales o sangre. La importancia de la leche materna en la transferencia del virus de la madre al niño no está aclarada.

Los grupos más importantes con riesgo de infección por el HIV son los que han recibido hemoderivados (receptores de transfusiones de sangre, hemofílicos), los que han compartido agujas contaminadas (adictos a drogas), los que han tenido relaciones sexuales con una persona infectada y los niños de madre infectada. Al comienzo de la epidemia, la mayoría de las infecciones transmitidas sexualmente en los Estados

Unidos y Europa se registraban entre varones homosexuales o bisexuales, pero rápidamente se demostró la transmisión heterosexual. Ésta ha sido predominante en África desde el comienzo de la epidemia. El riesgo de transmisión de la infección por el HIV de la madre al lactante y la gravedad de la enfermedad en el lactante están directamente relacionados con la gravedad de la infección de la madre en el momento del parto.

El tratamiento de la infección ha representado una batalla constante entre el virus y la industria farmacéutica, con regocijo y desesperación alternados entre los pacientes y los profesionales de la salud. Hacia 1996, los esfuerzos terapéuticos se concentraron en la quimioterapia de combinación, usando un inhibidor de la DNA polimerasa RNA dependiente (transcriptasa inversa), junto con un inhibidor de la proteasa viral.¹³⁹ El inhibidor de la transcriptasa inversa puede ser un nucleótido/nucleósido o un no nucleósido. El tratamiento de los pacientes con estos poderosos fármacos, conocido como tratamiento antirretroviral activo (TARAA) se ha transformado en una subespecialidad dentro de la infectología. El virus, por supuesto, también ha sido elástico y ha desarrollado resistencia a las principales clases de fármacos antivirales,⁹⁹ en especial si el tratamiento es incompleto o inadecuado.

Aunque ningún tratamiento ha demostrado hasta ahora ser capaz de erradicar la infección por el HIV, la sentencia de muerte que representaba su diagnóstico se ha revertido por el TARAA en las sociedades que pueden financiar estos costosos fármacos. Cuando se combina con una mejor educación de los grupos de alto riesgo, el TARAA tiene como resultado la estabilización o la disminución de la incidencia de nuevas primoinfecciones. El desafío es encontrar fuentes de financiación para ofrecer los nuevos tratamientos a países con magras reservas económicas. Lamentablemente, la curva epidemiológica ha comenzado a trepar nuevamente debido a la continua aparición de resistencia a los fármacos, a la dificultad de llegar a los usuarios de drogas intravenosas y al resurgimiento de la actividad sexual por la (incorrecta) percepción de que la pena de muerte ha sido conmutada.⁸⁰

El riesgo de transmitir el HIV por transfusiones de sangre se ha reducido de manera notable por medio de la detección sistemática en todas las unidades de sangre en busca de anticuerpos y por la solicitud a los integrantes de grupos de alto riesgo de no donar sangre. El resultado ha sido una disminución constante en la incidencia de las infecciones por el HIV producidas por transfusiones, a medida que la sensibilidad de las pruebas utilizadas para el control de hemoderivados ha aumentado.

La introducción de pruebas de amplificación extremadamente sensibles para la detección sistemática en todas las unidades de sangre administradas en los Estados Unidos ha reducido al mínimo absoluto el riesgo por transfusión.

La exposición laboral a agentes infecciosos es un hecho inevitable en la vida del personal médico. Los patógenos transmitidos por sangre son un componente importante del problema, debido a su frecuencia y a la exposición a sangre. Los objetos cortantes (p. ej., agujas e instrumental quirúrgico) son los vehículos de transmisión más comunes. Los agentes virales representan el riesgo laboral más peligroso; entre ellos, el HIV encabeza la lista. Los CDC han publicado recomendaciones para el manejo, preferentemente por prevención, de las exposiciones laborales.^{73-75,77} En el recuadro 23-4 se ofrece un resumen de las recomendaciones generales.

El tratamiento de los pacientes con infección por el HIV es complicado y requiere el apoyo de muchas áreas del laboratorio. En alguna forma, la expansión de las posibilidades diag-

Recuadro 23-4 Manejo de las exposiciones laborales a sangre^a

Proporcionar atención inmediata al sitio de exposición:

Lavar las heridas y la piel con agua y jabón.

Enjuagar las mucosas con agua.

Determinar el riesgo asociado con la exposición por:

Tipo de líquido (p. ej., sangre, líquido visiblemente sanguinolento, otros líquidos o tejidos potencialmente infecciosos o virus concentrado)

Y

Tipo de exposición (lesión percutánea, exposición de piel o mucosas no intactas, o mordeduras que produzcan exposición a la sangre).

Evaluar la fuente de exposición.

Evaluar el riesgo de infección usando la información disponible.

Realizar pruebas en las fuentes conocidas para detectar HBsAg, anti-HCV y anticuerpos anti-HIV (considerar usar pruebas rápidas).

En el caso de fuentes desconocidas, evaluar el riesgo de exposición a HBV, HCV o HIV.

No efectuar pruebas para contaminación viral en agujas o jeringas desechadas.

Evaluar a la persona expuesta:

Determinar su nivel inmunitario contra la infección por HBV (p. ej., por antecedentes de vacunación y de respuesta a la vacuna).

Administrar la profilaxis posexposición para exposiciones que plantean riesgo de infección, de acuerdo con las recomendaciones en vigencia.

Realizar pruebas de seguimiento y proporcionar asesoramiento.

^a Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HVC) y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Adaptado de las referencias^{73-75,77}.

nósticas ha simplificado el enfoque, como se resume en el cuadro 23-11.

Herpesvirus

Los virus del grupo de los herpesvirus humanos son los aislamientos más frecuentes en los laboratorios generales. El grupo consta de los siguientes miembros:

- Virus del herpes simple tipo 1
- Virus del herpes simple tipo 2
- Citomegalovirus humano
- Virus de Epstein-Barr
- Virus de la varicela-zóster
- Herpesvirus humano 6
- Herpesvirus humano 7
- Herpesvirus humano 8

Algunos miembros del grupo de los herpesvirus puede integrar su DNA con el de la célula huésped. La mayoría causa una infección latente en células linfoides o en ganglios del SNC y se reactivan luego para producir enfermedades recidivantes. En general, las primoinfecciones son más graves que las recidivas. Las primoinfecciones producidas por varios virus de este grupo son más graves cuando ocurren en la adolescencia y la edad adulta que cuando suceden en la infancia. Los virus circulan más libremente y antes en el curso de la vida en los grupos socioeconómicos bajos y no aparecen hasta la adolescencia en las capas sociales más pudientes. Por lo tanto, las infecciones en los grupos socioeconómicos altos tienden a ser más graves.

Cuadro 23-11 Apoyo de laboratorio para tratar a los pacientes infectados por el HIV

PARÁMETRO	MÉTODO PRINCIPAL	MÉTODO SECUNDARIO/ CONFIRMATORIO
Diagnóstico inicial	Enzimoimmunoanálisis (repetidamente positivo)	Western blot o inmunofluorescencia: pruebas para ácido nucleico viral (carga viral) para pacientes con síntomas agudos ²⁶⁹ y recién nacidos de madres infectadas
Pronóstico y comienzo del tratamiento	Cuantificación de la concentración de virus en plasma (carga viral)	Pueden ser necesarias pruebas ultrasensibles
Comienzo del tratamiento y profilaxis de infecciones oportunistas	Cuantificación de linfocitos CD4	
Control del tratamiento	Cuantificación de la concentración de virus en plasma (carga viral)	Pueden ser necesarias pruebas ultrasensibles
Evaluación de las recaídas clínicas o virológicas	Pruebas de resistencia fenotípicas o genotípicas	

VIRUS DEL HERPES SIMPLE

Los virus del herpes simple producen una amplia variedad de infecciones.⁵¹⁸ Dos serotipos del virus infectan a los seres humanos. Los antígenos compartidos entre los grupos 1 y 2 complican la diferenciación serológica de antígenos y anticuerpos, pero en este momento se comercializan reactivos fiables.⁶⁵⁶ En las personas sanas, predominan las infecciones de la cavidad bucal y del aparato genital. Las infecciones por el tipo 1 son más frecuentes en la porción superior del cuerpo, en tanto que el tipo 2 causa lesiones genitales; pero hay excepciones a esta regla. Hasta un tercio de los aislamientos del aparato genital son cepas del tipo 1. En cambio, muy pocos aislamientos de la cavidad bucal son cepas del tipo 2.

La tipificación de los aislamientos de herpes en localizaciones genitales proporciona una valiosa información pronóstica, ya que las causadas por el herpes simple tipo 1 tienen menos tendencia a recidivar que las producidas por el tipo 2.²⁹² En un grupo de 457 mujeres que habían tenido primoinfección genital (definida por la ausencia de anticuerpos contra el virus tipo 2 y un cultivo positivo de las lesiones genitales), el 89% tuvo una recidiva después de una mediana de 391 días.²⁶ Hubo al menos seis recidivas durante el primer año en el 38% de las pacientes y el 20% tuvo más de 10 recidivas. Un estudio secuencial de pacientes con infecciones recidivantes demostró que el paciente era asintomático y carecía de lesiones visibles durante un tercio del período durante el cual eliminaba virus.⁴⁹⁸ Las infecciones genitales con cualquiera de ambos tipos de virus tienen mayores probabilidades de recidivar que las infecciones bucales con el mismo tipo.²⁹² Además, el mecanismo de infección puede ser diferente para ambos serotipos. La exposición al serotipo 1 comienza en la infancia, y entre el 25% y el 50% de los estudiantes secundarios presentan anticuerpos contra el virus. La adquisición de anticuerpos contra el tipo 2 no comienza hasta la adolescencia y continúa durante todo el período de actividad sexual. El aislamiento de virus del tipo 2 en una localización genital implica transmisión sexual, mientras que la vía de transmisión para el tipo 1 puede ser la autoinoculación con secreciones bucales.

El virus del herpes es transmitido de una persona a otra por secreciones infectadas o por lesiones. La infección suele ser esporádica, pero se describió una epidemia de infecciones cutáneas en un campamento de luchadores (herpes gladiatorum).²⁴

Las infecciones más graves producidas por el herpes simple son las encefalitis, que afectan con mayor frecuencia el lóbulo temporal y la cara orbital del lóbulo frontal en los adultos, y la infección diseminada en los lactantes, que puede ser adquirida durante o después del nacimiento. El virus del herpes simple produce encefalitis esporádicas. En el período neonatal, las cepas infectantes son del tipo 2, lo que refleja su origen en el aparato genital materno. Las cepas tipo 1 son abrumadoramente predominantes en los niños mayores y los adultos. El diagnóstico puede hacerse en forma definitiva por biopsia de cerebro y cultivo, pero la disponibilidad del tratamiento antiviral no tóxico ha llevado a los médicos a tratar en forma empírica a los pacientes, evitando así este procedimiento invasivo. Lamentablemente, como resultado pueden pasarse por alto otras enfermedades potencialmente tratables. Whitley y cols. estudiaron a 432 pacientes sometidos a biopsia de cerebro por sospecha de encefalitis por herpes simple como parte de un estudio cooperativo, de alcance nacional, sobre tratamiento.⁵¹⁹ Se detectó encefalitis por herpes simple en el 45% de los pacientes. Otro 18% tenía alguna otra enfermedad infecciosa identificable, la mitad de las cuales eran tratables. Así, el 10% de la población total tenía una infección tratable que se hubiera pasado por alto sin la biopsia de cerebro. Hasta hace poco, la única prueba diagnóstica no invasiva era el electroencefalograma, en el que las descargas anormales del lóbulo temporal eran características, cuando estaban presentes. El advenimiento de las modernas técnicas de obtención de imágenes ha revolucionado el enfoque clínico. La resonancia magnética (RM) es más sensible que la tomografía computarizada. La encefalitis por herpes simple se observa rara vez o nunca en presencia de un estudio normal de RM. Sin embargo, las lesiones no se limitan a lesiones unilaterales del lóbulo temporal. Las anomalías detectadas por RM pueden ser multifocales o difusas.⁴³⁸ Al comienzo de la enfermedad, es posible que las únicas anomalías se encuentren en el electroencefalograma.⁴²²

El virus del herpes simple se aísla rara vez en el líquido cefalorraquídeo (LCR). En el estudio cooperativo de alcance nacional citado sólo se aisló en el LCR de 2 de 45 casos (4%) de encefalitis herpética comprobados por biopsia.³⁷⁰ El diagnóstico serológico es muy poco sensible, inespecífico y demasiado lento como para ser de utilidad en la toma de decisiones terapéuticas. El uso de técnicas de amplificación molecular para la

detección del genoma del herpesvirus en el LCR de pacientes con encefalitis o meningoencefalitis representa un avance diagnóstico importante.

Los virus herpéticos permanecen en forma latente en los ganglios espinales después de la primoinfección. El virus tipo 1 se aísla en los ganglios dorsales y el tipo 2, en los sacros. La meningitis aséptica herpética es poco frecuente y suele ser causada por el virus tipo 2. La meningitis viral se asocia con un nivel de glucosa normal en el LCR, a diferencia de los niveles muy disminuidos de las meningitis bacterianas. Sin embargo, los niveles de glucosa en la meningitis herpética pueden ser muy bajos y el recuento celular puede alcanzar magnitudes del orden de los miles.³⁵⁸ Al comienzo de la evolución de cualquier meningitis viral, pueden predominar los neutrófilos y sugerir la posibilidad de un proceso bacteriano. El virus del herpes simple, casi siempre el tipo 2, también causa meningitis linfocítica recidivante (meningitis de Mollaret); el cultivo suele ser negativo, pero puede demostrarse la presencia de genoma viral en el LCR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁴⁷⁷

Se calcula que la infección herpética neonatal se observa en 1:2 000 a 1:5 000 partos. Casi siempre es sintomática y con frecuencia, mortal. En un estudio en colaboración, la tasa de mortalidad fue del 50% al 60% en los lactantes con infección diseminada tratados con aciclovir o vidarabina.⁵¹⁷ En cambio, no se registraron muertes en los lactantes con enfermedad limitada a la nariz, los ojos o la boca. El diagnóstico es sugerido por el desarrollo de lesiones vesiculares cutáneas, pero éstas pueden estar ausentes en el 20% de los pacientes. Los factores de mal pronóstico son la enfermedad diseminada, el estado comatoso en el momento de la internación en el hospital, la coagulación intravascular diseminada o la prematuridad.

Las altas tasas de morbilidad y mortalidad de la enfermedad del lactante han impulsado grandes esfuerzos para diagnosticar la infección materna. En la mayor parte de los casos de herpes simple neonatal, la infección se contrae durante el parto vaginal y puede evitarse por cesárea. Se han ideado complejos protocolos para la detección sistemática en mujeres embarazadas, pero lamentablemente no han funcionado bien. La infección materna suele ser asintomática en el momento del parto, aunque el riesgo para el niño parece ser bajo si la infección es recidivante y existen anticuerpos maternos contra el tipo 2. Muchas mujeres no reconocen su primoinfección genital. En un estudio, se detectaron anticuerpos específicos contra herpes simple tipo 2 en 439 de 1 355 mujeres embarazadas sin historia clínica de herpes genital (32%).¹⁶⁷ Se detectó la eliminación asintomática del virus al fin del embarazo y en el parto en 5 de 1 160 cultivos (0,43%). Durante el embarazo, 43 de las mujeres que habían tenido anticuerpos contra el virus tipo 2 reconocieron su primoinfección genital sintomática.

Los esfuerzos para evitar la infección neonatal se han desviado a la evaluación del nivel de anticuerpos en mujeres embarazadas y al examen físico cuidadoso en busca de enfermedad clínica activa en el momento del parto. La comercialización de pruebas fiables para detectar anticuerpos tipospecíficos facilita la identificación de las mujeres expuestas a contraer una primoinfección.³⁵⁹

Las personas con mecanismos de defensa comprometidos están predisuestas a la esofagitis, la traqueobronquitis o la neumonía herpéticas, y a las infecciones diseminadas, entre ellas la hepatitis. Las infecciones por herpes simple pueden ser necrosantes y sugerir una etiología bacteriana si no se encuentran los cuerpos de inclusión característicos o no se realizan cultivos para virus.³⁷² La inmunosupresión no es un requisito

previo para la infección de las vías respiratorias bajas o la esofagitis. Los riesgos de infección respiratoria baja incluyen la intubación, lo que sugiere que la patogenia puede ser similar a la de la neumonía bacteriana: la aspiración de secreciones orofaríngeas contaminadas.⁴⁰⁸ Los pacientes con quemaduras extensas tienen riesgo de infección, tanto de la piel desnuda como de las vías respiratorias bajas.¹⁵⁹

La infección ocular consiste en una conjuntivitis, que puede estar acompañada por fiebre, fotofobia y linfadenopatía regional. La queratitis herpética, que tiene un aspecto ramificado o dendrítico, es la segunda causa en frecuencia de ceguera corneal (después de los traumatismos) en los Estados Unidos.

El virus del herpes simple es una de las causas virales de faringitis y amigdalitis, por lo general como primoinfección. La mucosa puede estar ulcerada y las lesiones limitarse a la pared posterior de la faringe.¹⁸⁹ La amigdalitis necrosante puede simular un absceso bacteriano periamigdalino. Se ha informado la presencia de cistitis hemorrágica como parte de la infección diseminada¹²¹ y puede haber proctitis herpética en varones homosexuales.¹⁹³

CITOMEGALOVIRUS

El citomegalovirus (CMV) es un miembro de una familia de virus relacionados que son específicos para especies determinadas.³⁵¹ El CMV del ratón no infecta al hombre y viceversa. Aislado por primera vez en ratones por Margaret Smith, luego se aisló el virus humano en tejido de glándulas salivares de un lactante infectado. Esa autora reconoció la especificidad de especie de estos virus, aunque los revisores de su publicación, inicialmente rechazada, no lo aceptaron.⁵¹⁰ El aislamiento del virus humano fue publicado en forma simultánea por Smith, Weller y Rowe. Con la generosidad de un caballero, que llegó a ganar un premio Nobel, Weller cedió a la doctora Smith el mérito de la prioridad en el descubrimiento. El CMV es un patógeno oportunista que puede causar infecciones persistentes, incluso de por vida.³⁸⁶ Se lo ha reconocido desde hace muchas décadas como patógeno del hombre por la peculiar citopatología que produce (véase lámina en color 23-1D). Al principio, los investigadores consideraron el CMV un protozoo invasor de los tejidos humanos.²⁵⁸

Este virus se asocia con los leucocitos y puede ser transmitido por transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos. Cuando se detecta por medio de anticuerpos monoclonales o sondas genéticas, se concentra en la fracción de neutrófilos de la capa rica en leucocitos, más que en la fracción mononuclear. El virus replicante se halla en ambas fracciones, de manera que el material para cultivo debe incluir todos los leucocitos. También se excreta por la saliva y el semen. La transmisión venérea es sugerida con firmeza por la existencia de grupos de casos relacionados epidemiológicamente. El CMV puede transmitirse de la madre al hijo a través de la placenta, por las secreciones cervicales durante el parto o por la leche.

La variedad de enfermedades infecciosas causadas por este patógeno es amplia y abarca infecciones congénitas y neonatales, mononucleosis con anticuerpos heterófilos negativos, hepatitis, neumonía e infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos.³⁸⁶ Al mismo tiempo, puede ser muy difícil decidir si un paciente determinado tiene una enfermedad inducida por CMV o sólo tiene una infección persistente, debido a que el virus replicante se encuentra en órganos y líquidos corporales que son estériles en ausencia de enfermedad clínica. Se han observado múltiples variantes genéticas de CMV en un mismo paciente infectado.⁹⁷

Resulta bastante fácil demostrar la infección por cultivo del virus o por la presencia de anticuerpos específicos. A diferencia de la demostración de una infección producida por CMV, la comprobación de que una determinada enfermedad es causada por el CMV suele requerir biopsia y examen histológico. Aun así, no siempre es fácil confirmar con certeza el diagnóstico. Por ejemplo, algunos pacientes excretan CMV en la orina durante años sin estar enfermos, sobre todo los que tienen infección congénita. El aislamiento de CMV en lavados broncoalveolares se correlaciona mal con la neumonía producida por CMV,⁴²⁵ que debe diagnosticarse finalmente por consideración de todos los datos en conjunto, a menudo incluidos los de las biopsias pulmonares. La detección de anticuerpos séricos es el método más sensible para determinar si el paciente ha estado infectado alguna vez por CMV. Sin embargo, la presencia de anticuerpos es de poca utilidad para determinar si el paciente está actualmente infectado o hay una enfermedad producida por CMV, aunque existe la presunción de que el virus puede persistir en ciertos tejidos o células del huésped. La determinación cuantitativa del antígeno o del DNA virales es lo que mejor diferencia la infección de la enfermedad.

Un virus latente o uno clínicamente silencioso puede reactivarse para causar enfermedad. Un paciente puede experimentar enfermedad por CMV después de la reactivación de una infección latente o después de la primera exposición al virus. La diferencia es importante desde el punto de vista del pronóstico, ya que las primoinfecciones son clínicamente más graves y tienen mayores probabilidades de causar enfermedad sintomática en un recién nacido.

Algunas situaciones pueden ser manejadas para aumentar las ventajas contra las primoinfecciones. Por ejemplo, los receptores de trasplantes pueden ser controlados de tal forma que los pacientes seronegativos no reciban sangre o un órgano provenientes de dadores seropositivos.

La infección viral de personas antes sanas suele manifestarse como un síndrome de mononucleosis autolimitado. Como ocurre en el caso de la infección por virus de Epstein-Barr, ciertas evidencias indican que en la mononucleosis causada por CMV los síntomas son producidos por linfocitos citotóxicos, que intentan eliminar las células infectadas por CMV.

El espectro de enfermedades es mucho más amplio en los pacientes inmunodeprimidos, de acuerdo con la magnitud de la inmunosupresión. En los pacientes moderadamente inmunodeprimidos, como los receptores de un trasplante renal, la neumonía por CMV es una manifestación frecuente. Cuando la inmunosupresión es más extrema y extensa, puede haber una infección fulminante. Los receptores de trasplantes de corazón, hígado o médula ósea, o los pacientes infectados por el HIV pueden presentar hepatitis o complicaciones antes insólitas, como la perforación de una pared intestinal infectada.

Otra complicación que se observa en los receptores de trasplantes de órganos es la asociación de la infección por CMV con el rechazo del trasplante renal o cardíaco. La patogenia de este proceso no está aclarada. Aunque se describió una glomerulopatía en riñones trasplantados de pacientes infectados por CMV, la anatomía patológica de los riñones rechazados sugiere casi siempre un proceso inmunitario más que infeccioso. Más aún, las evidencias señalan que los pacientes que reciben un trasplante de corazón y están infectados por CMV sufren más infecciones sobreagregadas por bacterias y hongos que los trasplantados que no tienen CMV.

La mayoría de las infecciones congénitas y neonatales son asintomáticas, pero algunos lactantes que parecen sanos al nacer presentan síntomas sutiles. En el otro extremo se encuen-

tra la infección diseminada con enfermedad multiorgánica y anomalías congénitas graves, como la microcefalia. La frecuencia de la transmisión intrauterina del CMV se ha estimado en un 20% a 40% y el riesgo de un resultado final adverso es mayor durante la primera mitad del embarazo.

VIRUS DE EPSTEIN-BARR

El virus de Epstein-Barr (EBV) es la principal causa de mononucleosis infecciosa.⁴¹⁹ Este virus versátil origina enfermedades que varían desde la infección aguda autolimitada hasta las neoplasias malignas. El síndrome de mononucleosis consiste en fiebre, malestar general, faringitis exudativa, linfadenopatías y linfocitos atípicos circulantes en sangre periférica. La esplenomegalia es habitual y la rotura del bazo es una complicación grave. La hepatitis aguda también puede ser parte del síndrome.

El virus, descubierto durante estudios acerca del linfoma de Burkitt en África y después asociado con la mononucleosis infecciosa,⁴¹⁹ ingresa en el organismo por infección del epitelio faríngeo. Sin embargo, su célula diana fundamental son los linfocitos B circulantes, a los que infecta y luego inmortaliza. El linfoblasto B activado, junto con el EBV que transporta, madura a un linfocito de memoria de larga vida en los centros germinales de los ganglios linfáticos.⁴⁸¹ El resultado de esta interacción es una estimulación policlonal del sistema inmunitario humoral, que produce una variedad de anticuerpos contra muchos antígenos. Al mismo tiempo, el sistema inmunitario celular es estimulado para eliminar la infección por EBV. Lo que se ve en sangre periférica como linfocitos atípicos son los linfocitos T activados. El círculo se cierra cuando el virus se excreta, a través de la mucosa bucal, por la saliva. En los niños pequeños la infección suele ser asintomática o con pocos síntomas, y la prueba diagnóstica de anticuerpos heterófilos es casi siempre negativa.

Si ocurre la integración del genoma del EBV en cierto tipo de células, puede producirse una neoplasia en lugar de una infección aguda. El crecimiento descontrolado del EBV en pacientes con infección por el HIV, que han perdido el control regulador de la inmunidad celular, puede conducir a un aumento de los tumores causados por el EBV. La mayoría de estos tumores son de la estirpe de los linfocitos B, como el linfoma de Burkitt y el linfoma primitivo de cerebro, pero el carcinoma nasofaríngeo también se ha asociado estrechamente con el EBV. Se ha adjudicado además la infección por EBV un subgrupo de carcinomas gástricos y de colon. Otros diversos procesos son la neumonía linfocítica intersticial y el síndrome hemofagocítico. Establecer la asociación con un virus persistente o latente como el EBV no es suficiente para probar una relación causal, prueba que puede provenir sólo de la asociación reiterada y del análisis molecular cuidadoso. La relación entre el EBV y los linfomas parece ser especialmente compleja.⁴⁸¹

A mediados de la década de 1980 se sugirió que un síndrome mal definido de fatiga crónica podría representar una infección crónica por el EBV. Ésta existe y puede ser penosa, pero el síndrome inespecífico de fatiga crónica no parece estar relacionado con el virus.¹¹⁵

Las células que mejor permiten la replicación viral, con producción de partículas infecciosas, son las células epiteliales de la orofaringe. La saliva de los pacientes con infección crónica o con enfermedad aguda contiene virus viable, que puede demostrarse por cocultivo con linfocitos periféricos normales. En forma alternativa, los linfocitos de sangre periférica de individuos infectados pueden cultivarse en presencia de un agente que elimine los linfocitos T, como la ciclosporina. El diagnós-

tico de las manifestaciones neoplásicas puede hacerse por demostración molecular de que el virus se ha integrado al genoma de las células malignas. Las células de los tumores producidos por el EBV pueden cultivarse como líneas celulares inmortalizadas *in vitro*.

VIRUS DE LA VARICELA-ZÓSTER

El virus de la varicela-zóster (VZV) causa varicela como primoinfección.¹³ El virus puede permanecer latente en los ganglios sensitivos de la médula espinal durante muchos años antes de reactivarse y producir enfermedad por segunda vez. La enfermedad reactivada recuerda la varicela, pero se limita al dermatoma inervado por el nervio infectado. La enfermedad de reactivación se conoce como zona o herpes zóster (culebrilla). El dermatoma más problemático es la rama oftálmica del trigémino, ya que, como parte de la enfermedad de reactivación, puede haber una infección destructiva de la córnea. Antes de reconocer la identidad del proceso, el virus de la varicela se denominaba varicela y el de la culebrilla, herpes zóster.

El virus de la varicela-zóster provoca una considerable incomodidad en las personas sanas y puede causar neumonía, pero en personas inmunosuprimidas la enfermedad puede transformarse en una infección diseminada potencialmente mortal. Las mujeres embarazadas tienen mayor riesgo de sufrir varicela grave y los recién nacidos dentro de los 4 días de la infección materna tienen grandes riesgos, ya que aún no se han desarrollado anticuerpos maternos. El riesgo de embriopatía para el feto después de la infección materna con VZV en las primeras 20 semanas de embarazo es de alrededor del 2%.

Según el conocimiento convencional la inmunidad contra la varicela es de por vida y toda enfermedad posterior es un recrudecimiento. Sin embargo, la existencia de reinfecciones ha sido sugerida por cuidadosos estudios serológicos de personas inmunes en una casa con un caso reciente de varicela.¹⁴ Los convivientes que tenían anticuerpos preexistentes permanecieron en buen estado de salud, pero sus títulos de anticuerpos aumentaron, lo que indica infección subclínica.

Existe gran preocupación en los hospitales acerca de la seguridad de los pacientes inmunodeprimidos que entran en contacto con una persona infectada. La exposición puede tener lugar inadvertidamente, ya que los pacientes con VZV son infecciosos poco antes de la aparición de la erupción cutánea característica. Las medidas para reducir los riesgos incluyen el uso de personal sanitario inmune para la atención de pacientes inmunosuprimidos y la limitación de visitas. La administración inmediata de inmunoglobulina antizóster después de una exposición inadvertida tiene efecto protector.

HERPESVIRUS HUMANOS 6 Y 7

Un nuevo agregado a la lista de patógenos del grupo herpes es el herpesvirus humano 6 (HHV-6). Este virus fue aislado por primera vez en pacientes con enfermedades linfoproliferativas y se lo denominó virus B-linfotrópico humano.³⁹² El virus tiene la estructura morfológica de un herpesvirus, pero no está relacionado genéticamente con los cinco herpesvirus identificados antes. Por eso, fue denominado herpesvirus humano 6. Existen en la actualidad dos subtipos reconocidos, designados A y B; el subtipo B es el que predomina. Este virus comparte con el EBV la capacidad de reproducirse en los linfocitos humanos. A diferencia del EBV, que infecta los linfocitos en forma latente y que no se reproduce activamente en las células, el HHV-6 parece causar sólo infecciones productivas en linfocitos humanos

(las células infectadas producen partículas virales infecciosas maduras).

En 1990, se aisló un nuevo virus en los linfocitos T CD4+ de un individuo sano, utilizando técnicas que producen la activación de linfocitos T. El virus, denominado herpesvirus humano 7 (HHV-7), es diferente pero está estrechamente relacionado con el HHV-6. Los dos virus no tienen inmunidad cruzada.

El HHV-6 y el HHV-7 causan una enfermedad común de la infancia denominada exantema súbito (también conocida como roseola infantil, enfermedad de Duke o cuarta enfermedad). El exantema súbito se observa en los niños entre los 6 meses y los 3 años de edad. Casi todos los niños mayores de 13 meses tienen anticuerpos contra el HHV-6. Los anticuerpos contra el HHV-7 aparecen un poco más tarde.

El exantema súbito comienza con fiebre brusca, seguida de una erupción cutánea cuando desaparece la fiebre, al tercero o cuarto día. En un 8% de los pacientes con infección aguda se observan convulsiones febriles. Es muy improbable que exista esta infección en un niño afebril. La enfermedad suele resolverse sin secuelas, pero en raras ocasiones la enfermedad es grave. En los adultos inmunosuprimidos, el HHV-6 ha causado enfermedades graves después del trasplante de médula ósea y de órganos sólidos en pacientes infectados por el HIV. Se ha sugerido que estos virus son los agentes etiológicos del síndrome de fatiga crónica, de la esclerosis múltiple y de enfermedades neoplásicas, pero el tema no está resuelto. La frecuente reactivación de los herpesvirus durante el curso de otras enfermedades complica la determinación definitiva de un papel etiológico.

HERPESVIRUS HUMANO 8

El último agregado al grupo de herpesvirus linfotrópicos es el herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi, denominado herpesvirus humano 8 (HHV-8). Como su nombre lo indica, el virus fue detectado por primera vez en tejidos provenientes de sarcoma de Kaposi en pacientes infectados por el HIV utilizando técnicas moleculares.³⁵⁴ Las investigaciones posteriores demostraron que se encontraban secuencias genéticas virales en varios tipos clínicos de sarcoma de Kaposi: el que se presenta en los pacientes con SIDA, el sarcoma de Kaposi clásico no relacionado con la infección por el HIV y el sarcoma de Kaposi de varones homosexuales que no están infectados por el HIV. Las secuencias han sido identificadas en linfomas de cavidades corporales relacionados con el SIDA, que también contienen secuencias genéticas del EBV. Por último (quizá), se han encontrado secuencias del HHV-8 en tejidos de la enfermedad multicéntrica de Castleman, que es una hiperplasia linfoide atípica que puede progresar al linfoma o al sarcoma de Kaposi. Las secuencias también se encuentran en tejidos no neoplásicos de pacientes infectados por el HIV y con sarcoma de Kaposi.

VIRUS B

En la década de 1930, se aisló un virus del grupo herpes en un paciente que sufrió una enfermedad neurológica mortal después de haber sido mordido por un mono. Casi en el mismo momento, Sabin aisló un virus en otro paciente que desarrolló una mielitis transversa después de la mordedura de un mono. Este autor denominó al aislamiento virus B por el nombre del paciente afectado. También ha sido denominado herpesvirus simiano, que es en cierta forma un nombre que lleva a confusión, dado que en los monos se encuentran diversos virus herpéticos. El nombre taxonómico recomendado es cercopithecine herpesvirus 1. Se han documentado por lo menos 25 casos

de infección por el virus B en seres humanos, de los cuales 16 han sido mortales.⁵²⁰

El virus B tiene la rara característica de cruzar la barrera entre especies. Es autóctono en los monos del Viejo Mundo, como *Macaca mulatta* y *Macaca fascicularis*, en los que causa una infección latente. Se han informado infecciones humanas localizadas, pero la mayoría son generalizadas y graves. La forma habitual de infección es la mordedura de un animal, pero se ha publicado la infección después de una lesión por pinchadura con una aguja. A menudo aparece una erupción vesicular alrededor de la mordedura, seguida de linfadenopatía regional y fiebre. La diseminación sistémica se acompaña por encefalitis, mielitis transversa o necrosis visceral.

Dos acontecimientos recientes han renovado el interés acerca del virus B. El primer caso documentado de transmisión interhumana se registró como parte de un grupo de casos en un establecimiento de investigación. El segundo acontecimiento fue el descubrimiento de que células de riñón de mono comercializadas por laboratorios de diagnóstico estaban contaminadas con el virus B. No se registraron infecciones humanas, pero las células fueron retiradas del mercado.⁵¹³ La capacidad del virus B de replicarse en monocapas de riñón de mono se conoce desde hace años. De hecho, el estrés del procesamiento de los riñones puede estimular la activación del virus B latente. El efecto citopático del virus consiste en el agrandamiento y la fusión celulares, que se puede extender a toda la monocapa. Pueden verse cuerpos de inclusión tipo A de Cowdry, idénticos a los del virus del herpes simple o del VVZ en preparados teñidos de células. El subcultivo a otras células de riñón de mono o a células de riñón de conejo (de uso habitual para el aislamiento de virus del herpes simple) transmite el virus.

Adenovirus

Los adenovirus fueron reconocidos originalmente cuando se observó degeneración espontánea en cultivos de tejido de origen adenoideo. Se denominaron agentes de degeneración adenoideo, adenoideo-faringoconjuntivales y productores de enfermedad respiratoria aguda.⁴⁵⁰ Estos virus pueden estar presentes en la faringe y en la heces sin causar enfermedad. La designación de un agente infeccioso como agente etiológico debe efectuarse con cuidado, de manera de no confundirse con una aso-

ciación fortuita. Por ejemplo, en algún momento los adenovirus se consideraron causantes del síndrome de la tos ferina, debido a que fueron aislados en ausencia del agente bacteriano habitual, *Bordetella pertussis*. El papel de los adenovirus en el síndrome pertussis es motivo de discusiones. Se ha sugerido que, por tener requerimientos nutricionales especiales, *B. pertussis* puede no haberse aislado en muchos casos de tos convulsa, en tanto que los adenovirus representan aislamientos accidentales o copatógenos.²⁴⁴

La enfermedad por adenovirus puede ser esporádica o presentarse en epidemias. Estos virus causan alrededor del 5% de las enfermedades respiratorias agudas en los niños menores de 5 años y pueden ser responsables del 10% de las neumonías de la infancia. Producen una faringitis exudativa que puede simular la enfermedad por estreptococos β -hemolíticos del grupo A. Los adenovirus pueden causar otitis, faringitis y gastroenteritis. Ciertos serotipos se asocian con conjuntivitis aguda, con faringitis o sin ella. Las infecciones por adenovirus del aparato gastrointestinal ya fueron tratadas, junto con otras causas de gastroenteritis viral. Las principales infecciones causadas por adenovirus y sus serotipos asociados se resumen en el cuadro 23-12.

Poxvirus

Los poxvirus son un grupo heterogéneo.¹⁶⁸ La mayoría de sus integrantes son patógenos para los animales, pero algunos también pueden infectar a los seres humanos. El rey del grupo de los poxvirus era el virus variola, agente etiológico de la viruela y el único miembro del grupo que infectaba sólo a los seres humanos. En la actualidad ha pasado de la categoría de especie en peligro a la de especie extinguida.¹⁴⁶ Después de que se registró el último caso natural, las reservas de virus se conservaban sólo en los Estados Unidos y en la Unión Soviética; sin embargo, tras la disolución de esta última, existe la posibilidad de que se hayan dispersado fuera de Moscú. Se ha secuenciado el genoma del virus variola y de otros cinco poxvirus.³⁶²

El reconocimiento de que el virus variola representa una amenaza importante como agente de bioterrorismo ha renovado el interés por estos virus. La población mundial actual es sensible en su mayoría o tiene sólo inmunidad parcial y los médicos no están familiarizados con la presentación clínica y el diagnóstico. Se han vuelto a examinar los registros de brotes

Cuadro 23-12 Infecciones causadas por adenovirus		
SÍNDROME	GRUPOS ETARIOS	SEROTIPOS
Faringitis aguda febril	Niños pequeños	1, 2, 3, 5, 6, 7
Fiebre faringoconjuntival	Niños pequeños y adolescentes	3, 7, 14
Enfermedad respiratoria aguda	Reclutas militares	3, 4, 7, 14, 21
Neumonía	Niños pequeños	1, 2, 3, 7
	Reclutas militares	4, 7
Queratoconjuntivitis epidémica	Todos	8, 11, 19, 37
Cistitis hemorrágica aguda	Niños pequeños	11, 21
Gastroenteritis	Niños pequeños	39, 40
Meningoencefalitis	Niños y pacientes inmunodeprimidos	1, 2, 5
Hepatitis	Niños y pacientes inmunodeprimidos	1, 2, 5
Adaptado de la referencia ²⁴⁴ .		

históricos, como una epidemia ocurrida en Boston a principios del siglo XX, para actualizar los datos.^{5,39} La vacunación con el virus vaccinia, uno de los logros señeros de la medicina moderna, se abandonó en 1970 debido a los efectos secundarios bien conocidos de la vacuna.⁴¹ Sin duda, el cambio de circunstancias ha modificado el balance costos-beneficios de la vacunación,^{169,170} pero hay discusiones respecto de las medidas adecuadas para tomar.^{42,321} Se ha demostrado la presencia de anticuerpos residuales en individuos previamente inmunizados, pero no está aclarada su eficacia.¹⁷³

Los ortopoxvirus de los animales, como el pox vacuno y los virus del pox simiano, pueden infectar en ocasiones al hombre. Estas infecciones se parecen clínicamente a la viruela. El riesgo del pox simiano ha adquirido nuevas dimensiones después del reconocimiento de que algunos casos de infección humana se han adquirido de perritos de la pradera usados como mascotas.⁴¹² Las mascotas pueden haberse infectado de roedores africanos importados, que se sabe son sensibles al virus. El diagnóstico diferencial de todas las infecciones causadas por poxvirus incluye el virus de la varicela-zóster.³⁴⁶ Por lo tanto, el apoyo del laboratorio es esencial toda vez que surja la posibilidad de que se trate del virus variola.

El origen del virus vaccinia no está aclarado. Tiene muchas características de una especie diferente, pero puede haberse originado por mutación o recombinación de alguno de varios virus posibles (entre ellos, el cowpox).

Los miembros de otros dos géneros, *Parapoxvirus* y *Yatapoxvirus*, son patógenos para los animales, pero pueden infectar a los seres humanos. Los tanapoxvirus causan infecciones en zonas de África, pero han producido enfermedad en viajeros después de regresar de una zona endémica.¹²⁴

El virus del molusco contagioso, el único miembro del género *Molluscipoxvirus*, provoca una lesión cutánea característica; como el virus variola, infecta sólo a los seres humanos.¹⁴⁶

Los parapoxvirus incluyen agentes que producen enfermedades de las ovejas (virus orf o de la dermatitis pustulosa contagiosa) y en las vacas (nódulo de los ordeñadores o pseudocowpox). También causan infecciones localizadas en las personas expuestas profesionalmente a los virus. Es improbable aislar poxvirus en el laboratorio clínico.

Papovavirus

Los papovavirus, un grupo heterogéneo de virus de DNA, están constituidos por los virus del papiloma (Pa), polioma (PO) y el virus vacuolante (VA). Los subgrupos difieren mucho en su biología. Los virus vacuolantes son autóctonos de los animales y los microbiólogos pueden encontrarlos sólo como agentes contaminantes en cultivos de tejido de células de riñón de mono.

VIRUS DEL PAPILOMA

Los virus del papiloma humano (HPV) producen verrugas comunes, verrugas venéreas de transmisión sexual y tumores de los aparatos respiratorio, intestinal y genital. La naturaleza viral de las verrugas se conoció a comienzos del siglo pasado, cuando fueron transferidas por medio de filtrados libres de células, y Shope definió el papilomavirus del conejo como agente causal de papilomas en 1933.³¹⁵ El estudio del HPV estuvo detenido hasta que se desarrollaron las técnicas moleculares necesarias para la tarea en la década de 1970.

Se describieron más de 60 tipos genéticos de HPV. Existen fuertes asociaciones entre ciertos genotipos y las lesiones clí-

nicas (cuadro 23-13). La verruga común es la lesión más frecuente, pero la mayor atención se ha dirigido a las infecciones genitales, incluida su asociación con neoplasias. Las parejas sexuales de los pacientes infectados por el HPV también se infectan con frecuencia por el mismo genotipo.

La asociación del HPV con la neoplasia de cuello uterino se ha determinado a partir de muchos estudios. Aunque el virus representa el mayor riesgo, otros factores no definidos parecen necesarios para el desarrollo del cáncer. Más que una violenta transición del epitelio normal al neoplásico en el cuello uterino, existe un espectro continuo, reconocido como grados de gravedad creciente de la neoplasia intraepitelial cervical. El estadio final del proceso es el desarrollo de un tumor maligno franco, el carcinoma invasor, que puede ser glandular o escamoso. En forma similar, existe una gradación en la expresión de los genes y antígenos del HPV. En el epitelio normal las células de la capa basal se diferencian de manera progresiva para formar epitelio plano no queratinizado en la superficie. A medida que el epitelio cervical cambia de apenas displásico a intensamente displásico, se observan las siguientes alteraciones: 1) las células se hacen menos diferenciadas en todo el epitelio, 2) el contenido cromosómico de los núcleos se transforma progresivamente en anormal, 3) la expresión de productos genéticos del HPV (antígenos) es menos intensa y 4) la expresión de los genes de HPV se vuelve cada vez más difícil de demostrar. Una característica de la célula infectada por el HPV es la coilocitosis, un halo perinuclear del epitelio escamoso acompañado por atipia nuclear, aunque esta alteración no se presenta en todas las células infectadas. El aspecto de la atipia coilocítica en células cervicales exfoliadas se muestra en la figura 23-4.

La biología celular del HPV apoya su papel fundamental en el desarrollo de neoplasias.³¹⁵ Los tipos virales asociados más estrechamente con el cáncer cervical, en particular el HPV-16, son capaces de transformar células en cultivo de manera que éstas pierden sus mecanismos normales de control de crecimiento. El DNA de estos tipos se integra al DNA del huésped, en un caso cerca de los oncogenes celulares. La integración viral puede producir reordenamiento cromosómico y conducir a la diferenciación anormal in vitro. Zur Hausen ha adelantado la hipótesis de que la neoplasia cervical es el resultado de una falla de un mecanismo primordial de vigilancia celular que ha sido diseñado para controlar genomas virales persistentes.⁵³⁹

Se ha demostrado DNA de papilomavirus en el epitelio cervical normal adyacente a verrugas genitales y a tumores malignos. La omisión de extirpar todo el tejido infectado puede dar lugar a recidivas. También puede demostrarse DNA de HPV en el 5% al 10% de las mujeres con frotis o biopsias cervicales normales. La infección puede ser transitoria; la asociación de los genotipos de alto riesgo con las neoplasias cervicales es muy evidente cuando el DNA del HPV está siempre presente.

Las recomendaciones consensuadas nacionales de los Estados Unidos para el tratamiento de las pacientes con riesgo de contraer neoplasia de cuello uterino, que evolucionan de modo continuo, incluyen parámetros morfológicos (citología exfoliativa cervical) y determinantes virales (detección de HPV). El enfoque actual para clasificar la citología de endocervix es el Sistema Bethesda.⁴⁶⁰ En el cuadro 23-14 se resumen las recomendaciones actuales para tratar a las pacientes con anomalías.⁵²⁷

El papel del laboratorio en el manejo de la enfermedad endocervical tiene muchas facetas.¹ Las recomendaciones para el manejo de la enfermedad por HPV están en continua evolución. El American College of Obstetricians and Gynecologists

Cuadro 23-13 Asociación de papilomavirus humanos (HPV) seleccionados con enfermedades clínicas

TIPO DE VIRUS	ENFERMEDAD CLÍNICA	POTENCIAL NEOPLÁSICO
HPV-1	Verruga plantar profunda	No descrito
HPV-2	Verruga común	No descrito
	Verruga en mosaico	
	Lesiones labiales	
HPV-3	Verruga plana	No descrito
HPV-4	Verruga común	No descrito
HPV-5	Placas de la epidermodisplasia verruciforme	Puede desarrollarse carcinoma de células planas en zonas expuestas al sol
HPV-6	Genital: condiloma exofítico; condiloma plano; condiloma gigante	Asociación débil, en especial en la vulva
	Papilomas respiratorios	
	Papilomas conjuntivales	
HPV-7	Verruga común de los carniceros	No descrito
HPV-11	Véase HPV-6	Véase HPV-6
HPV-13	Hiperplasia epitelial focalizada de la cavidad bucal	No descrito
HPV-16	Anogenital: papulosis de Bowen; condiloma plano	Asociación estrecha en el cuello uterino
		Asociación moderada en vagina, vulva, ano y pene
		También se encuentra en aparato respiratorio, incluso laringe, amígdalas y cavidad bucal
HPV-18	Genital: condilomas planos	Asociación estrecha en el cuello uterino; es infrecuente en lesiones precursoras
HPV-31	Genital: condilomas planos	Asociación estrecha con el carcinoma de cuello uterino
HPV-32	Hiperplasia epitelial focalizada de la cavidad bucal	No descrito
HPV-33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Genital	Asociación moderada con el carcinoma de cuello uterino
HPV-45	Genital	Asociación estrecha con el carcinoma de cuello uterino

Adaptado de la referencia³¹⁵.

sugiere la opción de efectuar citología y pruebas para HPV en combinación para mujeres de 30 o más años de edad; si ambas pruebas son negativas, sólo es necesario repetir la detección sistemática cada 3 años.

VIRUS DEL POLIOMA

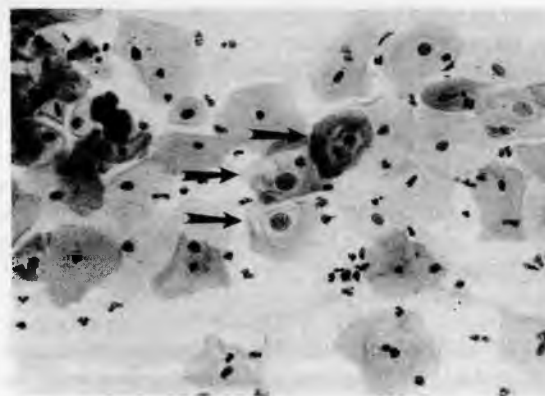
El más importante de los virus del polioma humanos es el virus JC, que causa una encefalitis destructiva (leucoencefalo-

patía multifocal progresiva) en pacientes inmunodeprimidos.³²³ El SV40 (virus simiano 40) también produce la misma enfermedad y constituye otro ejemplo de un virus simiano que atraviesa la barrera de las especies. El aspecto histológico de la leucoencefalopatía multifocal progresiva, como los cuerpos de inclusión virales intranucleares, es diagnóstico.

Los poliomavirus son reactivados con frecuencia en los receptores de trasplantes, casi siempre mucho después del trasplante que otros virus humanos latentes. El virus JC y el virus



A



B

Figura 23-4 Tinción de Papanicolaou. (A) Células epiteliales planas cervicales normales exfoliadas. El núcleo es pequeño y compacto y el citoplasma es abundante en estas células epiteliales maduras, queratinizadas. (B) Atipia coilocítica. Los núcleos de algunas de estas células superficiales se encuentran agrandados, con cromatina gruesa y agrumada, y existe una zona pálida o aclaramiento del citoplasma (flecha) (250x).

Cuadro 23-14 Clasificación de Bethesda de la citología cervical

ANOMALÍA CITOLÓGICA	ACTITUD RECOMENDADA
Negativo para lesión o tumor maligno epiteliales	Continuar con las pruebas citológicas periódicas
Células planas atípicas de importancia indeterminada (ASC-US) ^a	Realización de pruebas citológicas rápidas O BIEN Pruebas para HPV ^b O BIEN Examen colposcópico
Células planas atípicas, no se puede descartar una lesión intraepitelial plana de alto grado (ASC-H)	Examen colposcópico
Lesión intraepitelial plana de bajo grado (LSIL)	Examen colposcópico
Lesión intraepitelial plana de alto grado (HSIL)	Examen colposcópico
Carcinoma de células planas	Confirmación por biopsia

^a Consultar las referencias para ver las recomendaciones en circunstancias especiales: mujeres posmenopáusicas, mujeres inmunosuprimidas y embarazo.
^b Se recomienda hacer pruebas para HPV si hay material disponible de la visita inicial (evitar los exámenes pélvicos repetidos).
 Adaptado de las referencias^{460,527}.

BK son los que se encuentran más a menudo. Ambos se han asociado con cistitis hemorrágica grave en los receptores de trasplante de médula ósea.

Parvovirus

Como su nombre lo indica, los parvovirus son muy pequeños; son fuera de lo común en el sentido que contienen DNA de cadena simple. Se ha demostrado que el único parvovirus humano, conocido como B19, causa una enfermedad febril común de la infancia con erupción cutánea. El eritema infeccioso también se conoce como quinta enfermedad (la quinta enfermedad de la infancia después del sarampión, la rubéola, la varicela y la roséola).^{35,532} Se caracteriza por fiebre y una erupción cutánea característica en “mejillas abofeteadas” en los niños pequeños. La mayoría de las personas son inmunes al llegar a la edad adulta, pero las personas sensibles pueden experimentar artritis o artralgias. Este patrón de enfermedad leve con erupción cutánea en la infancia y de artritis grave en la edad adulta recuerda al virus de la rubéola. La erupción cutánea del eritema infeccioso es maculopapular, pero se ha publicado una lesión vesicopustulosa en un adulto.

El parvovirus B19 tiene afinidad por los precursores inmaduros de los eritrocitos. El receptor para el parvovirus B19 existente sobre los eritrocitos humanos es el antígeno P y los individuos que carecen de este antígeno son naturalmente resistentes a la infección. Lamentablemente, muy pocos individuos carecen de antígeno P eritrocitario. El parvovirus B19 puede causar anemia transitoria en las personas sanas y anemia grave crónica o crisis aplásicas en los pacientes con tumores malignos o hemoglobinopatías. Si una mujer embarazada sufre una primoinfección con parvovirus, puede haber una eritroblastosis fetal con hidropesía fetal. En este caso el virus produce una anemia crónica grave, en tanto que en la eritroblastosis inmu-

nitaria (enfermedad por Rh) los que causan el daño son anticuerpos dirigidos contra los eritrocitos fetales. Un síndrome hemofagocítico viral en niños y adultos se ha asociado con el parvovirus humano. Se ha demostrado la transmisión de la infección por parvovirus de pacientes con grandes cantidades de virus a personal sanitario.

Las manifestaciones clínicas de la infección humana por parvovirus durante una epidemia en Cádiz, España, incluyeron manifestaciones hematológicas en el 13,9% de 43 pacientes, lesiones dermatológicas en el 53,4%, artralgias o artritis en el 20,9% e infección durante el embarazo en el 7% de los pacientes (dos de estas mujeres sufrieron aborto). La fiebre y las adenopatías fueron los síntomas de presentación en el 37% de los casos.¹⁷⁵

Virus de las hepatitis

Muchos virus pueden causar daño infeccioso en el hígado. El EBV y el CMV producen en ocasiones hepatitis sintomática como parte del síndrome de mononucleosis. Los virus de las hepatitis primarias son un grupo heterogéneo. La “sopa de letras” de las hepatitis se resume en el cuadro 23-15. Se describieron varios otros virus como posibles agentes de hepatitis, pero la evidencia a favor de su papel como agentes etiológicos no es concluyente; estos virus son el virus de la hepatitis G (o variante GB del virus de la hepatitis C, un miembro de la familia *Flavoviridae*³¹²), así como los virus TT y SEN, ambos miembros de la familia *Circoviridae*. Aunque no se ha demostrado que el virus de la hepatitis G cause hepatitis, los pacientes con infección por el HIV coinfectados por el virus de la hepatitis G 5 a 6 años después de la seroconversión para HIV tienen menos probabilidades de morir que los pacientes infectados por el HIV que no están crónicamente infectados por el virus de la hepatitis G.^{400,521}

VIRUS DE LA HEPATITIS A

El virus de la hepatitis A causa hepatitis infecciosa esporádica y epidémica. La enfermedad se conoce desde la antigüedad, pero el virus no fue identificado hasta la década de 1970. El virus de la hepatitis A se clasificó inicialmente como enterovirus 72, sobre la base de sus características bioquímicas y físicas. Más tarde, se encontró que tenía notables diferencias con los enterovirus clásicos. En la actualidad ha sido transferido a un nuevo género, los *Hepatovirus*, dentro de la familia *Picornaviridae*.²³⁴ Existen siete genotipos de virus de la hepatitis A; la mayoría de las cepas pertenecen al genotipo I.

El virus de la hepatitis A produce una hepatitis aguda autolimitada. El período de incubación entre la exposición y la enfermedad clínica es corto (< 1 mes). Durante los 7 a 10 días antes de la enfermedad clínica hay replicación no citopatogénica en los hepatocitos, viremia y eliminación fecal de virus infeccioso. Sigue un período de replicación viral con daño del hepatocito, incluida la clásica degeneración “en globo” de las células hepáticas. En este momento se completa prácticamente el período de contagiosidad. La infección por virus de la hepatitis A se transmite raras veces por transfusiones de sangre, ya que hay poco virus en ella y la duración de la viremia es limitada. Se describió en Europa y los Estados Unidos transmisión de la infección a pacientes con hemofilia por el concentrado de factores de la coagulación, que contiene sueros de muchos dadores. La necrosis masiva del hígado y la cirrosis posinfección son raras. La hepatitis crónica y la neoplasia no son complicaciones.

Cuadro 23-15 Principales causas virales de hepatitis

VIRUS	TAXONOMÍA	TRANSMISIÓN	CRONICIDAD	NEOPLASIAS
Hepatitis A	Hepatovirus RNA	Entérica: Agua Alimentos Mariscos	No	No
Hepatitis B	Hepadnavirus	Parenteral: Sangre Sexual Agujas Entérica	Sí	Sí
Hepatitis C	? Togavirus Viriones de 27 nm RNA	Parenteral: sangre	Sí	Sí
Hepatitis D	Virión de 42 a 47 nm RNA			
Hepatitis E	Virión de 27 a 34 nm	Entérica	? No	? No

La hepatitis A se transmite por agua y alimentos contaminados. Los moluscos bivalvos obtenidos de aguas contaminadas han originado numerosos brotes porque suelen ingerirse crudos o cocidos al vapor, a una temperatura que no mata al virus.²⁸⁶ En un brote ocurrido en Shangai, más de 300 000 personas se infectaron después de comer almejas crudas provenientes de aguas contaminadas.²³⁴ También existe la transmisión sexual.²⁶⁸

La transmisión del virus de la hepatitis A, como sucede con la del EBV o la de la poliomielitis, está determinada por las condiciones sanitarias y socioeconómicas. El virus circula con libertad en condiciones de mala infraestructura sanitaria e infecta al hombre a edades tempranas, cuando la infección suele ser asintomática. Los ciudadanos más pudientes escapan a la infección hasta la edad adulta, cuando ocurre hepatitis sintomática.²³⁴ (Véase el texto sobre "Poliovirus" y "Virus de Epstein-Barr").

VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de la hepatitis B es un hepadnavirus de DNA. Causa hepatitis crónica y aguda y un agente etiológico del carcinoma hepatocelular.¹⁷⁴ El virus tiene un largo período de incubación (45-120 días) y se transmite sobre todo por vía parenteral.²³⁵ Hasta que se inició el control de rutina para este virus, la hepatitis B era la causa más frecuente de hepatitis asociada con transfusiones. Otras vías parenterales son la acupuntura y el tatuaje. Se ha encontrado antígeno de hepatitis B en mosquitos, pero la transmisión de la infección por artrópodos no se ha demostrado. Este virus puede transmitirse por contacto sexual y ha producido enfermedad epidémica en varones homosexuales, prostitutas y adictos a drogas intravenosas. Existe la infección perinatal, pero la leche materna no parece ser importante en la transmisión. A diferencia del virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B puede causar una hepatitis fulminante aguda mortal, denominada necrosis hepática masiva. Se ha sugerido que esta manifestación grave es causada por una mutación del virus.

La variedad de mecanismos de transmisión de la infección por virus de la hepatitis B recuerda al HIV. Sin embargo, la concentración de virus de hepatitis B en sangre y líquidos cor-

porales es mucho mayor que la del HIV y, en consecuencia, las infecciones intrahospitalarias son un problema mucho más serio. La hepatitis B ha sido una causa importante de infecciones laborales entre el personal médico, pero la frecuencia ha disminuido mucho por el amplio uso de la vacunación del personal sanitario.

El virus de la hepatitis B es un virus esférico de 47 nm que tiene varios antígenos de importancia para el diagnóstico y la patogenia. Varios genotipos del virus tienen implicaciones clínicas definidas. La infección con el genotipo A tiene una mayor tasa de supervivencia y la enfermedad es menos grave; el genotipo B se encuentra casi siempre en las infecciones que tienen como resultado un carcinoma hepatocelular: el genotipo C produce enfermedad grave; el genotipo D se encuentra en la hepatitis fulminante.²³⁵

Existen tres polipéptidos de envoltura que se conocen como HBsAg (antígeno de superficie de la hepatitis B), HBcAg (antígeno de core de la hepatitis B) y HBeAg (antígeno de la hepatitis B). Este virus no ha sido cultivado in vitro, pero la variedad de antígenos y sus correspondientes anticuerpos proporcionan gran cantidad de elementos para la demostración de la enfermedad clínica. Aunque esto no es absoluto, la presencia de antígeno se correlaciona bien con la presencia de DNA y DNA polimerasa y con la infecciosidad viral. La fascinante historia del descubrimiento del antígeno Australia (conocido como HBsAg) y su relación con la hepatitis ha sido analizada por Blumberg.³³ Sirve como recordatorio de que nadie puede predecir dónde hará impacto la investigación básica. ¿Quién hubiera dicho que un grupo de investigación dedicado a polimorfismos genéticos de proteínas sanguíneas descubriría la clave de una de las causas más importantes de la hepatitis humana?

Por razones no aclaradas, algunas personas que han estado infectadas por el virus de la hepatitis B desarrollan anticuerpos y eliminan el virus de su organismo, en tanto que en otras los antígenos virales continúan circulando. Un subgrupo de estos portadores crónicos desarrollan enfermedad hepática crónica. Otra complicación grave de esta infección es la integración del DNA viral en el genoma del hepatocito y el desarrollo de carcinoma hepatocelular.

VIRUS DE LA HEPATITIS C

Después de que estuvieron disponibles los reactivos diagnósticos para la hepatitis A y B, se hizo evidente que había otras causas de hepatitis asociada con transfusiones.³²⁴ El virus o virus desconocidos se denominaron virus de la hepatitis no A, no B. Gracias a la compleja técnica de la biología molecular, reconocemos ahora la hepatitis C como la causa de la mayoría de los casos de hepatitis no A, no B, asociados con las transfusiones. El virus, que no ha sido cultivado, fue finalmente caracterizado por técnicas moleculares, en lo que constituyó uno de los primeros triunfos de la biología molecular. Resultó sorprendente que el agente recién caracterizado estaba más estrechamente relacionado con un grupo de virus transmitidos por artrópodos; en la actualidad es un género (*Hepacivirus*) de la familia *Flaviviridae*. Los conceptos de las relaciones genéticas entre cepas del virus de la hepatitis C están en evolución. Se describieron al menos 11 genotipos, pero otros investigadores asignan los genotipos a seis clados. Los pacientes infectados por cepas pertenecientes a los clados 1a y 1b (que corresponden a los genotipos 1a y 1b) no responden tan bien al tratamiento con interferón y progresan más rápidamente a la hepatopatía crónica que los individuos infectados por otras cepas. Por lo demás, parece haber pocas diferencias fenotípicas entre cepas genéticamente distintas.

La epidemiología de las infecciones por hepatitis C tiene muchas similitudes con la de la hepatitis B, pero son evidentes ciertas diferencias importantes. La vía más frecuente de transmisión es a través de hemoderivados, como la inmunoglobulina, la cirugía y la adicción a drogas intravenosas. La detección sistemática en los hemoderivados en busca de virus de la hepatitis C ha disminuido sustancialmente el riesgo de transmisión por esta vía. Existe la transmisión sexual, pero la frecuencia es mucho menor que para la infección por hepatitis B. La frecuencia de los anticuerpos contra la hepatitis C entre el personal sanitario en Baltimore fue igual a la de la población general, lo que sugiere que el personal sanitario está expuesto a bajos niveles de virus o que la transmisibilidad no es importante.⁴⁷⁹

La infección aguda por el virus de la hepatitis C suele ser menos grave que la hepatitis B, pero la frecuencia de hepatitis C crónica es alta. El tema ha sido estudiado por Iwarson y cols.²⁵⁵

La mortalidad a largo plazo de los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C es similar a la de los controles, aunque los pacientes infectados tienen un riesgo ligeramente superior de morir por enfermedad hepática. Sin embargo, una vez que se comprueba la infección crónica, el pronóstico es mucho peor. La cirrosis es una complicación importante de la infección crónica. La infección por hepatitis C es un factor de riesgo independiente para el carcinoma hepatocelular después del desarrollo de cirrosis. Las manifestaciones inmunitarias extrahepáticas, como la crioglobulinemia y los factores reumatoideos, son parte importante de la infección por hepatitis C, como lo son para la hepatitis B.

VIRUS DE LA HEPATITIS D

El virus de la hepatitis D, conocido también como agente delta, es un virus de RNA de 35 nm, con doble envoltura que es incapaz de multiplicarse sin el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.¹⁸² El virus delta maduro se recubre a sí mismo con la cubierta del HBsAg antes de infectar otras células. Así, la biología de la hepatitis D está indisolublemente unida a la de la hepatitis B. El virus de la hepatitis D puede causar infección y enfermedad sólo en los pacientes infectados en

forma simultánea por el virus de la hepatitis B o que están produciendo HBsAg por una infección previa. No es sorprendente que la hepatitis D esté concentrada en bolsones de poblaciones con infección por el virus de la hepatitis B, como los adictos a las drogas y los varones homosexuales.

Cuando existe coinfección, la enfermedad clínica es similar a la producida por la hepatitis B y suele ser autolimitada. Cuando el virus de la hepatitis D infecta a un individuo que es portador crónico del virus de la hepatitis B, la enfermedad clínica es mucho más grave, se hace crónica en hasta el 80% de los casos y las tasas de mortalidad pueden aumentar de manera espectacular, hasta alcanzar un 12%.

VIRUS DE LA HEPATITIS E

El agregado más reciente a la sopa de letras de los virus de las hepatitis es un virus lábil de RNA de 27 nm.⁴⁰⁶ El virus de la hepatitis E causa una hepatitis aguda transmisible por vía enteral, muy similar a la hepatitis A. El genoma viral ha sido clonado por técnicas similares a las utilizadas para identificar el virus de la hepatitis C. La ubicación taxonómica del virus no está aclarada todavía. Tiene similitudes con los calicivirus, pero su pariente genético más cercano es el virus de la rubéola, clasificado actualmente como togavirus. Cuando los sistemas sanitarios son deficientes se producen grandes epidemias transmitidas por el agua, pero la infección no se ha encontrado aún en forma autóctona en los Estados Unidos. Sin embargo, los viajeros a áreas endémicas han regresado con la infección.

Enfermedades causadas por priones (encefalopatías espongiformes transmisibles)

Las encefalopatías espongiformes transmisibles son un grupo fascinante de infecciones del SNC que se definen por una anatomía patológica celular distintiva, que produce un aspecto vacuolado de la materia blanca cerebral. Las infecciones y sus huéspedes naturales se resumen en el cuadro 23-16. Se ha propuesto una clasificación molecular y clínica de estas enfermedades.⁴⁹⁵

Durante décadas se ha sabido que el agente del scrapie ("tembladera" de las ovejas o encefalopatía espongiforme ovina) era novedoso: un agente aparentemente transmisible que no presentaba evidencias de contener ninguno de los tipos de ácido nucleico. El patógeno responsable se consideró en principio un "virus lento", pero el agente era más resistente a la inactivación por rayos X, luz ultravioleta y tratamientos químicos energéticos, incluida la inmersión en formalina al 10%, que cualquier otra partícula infecciosa conocida. En la década de 1960, Pattison propuso que el agente era una proteína básica y Griffith sugirió varios mecanismos hipotéticos, uno de los cuales resultó ser el correcto.⁴⁰⁴ La naturaleza de las partículas infecciosas fue develada por Prusiner. Este autor prosiguió su batalla para convencer a sus colegas escépticos y finalmente recibió un premio Nobel por sus esfuerzos. Este peculiar agente infeccioso, denominado prion, resultó ser una proteína celular normal (PrP^c) modificada por un cambio de conformación. La proteína PrP^c se convierte en la proteína anormal (PrP^{sc}) por el plegamiento adicional de una parte de su estructura de α hélice a una hoja β .^{402,404} Aunque la teoría de la proteína infecciosa está aceptada en general, el consenso acerca de la naturaleza del agente infeccioso no es unánime.⁹¹

Las enfermedades producidas por priones se denominan encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).^{264,404,405} Eran enfermedades de interés veterinario hasta que se encontró

Cuadro 23-16 Encefalopatías espongiformes transmisibles (enfermedades causadas por priones)

AGENTE	HUÉSPED NATURAL	INFECCIÓN HUMANA
Scrapie	Ovejas	No
Encefalopatía transmisible del visón	Visón	No
Enfermedad consuntiva crónica	Ciervo, caribú	No
Kuru	Seres humanos	Sí
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) (formas familiar, esporádica y iatrogénica)	Seres humanos	Sí
Síndrome de Gertsmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Seres humanos	Sí
Insomnio mortal (formas esporádica y familiar)	Seres humanos	Sí
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)	Ganado bovino	Sí

la primera EET humana. El kuru se observó en una remota y aislada tribu de aborígenes de las tierras altas de Nueva Guinea.¹⁷¹ Gajdusek ganó un premio Nobel por develar la misteriosa enfermedad que comenzaba con ataxia cerebelosa y un temblor similar al de los escalofríos, progresaba a la pérdida completa de la función motora y del habla y causaba la muerte en el término de un año. El agente se transmitía a través de las prácticas de canibalismo ritual, como parte del rito de duelo por los muertos. La transmisión de la enfermedad se detuvo cuando la tribu fue convencida de alterar sus prácticas. Más tarde, se encontró que dos demencias humanas raras, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y una variante de ella, el síndrome de Gertsmann-Straussler-Scheinker (GSS), eran causadas por un agente similar. Estas enfermedades degenerativas, que se observan en forma familiar y esporádica, producen la rápida aparición de demencia. La pérdida de la memoria y los problemas de conducta aparecen en algún momento posterior en la mayoría de los pacientes. La muerte ocurre en meses o dentro del año de la aparición de los síntomas.

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) apareció en el sur de Inglaterra en 1986 y para finales de 1993 se habían documentado alrededor de 100 000 casos.⁴⁰ El scrapie ha sido transmitido experimentalmente de los ovinos al ganado bovino¹⁸⁴ y se ha conjeturado que la enfermedad se transmite al ganado bovino a través del cerebro de oveja incluido en el alimento balanceado como suplemento proteico.⁴⁰ La EEB puede haber surgido también como una mutación al azar, como sucede con la EEJ en el hombre. Cualquiera que haya sido el origen del primer caso, la inclusión de productos de origen animal en los alimentos balanceados para animales permitió la diseminación amplia de la infección en el ganado bovino.²⁵⁴

Lo que fuera un desastre económico se transformó en una pesadilla política y científica en 1996, cuando se anunció que algunos casos de "enfermedad de Creutzfeldt-Jakob atípica" en Inglaterra podían haberse originado por la ingesta de carne procedente de vacas con EEB. El gobierno británico reaccionó tíbiamente, los gobiernos europeos lo hicieron en forma exagerada, y se produjo una crisis con más política que ciencia. Rápidamente quedó claro que la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) era real. Varios autores creen que es el resultado de comer carne contaminada,^{104,254,495} aunque Prusiner ha sido más circunspecto en su análisis.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ La vECJ se diferencia de la forma clásica de varias maneras, como el comienzo a edades tempranas. La epidemia de EEB, y aparentemente la de vECJ, se controló finalmente en Gran Bretaña

por la matanza masiva de ganado bovino y la prohibición de usar productos de origen animal para elaborar alimento para animales. Los largos períodos de incubación de las EET hacen que la cautela adoptada antes de cantar victoria sea una política prudente.²⁵⁴

La saga de la EEB y de la vECJ destruyó la (reconfortante) teoría aceptada antes de que las enfermedades transmitidas por priones eran específicas de especie. Aunque las EET se conocen desde hace muchos años, nunca antes la transmisión cruzó las barreras de la especie. Resultó devastador reconocer que estas barreras pueden no ser absolutas y que los seres humanos pueden no estar exentos de riesgo. El hecho es que por lo menos una de las víctimas de la ECJ había participado en un banquete en el que se consumió carne de animales de caza.⁷⁸ No se sabe si los animales silvestres estaban afectados por una enfermedad crónica consuntiva, como la que afecta las manadas de renos y ciervos del oeste y norte central de los Estados Unidos. De todas maneras, el riesgo adicional para los seres humanos es más que obvio. Otra reconfortante ilusión fue destruida cuando se identificó EEB en Canadá y los Estados Unidos.^{81,128}

Hasta este momento, todas las transmisiones de enfermedades por priones han tenido lugar a través de tejidos nerviosos, incluso la transmisión de ECJ por hormonas derivadas de tejido hipofisario humano, por trasplante de duramadre y córneas, y por electrodos para encefalograma infectados.⁴⁰⁵ Algunos casos se han hecho clínicamente evidentes más de 14 años después de la probable exposición. No se poseen pruebas definitivas de la transmisión por tejidos extraneurales,²⁶⁴ pero se ha demostrado la presencia de priones fuera del SNC en la ECJ clásica¹⁸⁷ y en la vECJ.⁴⁹⁵

Ante la sospecha clínica de una EET, deben tomarse precauciones extremas en el cuarto de autopsias y en el laboratorio de histología, porque los agentes de estas infecciones sobreviven la fijación con formalina y son demostrables incluso en tejidos embebidos en parafina.

Clasificación clínica de las infecciones virales

Aunque la taxonomía viral es importante desde el punto de vista científico, los esquemas clínicos de clasificación tienen validez práctica cuando se considera a un paciente en particular. Los síndromes clínicos y los virus asociados con ellos con mayor frecuencia se resumen en el cuadro 23-17. Nótese que

Cuadro 23-17 Síndromes clínicos asociados con infecciones virales

SISTEMA CLÍNICO	SÍNDROME	AGENTES MÁS PROBABLES	AGENTES MENOS PROBABLES
Respiratorio	Coriza (resfriado común)	Rinovirus	Influenza A y B
		Coronavirus	Parainfluenza 1 y 2
		Adenovirus	RSV
		Parainfluenza 3	Enterovirus
	Faringitis	Adenovirus	Influenza A y B
		Herpes simple 1	RSV
		Enterovirus	Parainfluenza 1 y 2
		EBV	Rinovirus
	Laringitis estridulosa		Coronavirus
		Parainfluenza 1	Influenza A
		Parainfluenza 2	RSV
		Parainfluenza 3	Sarampión
	Bronquiolitis		Coronavirus
		Parainfluenza 3	Adenovirus
		RSV	Parainfluenza 1 y 2
			Influenza A y B
	Neumonía		Rinovirus
		Influenza A	Parainfluenza 1 y 2
		RSV	Rinovirus
		Parainfluenza 3	EBV
		Adenovirus	Influenza B
		CMV (en pacientes inmunosuprimidos)	Coronavirus del SRAG
Sistema nervioso central	Pleurodinia		Metapneumovirus
		Coxsackie B	Coxsackie A
			Echovirus
			Virus de la parotiditis
	Meningitis aséptica	Echovirus	LCM
		Coxsackie A	Herpes simple 2
		Coxsackie B	VZV
			Adenovirus
			Bunyavirus
			Parainfluenza 3
			Poliovirus (cepas vacunantes)
			Togavirus
			Flavivirus
			Bunyavirus
			EBV
			Enterovirus
Gastrointestinal	Diarrea (lactantes)		Virus de la rabia
			CMV
		Rotavirus	Calicivirus (Norwalk)
		Adenovirus 40 y 41	
		Astrovirus	

(Continúa)

Cuadro 23-17 Síndromes clínicos asociados con infecciones virales (cont.)

SISTEMA CLÍNICO	SÍNDROME	AGENTES MÁS PROBABLES	AGENTES MENOS PROBABLES
Gastrointestinal (cont.)	Diarrea (adultos)	Calicivirus (virus tipo Norwalk)	Rotavirus
			Adenovirus 40 y 41
			Astrovirus
Cutáneo	Hepatitis	Hepatitis A	EBV
		Hepatitis B	CMV
		Hepatitis C	Hepatitis D
	Parotiditis	Virus de la parotiditis	Hepatitis E
	Erupción vesicular	Herpes simple 1 y 2 VZV	Parainfluenza
			Echovirus
			Coxsackie A
	Erupción maculopapular	Echovirus Coxsackie Herpesvirus humano 6 y 7	Vaccinia
			Adenovirus
			EBV
Urogenital	Erupción petequeial	Ninguno frecuente	Dengue
			Sarampión
			Rubéola
	Cistitis hemorrágica	Ninguno frecuente	Adenovirus
			Echovirus
			Coxsackie
	Miocarditis/pericarditis	Coxsackie A, B Echovirus	Virus de las fiebres hemorrágicas
			Adenovirus
			Virus del herpes simple 1
Ocular	Queratitis/conjuntivitis	Herpes simple 1 VZV Adenovirus	Influenza A
			Virus de la parotiditis
			Vaccinia
			Sarampión

Adaptado de McIntosh K: *Diagnostic virology*. En: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL, et al., eds., *Virology*, 2ª ed. Nueva York: Raven Press, 1990:411-440.

virus de diferentes grupos taxonómicos pueden ocasionar los mismos síntomas.

Diagnóstico de las infecciones virales

La técnica primaria de diagnóstico para la mayoría de las infecciones virales es el aislamiento del virus en cultivo de tejidos. Las técnicas serológicas también pueden ser de utilidad, sobre todo si el virus fue aislado en una localización no estéril. En algunos casos, el diagnóstico serológico es la única conducta práctica en un laboratorio clínico. La detección directa de antígeno en líquidos corporales o tejidos también ha sido eficaz para algunos virus. Sin duda, la lista de agentes para los cuales es útil la detección directa de antígeno continuará indudable-

mente en expansión. El diagnóstico molecular es el enfoque del futuro. En el cuadro 23-18 se resumen los métodos utilizados con mayor frecuencia en los laboratorios de hospitales para diagnosticar infecciones virales. Las ventajas y las desventajas de cada uno de estos enfoques se comparan en el cuadro 23-19. Los lectores interesados en el tema pueden consultar varias excelentes referencias para obtener más información.^{248,462}

Obtención de muestras para el diagnóstico

En general, debe hacerse un intento de obtener material del órgano u órganos infectados. En el caso de las infecciones virales más frecuentes de la piel, las lesiones cutáneas son las mejores muestras para cultivo. Para el diagnóstico de las infecciones de los aparatos respiratorio y gastrointestinal, deben cul-

Cuadro 23-18 Métodos de diagnóstico de las infecciones virales

VIRUS	MÉTODO PRINCIPAL	MÉTODO RÁPIDO	MÉTODO AUXILIAR	COMENTARIOS
Adenovirus	Cultivo ^a , TMA ^b	F, EIA, PCR-TR ^b	Serología ^c	
Adenovirus entéricos	EIA, F	PCR-TR ^b	IME ^b	
Alfavirus	Cultivo ^{b,c} , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología	
Arenavirus	Cultivo ^b , TMA ^b	EIA ^b , PCR-TR ^b	Serología	Prueba realizada sólo en laboratorios NBS-4
Astrovirus	TMA ^b	PCR-TR ^b	EIA ^b , IME ^b	
Bunyavirus	TMA ^{a,b}	PCR-TR ^{a,b}	Serología ^{a,b}	Se recomiendan tanto las pruebas moleculares como la serología para hantavirus
Calicivirus	TMA ^b	PCR-TR ^b	EIA ^b , IME ^b	
Coronavirus	Cultivo ^b , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^{a,b}	Se realiza sólo en epidemias o ante un posible SRAG
Citomegalovirus	Cultivo ^a , TMA ^{a,b}	CFA ^a , antígeno en sangre por F ^{a,b} , PCRC ^{a,b}	Serología	Serología para nivel inmunitario; antigenemia y PCRC para control
Enterovirus	Cultivo ^a , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^c	La gran cantidad de serotipos hace poco práctica la serología
Virus de Epstein-Barr	Serología ^a , TMA ^b	PCR-TR ^b	Cultivo ^{b,c}	
Filovirus	Cultivo ^b , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^b	Prueba realizada sólo en laboratorios NBS-4
Flavivirus	Cultivo ^{a,b} , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^b Histología	
Virus de la hepatitis A	Serología para IgM ^a		TMA ^b	
Virus de la hepatitis B	Serología ^a		TMA ^b	
Virus de la hepatitis C	Serología ^a , TMA ^{a,b}			Serología para el diagnóstico inicial; TMA para confirmación de infección activa y monitorización
Virus de la hepatitis D	Serología ^{a,b}		TMA ^b	
Virus de la hepatitis E	Serología ^{a,b}	PCR-TR ^{b,c}	TMA ^{b,c}	Todos los procedimientos están en etapa de investigación en los Estados Unidos
Virus del herpes simple	Cultivo ^a , TMA ^{a,b}	CFA ^a , F ^a , EIA ^a , PCR-TR ^b	Serología (tipo-específica) ^a	Serología para nivel inmunitario
Herpesvirus humano 6 y 7	TMA ^{a,b}	PCR-TR ^b	Serología ^b	
Herpesvirus humano 8	TMA ^{a,b}	PCR-TR ^b		
Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	Serología ^a , TMA ^{a,b}	Serología	Cultivo ^{b,c}	Serología para el diagnóstico inicial; control molecular
Influenza	Cultivo ^a , TMA ^b	CFA ^a , F ^a , EIA ^a , PCR-TR ^b	Serología ^c	Se necesita el aislamiento viral para la tipificación
Sarampión	Serología ^a	F ^a , PCR-TR ^b	Cultivo ^c	Rara vez aislado
Metapneumovirus	Cultivo ^b , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^b	
Parotiditis	Cultivo ^c , TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^c	
Papilomavirus	TMA ^a			
Parainfluenza	Cultivo ^a , TMA ^b	CFA ^a , F ^a , EIA ^a , PCR-TR ^b	Serología ^c	
Parvovirus B19	TMA ^b	PCR-TR ^b	Serología ^b	

(Continúa)

Cuadro 23-18 Métodos de diagnóstico de las infecciones virales (cont.)

VIRUS	MÉTODO PRINCIPAL	MÉTODO RÁPIDO	MÉTODO AUXILIAR	COMENTARIOS
Virus polio	TMA ^b		Serología ^b	
Poxvirus	Cultivo ^a , TMA ^{a,b}	ME ^{a,b} , PCR-TR ^b	Serología ^c	Serología para nivel inmunitario; pruebas realizadas sólo en laboratorios NBS-4
Virus de la rabia	Cultivo ^{a,b} , TMA ^b	F ^{a,b} , PCR-TR ^{a,b}		
Virus sincitial respiratorio	Cultivo ^a , TMA ^b	CFA ^a , F ^a , EIA ^a , PCR-TR ^b	Serología ^c	F es más sensible que EIA
Rhinovirus	Cultivo ^c , TMA ^{b,c}	PCR-TR ^{b,c}		Rara vez se hacen pruebas
Rotavirus	EIA ^a		Cultivo ^{b,c} , IME ^{b,c} , Serología ^{b,c}	
Virus de la rubéola	Serología ^a	PCR-TR ^a	Cultivo ^{b,c} , TMA ^b	
Virus de la varicela-zóster	Cultivo ^a , TMA ^{b,c}	CFA ^a , F ^a , PCR-TR ^b	Serología ^a	Serología para nivel inmunitario

TMA: prueba de amplificación molecular; F: inmunofluorescencia directa o indirecta; EIA: enzimoimmunoanálisis; PCR-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; SRAG: síndrome respiratorio agudo grave; CFA: cultivo en frascos-ampolla (con amplificación por centrifugación); NBS-4: laboratorio con nivel de bioseguridad 4 (el más alto grado de seguridad); PCRC: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (incluye TaqMan); ME: microscopía electrónica; IME: inmunomicroscopía electrónica.

^a Método estándar.

^b Disponible en laboratorios especializados o de referencia.

^c Se lleva a cabo rara vez.

tivarse las secreciones de estas áreas. Las muestras recomendadas para el cultivo viral se enumeran en el cuadro 23-20.

La mayoría de los virus ingresan en el organismo a través de los aparatos respiratorio o gastrointestinal. Aunque las manifestaciones clínicas más evidentes de enfermedad pueden ocurrir en un órgano distante, suele ser adecuado tomar una muestra del punto de entrada. La toma de muestras de múltiples localizaciones es muy útil si es difícil obtener una muestra de

un órgano interno o si el virus es difícil de aislar en el órgano diana. Por ejemplo, la piel es la más evidentemente afectada en la infección sarampionosa, pero el virus del sarampión puede aislarse en las vías respiratorias o en la orina. En forma similar, los sistemas cardíaco y nervioso central están así siempre afectados por las infecciones por enterovirus, pero el virus puede aislarse en las vías altas o en el aparato gastrointestinal.

Cuadro 23-19 Comparación de métodos diagnósticos

MÉTODO	TIEMPO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cultivo	Días a semanas	Especificidad máxima; sensibilidad casi siempre adecuada; se dispone del aislamiento para su caracterización	Se necesitan instalaciones para cultivo de tejidos; el tiempo necesario para hacer el diagnóstico puede ser prolongado (se acorta por amplificación con centrifugación)
Detección de antígeno	Horas a un día	Rapidez del diagnóstico; utilizado para virus de difícil cultivo	Falsos negativos y falsos positivos; dificultoso para pruebas masivas
Amplificación molecular	Uno a varios días	Máxima sensibilidad; especificidad casi siempre adecuada	Se necesitan instalaciones para análisis moleculares; posible contaminación cruzada; problemas con los inhibidores
Amplificación en tiempo real	Horas	Excelente sensibilidad y especificidad; velocidad de diagnóstico; puede ser el método de elección en el futuro	Se necesitan instalaciones para análisis moleculares
Serología	Semanas	Determinación de la inmunidad; utilizado para virus de difícil cultivo	Potenciales reacciones cruzadas; necesidad de contar con muestras del período agudo y convaleciente

Si el virus se aísla rara vez en estos sitios no estériles (como es el caso del sarampión), la recuperación de un virus establece el diagnóstico etiológico. Si el virus se aísla en localizaciones donde puede ser encontrado en ausencia de enfermedad (p. ej., enterovirus en muestras de fauces o de heces), el aislamiento de un virus potencialmente patógeno proporciona un diagnóstico presuntivo.

Los virus colonizan las superficies mucosas con menor frecuencia que las bacterias, pero pueden estar presentes más a menudo durante los meses en los que hay aumento de la circulación de virus: invierno para los virus respiratorios y verano para los enterovirus. La frecuencia con la cual los enterovirus colonizan el aparato gastrointestinal es máxima en los lactantes y mínima en los adultos. En Cincinnati, la tasa de portación para echovirus fue del 5,2% entre los niños de 1 a 4 años, del 2,6% en los niños de 5 a 9 años y sólo del 0,2% en los niños de 10 a 14 años.⁴²⁸ El virus del herpes simple y el CMV pueden causar infecciones crónicas y ser eliminados en forma intermitente con secreciones y líquidos.^{386,518}

La asociación de una enfermedad clínica con un virus que ha sido aislado en una localización no estéril puede ser reforzada por la demostración de una respuesta serológica contra el virus aislado, aunque rara vez se usa este poco conveniente plan de acción.

Las muestras óptimas para el cultivo de virus son los aspirados de líquidos, exudados o secreciones; los tejidos; las irrigaciones de las vías aéreas superiores o las muestras de heces. Los hisopados, que son convenientes y más aceptables para los pacientes que las irrigaciones o aspirados, son aceptables en la mayoría de las circunstancias. Los hisopados y las irrigaciones nasofaríngeas suelen ser equivalentes para el aislamiento de virus respiratorios. Algunos investigadores han encontrado que el RSV se aísla en forma más fiable en los aspirados nasofaríngeos que en los hisopados,²²² pero esta experiencia no es generalizada.⁴⁵⁵ Puede usarse casi cualquier material para la punta del hisopo, con la notable excepción del alginato de calcio (por lo menos para el virus del herpes simple).⁴⁵⁵

La viremia es frecuente en el curso de las infecciones virales, pero a menudo no se la detecta. La viremia por CMV se

Cuadro 23-20 Muestras recomendadas para cultivo viral

SÍNDROME	MUESTRAS ÓPTIMAS	ALTERNATIVAS PERMISIBLES Y MUESTRAS ADICIONALES
Coriza Laringitis estridulosa	Aspirados nasofaríngeos	Hisopado nasofaríngeo
Faringitis	Lavado o hisopado de fauces	
Bronquiolitis Neumonía	Aspirados nasofaríngeos Aspirados traqueales Aspirados o biopsia de pulmón	Hisopado nasofaríngeo
Pleurodinia	Aspirado nasofaríngeo <i>más</i> heces	Hisopado nasofaríngeo Hisopado rectal
Meningitis aséptica Encefalitis Mielitis transversa	Líquido cefalorraquídeo (es discutida la utilidad de heces, hisopados rectales y muestras de nasofaringe)	(Hisopado rectal) (Hisopado nasofaríngeo) Biopsia cerebral para herpes simple; orina para sarampión o paperas
Gastroenteritis	Heces	Hisopado rectal
Parotiditis	Aspirados nasofaríngeos <i>más</i> orina	Hisopado nasofaríngeo
Erupción cutánea vesicular	Aspirado o hisopado de la vesícula	
Erupción cutánea maculopapular	Aspirado nasofaríngeo <i>más</i> heces	Hisopado nasofaríngeo Hisopado rectal
Cistitis hemorrágica	Orina	
Miocarditis Pericarditis	Aspirado nasofaríngeo <i>más</i> heces	Orina para virus urliano Hisopado nasofaríngeo Hisopado rectal
Queratitis Conjuntivitis	Raspado conjuntival o de córnea <i>más</i> aspirado nasofaríngeo	Hisopado conjuntival o de córnea Hisopado nasofaríngeo

Adaptado de McIntosh K. Diagnostic virology. En: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL et al., eds. Virology, 2ª ed. Nueva York: Raven Press, 1990:411-440.

observa regularmente y puede detectarse por varios métodos. La sangre puede ser una muestra útil para el diagnóstico de infecciones por enterovirus en niños pequeños y en lactantes.⁴⁰¹

Para el cultivo de lesiones vesiculares de la piel, ésta se limpia con una torunda de algodón embebida en alcohol y se deja secar durante por lo menos un minuto. La vesícula debe abrirse con un bisturí estéril y tocar su base repetidamente con un hisopo estéril. A continuación se coloca el hisopo en un medio de transporte para virus, como se describe más adelante. Como alternativa, puede aspirarse el contenido de la vesícula con una jeringa de tuberculina y una aguja de calibre 26, si la vesícula es lo suficientemente grande. El material para realizar un preparado de Tzanck puede obtenerse por raspado enérgico de la base de la lesión con una hoja de bisturí; el material que queda sobre la hoja se coloca sobre un portaobjetos de vidrio y se deja secar al aire.

Como regla general, la frecuencia con la que se aíslan virus disminuye a medida que aumenta la duración de la enfermedad, de manera que debe procurarse obtener muestras lo antes posible en el curso de la infección.

Transporte y conservación de las muestras

Los aspirados, líquidos y tejidos deben transportarse al laboratorio en recipientes estériles a prueba de derrames. Es imperioso reducir al mínimo el intervalo que transcurre entre la recolección de la muestra y su siembra en cultivos celulares. La siembra de los cultivos celulares a la cabecera del paciente se ha recomendado para algunos virus lábiles, en especial el RSV. La siembra inmediata no es practicable en muchos medios asistenciales; por fortuna, otros investigadores no han encontrado problemas con el transporte de la muestra al laboratorio para su siembra, incluso en el caso del RSV.⁴⁵⁵

Los hisopos deben colocarse en un medio de transporte que contenga antibióticos; los hisopos secos no son aceptables. El tipo de medio de transporte probablemente no sea crítico, aunque es difícil llevar a cabo estudios comparativos en los que se controlen todas las variables. Los datos más completos son los referentes al virus del herpes simple. Los medios de transporte comerciales, como los hisopos Culturette® (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) han sido satisfactorios. El medio de sacarosa-fosfatos-glutamato (SPG), creado para *Chlamydia trachomatis*, también es un medio de transporte eficaz, así como la variante sin glutamato (medio 2SP).²⁶⁰ Tradicionalmente el medio nutritivo se ha suplementado con una fuente de proteínas con la intención de estabilizar los virus frágiles, y con antibióticos, para reducir al mínimo la contaminación bacteriana.

Las muestras deben refrigerarse hasta su siembra en cultivos celulares. Para seleccionar la mejor temperatura de conservación, debe hacerse un balance entre la disminución de los títulos virales que ocurre progresivamente a 4 °C y la disminución súbita que se observa cuando las muestras se congelan y descongelan. Es claro que 1) las muestras deben mantenerse a -70 °C si deben conservarse durante períodos prologados (semanas o meses) y 2) la mejor temperatura es 4 °C si la demora será corta (menos de 24 horas). Una recomendación razonable es que las muestras se refrigieren por períodos de hasta 96 horas y se congelen a -70 °C si la demora será mayor. La peor temperatura es -20 °C, sobre todo en congeladores de descongelación automática, en los que los ciclos repetidos de descongelación y congelación son extremadamente traumáticos para todas las formas de vida. Las muestras nunca deben congelarse en el congelador de un frigorífico común. Johnson ha efectuado un análisis extenso del transporte de muestras para diagnóstico virológico.²⁶⁰

Aislamiento de virus en cultivo

Aunque algunos de los laboratorios de los hospitales más grandes pueden tener instalaciones para la inoculación de animales, la mayoría de las instalaciones para diagnóstico están restringidas a la utilización de análogos in vitro.

Preparación y mantenimiento de cultivos celulares

Los cultivos celulares son el cultivo in vitro de células aisladas disociadas. El cultivo de tejidos y órganos es el mantenimiento in vitro de una porción de un órgano, casi siempre por períodos cortos y determinados. El cultivo de órganos está prácticamente restringido a los laboratorios de investigación. Por ejemplo, se han usado cultivos de tráquea para aislar coronavirus humanos, la mayoría de los cuales no se desarrollan en cultivos celulares. A veces, se combinan cultivos de órganos y celulares. Por ejemplo, se utilizó un explante de cerebro infectado y una capa indicadora de células sensibles para el aislamiento del virus del sarampión en pacientes con panencefalitis esclerosante subaguda. Los huevos embrionados son una forma barata de cultivar determinados virus, como los ortomixovirus, pero se usan rara vez en los laboratorios de diagnóstico.³⁰²

Los cultivos celulares son de tres tipos (cuadro 23-21). Los cultivos celulares primarios consisten en una mezcla de células, por lo general de riñón, pulmón o piel, obtenidas por disociación de las células de trozos del órgano. Estas células pueden mantenerse en cultivo sólo por períodos limitados. Una vez que se subcultivan repetidas veces in vitro, los cultivos primarios se transforman en líneas celulares. Las líneas celulares utilizadas con mayor frecuencia están compuestas por fibroblastos, obtenidos de piel o pulmón embrionario. Una línea celular es diploide si por lo menos el 75% de las células tienen un conjunto normal de cromosomas. Una línea celular es heteroploide si más del 25% de las células tienen un conjunto anormal de cromosomas. En el cuadro 23-22 se presentan algunas de las opciones en expansión de líneas celulares.

La imaginación creadora ha producido una variedad aún mayor de posibilidades de cultivos celulares. La combinación de líneas celulares puede ampliar el espectro de virus detectados y reducir al mismo tiempo el número de tubos necesarios e incluso evitar el uso de cultivos celulares primarios.²⁴⁹ Algunas de las combinaciones de líneas celulares que se han creado, como Fresh Cells® o R-Mix® (Diagnostic Hybrids, Athens, OH) se incluyen en el cuadro 23-21. Las líneas celulares mezcladas pueden combinarse con otros métodos, como la amplificación por centrifugación (frascos ampollas con cubreobjetos) para aumentar aún más la detección.^{21,137} Una innovación adicional es el almacenamiento de los cultivos mixtos a -80 °C hasta 4 meses antes de su siembra.²⁵¹

Otra innovación ha sido el diseño de cultivos celulares por ingeniería genética para facilitar el aislamiento de determinados virus o mejorar su detección. Una de las líneas celulares usada con éxito para la detección de enterovirus son las células de riñón de mono verde búfalo (BGMK). Mediante técnicas de ingeniería genética destinadas a que las células BGMK expresen un receptor para enterovirus (factor acelerador de la degradación, DAF), los investigadores han logrado aumentar los resultados diagnósticos.²⁵⁰

Un enfoque diferente de la modificación por ingeniería genética de células es el sistema para detección del HSV llamado ELVIS (enzyme linked virus-inducible system) (Diagnostic Hybrids). En este caso, una secuencia promotora específica para el HSV de la línea celular de riñón de hámster lactante

Cuadro 23-21 Tipos de cultivos celulares

TIPO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS	USO PRINCIPAL
Primario	Diploide; tipos celulares mezclados; 1 o 2 pasajes	Primario de riñón de mono	Influenza; parainfluenza; algunos enterovirus
Líneas celulares	Diploides; fibroblastos; cantidad limitada de pasajes (< 50 a 70)	Primario de riñón de conejo Fibroblastos diploides humanos (WI-38, MRC-5, HEL, FS-9)	Herpes simple Herpes simple; citomegalovirus; varicela-zóster; rinovirus
Líneas celulares continuas	Heteroploide; pasaje continuo in vitro	HeLa; Hep-2 A549 MDCK LLC-MK2 Vero; células ML Células RD Células BGM Células 293	Adenovirus; RSV; virus Cocksackie B Herpes simple; adenovirus; varicela-zóster; algunos enterovirus Virus influenza Virus parainfluenza Herpes simple Algunos virus Cocksackie A Virus Cocksackie B Adenovirus entéricos
Líneas celulares mixtas	Combinaciones de líneas celulares continuas	MRC-5 + CV-1 Células ML + A549 RD + H292; BGMK + A549	Herpes simple; varicela-zóster Virus respiratorios Enterovirus
Líneas celulares modificadas genéticamente	Introducción de un gen para producir un cambio indicador visible después de la infección	Sistema enzimático inducible por virus (ELVIS)	Herpes simple

(*baby hamster kidney* BHK) se une a un gen indicador, β -galactosidasa. Cuando las células se infectan con cualquiera de los dos serotipos de HSV, el gen promotor se estimula y el gen indicador se activa, lo que deriva en un cambio visible en el color de la monocapa.³⁸⁷ Como sucede con las líneas celulares mixtas, las células ELVIS pueden almacenarse a -80°C hasta su utilización.²⁵¹ El HSV es el virus que se busca con mayor frecuencia en los laboratorios de diagnóstico y son útiles los métodos de detección de este agente.

La expectativa de vida de las células diploides normales es de alrededor de 50 pasajes in vitro;²¹⁸ las líneas celulares que tienen por lo menos 70 pasajes se consideran líneas celulares establecidas. Estas líneas establecidas o continuas pueden provenir de tejidos normales, como la línea de células Vero de riñón de mono verde africano. Alternativamente, pueden originarse de epitelios neoplásicos, como las células HeLa, que derivan de un adenocarcinoma cervical y las células Hep-2, que provienen de un carcinoma de laringe. El aspecto de los cultivos sin sembrar se muestra en la figura 23-5. Las células fibroblásticas suelen ser largas, ahusadas y orientadas en forma paralela, en tanto que las líneas establecidas constan de células epiteliales poligonales. Los cultivos primarios contienen naturalmente una mezcla de tipos celulares.

Las condiciones para el desarrollo y el mantenimiento de cultivos celulares varían de manera considerable y sólo es posible hacer algunas generalizaciones. La temperatura de incubación óptima es de 36°C a 37°C , pero puede reducirse hasta 35°C después de que se obtiene una monocapa confluyente. Esta maniobra puede facilitar el aislamiento de virus que, como los mixovirus y los rinovirus, crecen óptimamente a 33°C . Debe mantenerse un pH fisiológico. Suele utilizarse un sistema

buffer CO_2 -bicarbonato, en el que la fuente de CO_2 son las células metabólicamente activas en un tubo o frasco cerrado. En un sistema abierto, debe aportarse una mezcla de CO_2 y aire. Los compuestos amortiguadores que no dependen del sistema CO_2 -bicarbonato, como el buffer HEPES (ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N*-2-etansulfónico) pueden usarse en sistemas abiertos si no se dispone de una estufa de CO_2 . Con frecuencia se incluye en el medio un indicador de pH para el control estrecho de los cambios de pH durante la incubación. Se utiliza a menudo el rojo fenol, que es rojo a pH fisiológico y que vira al amarillo a pH ácido y al púrpura a pH alcalino.

Los medios de cultivo para virus deben contener vitaminas y aminoácidos esenciales.²⁴⁸ Estos compuestos son estables cuando se almacenan a 4°C , excepto la L-glutamina, que debe reponerse en forma periódica.³⁶¹ El medio utilizado con mayor frecuencia es el medio esencial mínimo de Eagle (*Eagle Minimum Essential Medium*, MEM), tanto para el crecimiento como para el mantenimiento de las células. Casi siempre se lo suplementa con pequeñas cantidades de suero (hasta el 5%) para mantener la monocapa una vez que las células han alcanzado la confluencia. Para aumentar el crecimiento inicial, se utilizan concentraciones de suero más elevadas (por lo habitual del 10%). Es importante que el suero esté libre de agentes infecciosos, como micoplasmas, y que no contenga anticuerpos contra ningún virus que pueda estar presente en las muestras clínicas. Por esta razón, lo más común es utilizar suero fetal bovino, de ternera recién nacida o de ternera agammaglobulinémica. Otras fórmulas, como el medio 199 o el RPMI 1640, contienen una mezcla más rica en nutrientes y pueden ser óptimos para el mantenimiento de algunas líneas celulares. Existen dos formas de soluciones salinas balanceadas que se usan con

Cuadro 23-22 Origen de las líneas celulares

TIPO DE LÍNEA CELULAR	NOMBRE	ORIGEN DE LAS CÉLULAS
Heteroploide continua	A549	Carcinoma de células alveolares humano (células epiteliales tipo II)
Heteroploide continua	BMG	Células de riñón de mono verde Buffalo
Heteroploide continua	BHK	Células de riñón de hámster lactante
Heteroploide continua	CV-1	Células de riñón de mono verde africano
Diploide	FS-9	Fibroblastos de prepucio
Heteroploide continua	Células 293 de Graham	Células de riñón embrionario humano (HEK) transformadas por fragmentos de DNA de adenovirus tipo 5
Heteroploide continua	HeLa	Adenocarcinoma de cuello uterino; el HPV-18 está integrado al genoma
Heteroploide continua	HEp-2	Carcinoma de células planas de laringe; transfectadas con HPV-16
Heteroploide continua	LLC-MK2	Células de riñón de mono <i>Macaca mulatta</i>
Heteroploide continua	McCoy	Línea de células murinas de origen desconocido
Heteroploide continua	MDCK	Células de riñón de perro con características de epitelio tubular y carcinoma papilar
Diploide	MRC-5	Fibroblastos de pulmón embrionario humano
Heteroploide continua	ML	Células de pulmón de visón
Heteroploide continua	RD	Células de rhabdomyosarcoma humano
Heteroploide continua	Vero	Células de riñón de <i>Cercopithecus aethiops</i> (mono verde africano)
Diploide	WI-38	Fibroblastos de pulmón embrionario humano

mayor frecuencia, tanto para el lavado de células como incorporadas a medios completos. Las fórmulas de las soluciones de Hanks y de Earle difieren en varios aspectos, sobre todo en la capacidad buffer. Las dos soluciones se utilizan en forma indistinta, pero la solución balanceada de Earle puede ser más conveniente para el mantenimiento prolongado de monocapas, debido a su mayor poder buffer.

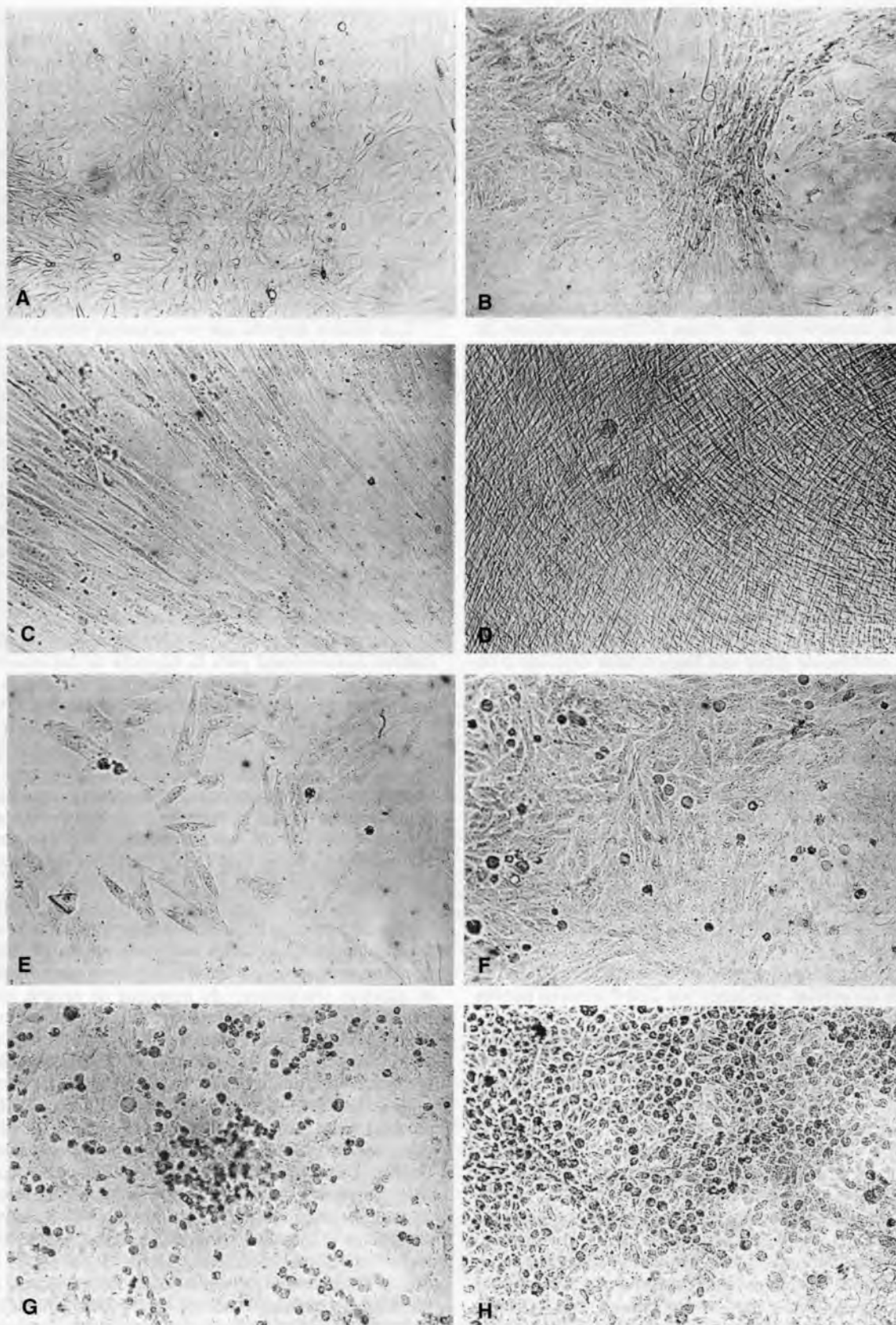
Contaminación de cultivos celulares

La contaminación de los medios de cultivo se reduce mediante el uso de antibióticos. Por lo habitual se utiliza penicilina (200 µg/mL) y estreptomycin (200 µg/mL) o gentamicina (50 µg/mL) para la supresión del desarrollo bacteriano; para la inhibición del desarrollo de hongos se utiliza anfotericina B (1,25 µg/mL).²⁴⁸ Sin embargo, el uso de antibióticos no sustituye la técnica aséptica rigurosa.

La contaminación de los medios de cultivo con especies de *Mycoplasma* es un problema habitual y complicado.³⁴⁴ Las especies de *Mycoplasma* suelen introducirse con el suero o con fuentes de virus contaminadas; una vez en el cultivo son muy difíciles de erradicar. Los efectos sobre las células incluyen el desarrollo subóptimo y alteraciones en la interacción de las células y los virus. La presencia de especies contaminantes de *Mycoplasma* puede detectarse por cultivo, por tinción para el DNA del *Mycoplasma*, por determinación bioquímica de incorporación de uracilo o por técnicas de la actividad de la nucleósido fosforilasa. Los proveedores comerciales de células deben poder demostrar las medidas que adoptan como control de calidad.

Además, los cultivos celulares pueden estar contaminados con virus (casi siempre los que están presentes en el tejido original)²⁴⁸ o incluso con otras células.³⁷³ El tipo más frecuente de contaminación viral es la presencia de virus simianos autóctonos en los cultivos celulares primarios de mono, como el agente vacuolante (SV40), los virus espumosos o el virus de parainfluenza simiano (SV5). Los virus simianos que tienen hemaglutinina (p. ej., el virus SV5) pueden producir resultados erróneos si se realizan pruebas de hemadsorción para detectar virus respiratorios humanos. Cuando se buscan mixovirus, es importante realizar pruebas de hemadsorción de control con tubos no sembrados provenientes del mismo lote de células que se utilizó con las muestras clínicas (véanse protocolo 23-1 y fig. 23-12E). La frecuencia con la que se contaminan los tubos en una

Figura 23-5 Cultivos celulares normales. (A) Monocapa normal de riñón de mono *Macaca mulatta*. Este cultivo primario se encuentra exactamente en el momento de confluencia; no existen espacios entre las células, pero éstas aún no han comenzado a superponerse unas con otras. La variabilidad de las células de la monocapa es reflejo de su origen de diferentes tipos celulares (180×). (B) Monocapa normal de riñón de *Macaca mulatta*. Después de continuar la incubación, se han hecho evidentes zonas de crecimiento más exuberante. Todavía se nota la variabilidad de las células de la monocapa (180×). (C) Monocapa normal de riñón de *Macaca mulatta*. Después de continuar la incubación, se han hecho evidentes zonas de crecimiento más exuberante. Todavía se nota la variabilidad de las células de la monocapa (180×). (D) Monocapa normal de fibroblastos MRC-5. Estas células diploides fibroblásticas tienen las características elongadas, ahusadas, correspondientes a su tipo celular. Se encuentran alcanzando su confluencia; quedan unos pocos espacios entre células (180×). (E) Monocapa normal de fibroblastos MRC-5. Después de continuar la incubación, se hace evidente el patrón de entrecruzamientos de los fibroblastos superpuestos entre sí. Los detalles de las células individuales son menos evidentes. Estas monocapas envejecidas no deben ser sembradas (180×). (F) Células HEp-2 normales. Se ha subcultivado una línea continua de células y las nuevas han comenzado a desarrollarse. Existen grandes espacios entre las células aisladas, que adoptan un aspecto ahusado a medida que se extienden sobre la nueva superficie de vidrio (180×). (G) Células HEp-2 normales. Después de continuar la incubación, la línea celular se ha multiplicado de manera que las células se apilan



unas sobre otras. Las células en división o que se están desprendiendo del vidrio tienen aspecto redondeado. A medida que las monocapas envejecen, se hacen menos sensibles a la acción citopatógena de los virus y es cada vez más difícil la detección visual de la acción citopatógena. (H) Células McCoy normales. Esta línea celular continua, cuyo origen se desconoce, se muestra en el momento en que se ha obtenido crecimiento confluyente. Las células son compactas y poligonales. Las muestras deben sembrarse en este estadio o cuando las células son un poco menos confluentes (180×).

partida de células de riñón de mono puede variar del 5% al 100%. El método de reservar unos pocos tubos no sembrados para hacer los controles de hemadsorción no es por completo seguro. Si una cantidad inhabitual de pacientes presentan virus hemadsorbentes en un día determinado, debe considerarse la posibilidad de contaminación con un virus simiano. La contaminación de un lote comercial de células A549 con virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina causó problemas diagnósticos en varios laboratorios.¹⁶¹ La acción citopatogénica observada en las monocapas contaminadas se asemejó a la del virus del herpes simple, pero el agente no pudo ser tipificado con los antisueros disponibles. Otro problema fue la inhibición por el virus contaminante de adenovirus presentes en dos de las muestras. Los adenovirus aislados crecieron con posterioridad por siembra de un nuevo lote de células A549 con sobrantes de las muestras originales.

Un problema excepcional, pero potencialmente grave, puede ser causado por la presencia de virus patógenos en los tejidos de los monos. Aunque por fortuna es muy raro, el virus del herpes simiano y el virus Marburg, que produce una fiebre hemorrágica, han provocado infecciones de laboratorio mortales.^{102,427,429} Estos agentes justifican el trabajo con cultivos celulares primarios de origen simiano en gabinetes de bioseguridad.

La contaminación de los cultivos celulares con otras células ha dado por resultado la suposición errónea de que se había establecido una nueva línea celular en más de un laboratorio de investigación. En efecto, una resistente célula HeLa puede haber ingresado en el frasco y predominar sobre las demás.³⁷³ En el laboratorio de diagnóstico, la contaminación cruzada de una línea celular establecida sobre una línea celular diploide o un cultivo celular primario puede dar el aspecto de acción citopatogénica en los cultivos celulares contaminados (fig. 23-6D).

Aspectos técnicos de los cultivos celulares

Se utiliza una diversidad de recipientes como soporte de las monocapas de células. Los cultivos celulares de uso más común se comercializan en tubos o frascos ampolla que están listos para la siembra de las muestras. Muchos laboratorios pueden preferir, por razones de economía, mantener las líneas celulares en sus propios laboratorios. Los frascos plásticos en forma de T han reemplazado a los de vidrio para la propagación de las líneas celulares (fig. 23-7).

Las líneas celulares pueden mantenerse en el laboratorio por disociación de las células, que luego son distribuidas en nuevos recipientes (recuadro 23-5).

Las monocapas establecidas se disocian por una breve incubación en una solución de tripsina o una mezcla de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), conocida también como Versene. Puede aparecer daño en las células si la solución de tripsina está muy concentrada o si el contacto es demasiado prolongado. La neutralización de la tripsina se realiza por el suero presente en el medio de crecimiento que se agrega después de disociar las células. El desprendimiento de las células de la superficie puede aumentarse físicamente por agitación o por raspado con una varilla de vidrio cuyo extremo se encuentra cubierto por un tubo de goma, dispositivo conocido como *rubber policeman* ("bastón policial") (véase fig. 23-7). A continuación las células disociadas se colocan en tubos para la siembra de muestras o en nuevos frascos para continuar la propagación de la línea celular. La densidad de la suspensión puede ajustarse como para obtener monocapas confluentes después de uno o más días de incubación. Después de la siembra de muestras clínicas, puede utilizarse el mismo protocolo para

preparar células infectadas a fin de subcultivarlas en nuevas monocapas.

Los recipientes utilizados con mayor frecuencia para el aislamiento de virus son los tubos de vidrio de fondo redondo (16 × 125 mm) (fig. 23-8). Estos tubos se incuban en un ángulo fijo de 5° de manera que la monocapa se forme sobre un lado del tubo. La concentración más densa se observa cerca del centro y en el fondo de los tubos; la capa más delgada se encuentra en los bordes y hacia la boca del tubo. Para fines diagnósticos se utilizan con menor frecuencia placas de Petri redondas o portaobjetos sobre los que se fijan cámaras de plástico. El sistema de portaobjetos con cámaras de plástico es costoso, pero muy útil si se contempla el estudio morfológico de una monocapa intacta.

Los frascos ampolla que se utilizaban para el aislamiento de *Chlamydia trachomatis* se usan ahora para aumentar la frecuencia y la velocidad de los aislamientos virales (técnica de *shell vial*). Se prepara una monocapa celular sobre un cubreobjetos redondo de vidrio colocado en el fondo de un frasco ampolla de fondo plano (fig. 23-9). Si el inóculo se centrifuga sobre la monocapa, paso esencial para el aislamiento de *C. trachomatis*, y la monocapa se tiñe con antisero marcado con fluoresceína o si se prueba con una sonda molecular, casi todos los aislamientos del virus del herpes simple pueden detectarse dentro de las 24 horas.¹⁴⁸ Dada la rapidez con que se aísla este virus en cultivos convencionales, el agregado de un procedimiento costoso puede ser cuestionable.

Se ha publicado una mejora asombrosa en la velocidad de aislamiento del CMV.^{162,388} La técnica es más sensible que el cultivo convencional para la mayoría de las muestras que no sean sangre, pero el uso de ambos procedimientos mejora los resultados. El método preferido para detectar CMV en sangre (y la mejor forma de diferenciar infección de enfermedad) es realizar pruebas para antígeno o ácido nucleico virales. Las ventajas del cultivo en frasco ampolla provienen tanto de la centrifugación como del uso de un suero monoclonal fluorescente de alta calidad. Aun los reactivos supuestamente uniformes, como los anticuerpos monoclonales, pueden tener variaciones entre lotes. Con algunas partidas de antisueros puede haber tinción inespecífica de los núcleos celulares. En la lámina en color 23-2F se muestra el aspecto de un cultivo de CMV en frasco ampolla. Paya y cols. han estudiado la cantidad de frascos ampolla necesarios para cada muestra.³⁸⁹ Estos autores encontraron que se requieren tres frascos ampolla para obtener el máximo rendimiento de muestras de sangre, en tanto que para orina, lavados broncoalveolares y tejidos son necesarios dos frascos ampolla. Fedorko y cols. encontraron que la antigüedad de los fibroblastos en los frascos ampolla afectaba mucho la proliferación de citomegalovirus. Las monocapas viejas (de 8 a 15 días) eran menos sensibles para la recuperación del virus, pero más sensibles a los efectos tóxicos de componentes de las muestras que las monocapas más recientes.¹⁵⁴ Es difícil para los fabricantes proporcionar monocapas recientes y lamentablemente la mayoría de los laboratorios dependen de fuentes comerciales para su provisión de frascos ampolla.

Gleaves y cols. han comunicado haber tenido éxito con un tercer herpesvirus asociado con células: el VZV.¹⁸⁸ En un estudio de 68 muestras provenientes de 60 pacientes, el VZV fue identificado por algún método en el 57% de ellos. La sensibilidad de las técnicas diagnósticas, en orden decreciente, fue la inmunofluorescencia directa de raspados de piel, el cultivo en frascos ampolla y el cultivo convencional. Schirm y cols. han confirmado la utilidad del cultivo en frascos ampolla para el VZV.⁴³⁶ Estos autores pudieron detectar la mitad de los pacien-

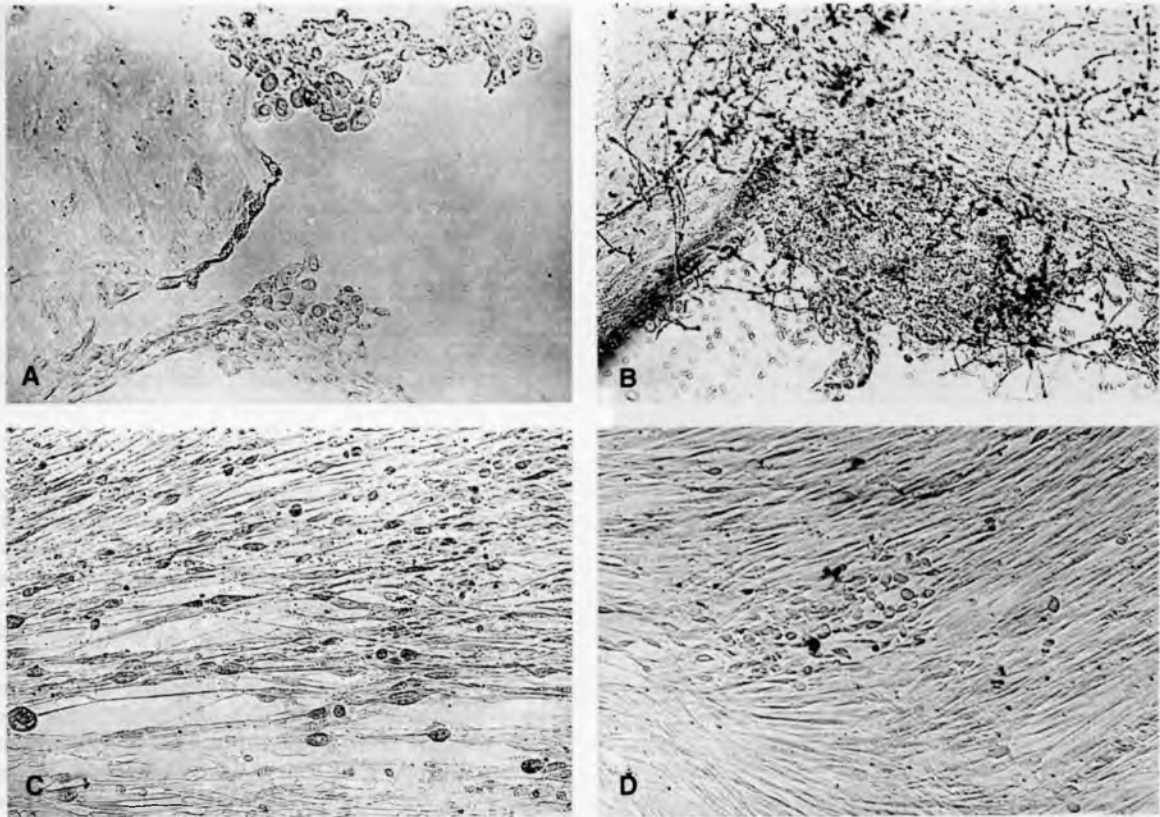


Figura 23-6 Artefactos en cultivos celulares. (A) Células de riñón de mono *Macaca mulatta*. El tubo se ha sembrado con una muestra que contiene material tóxico inespecífico. Las células de la monocapa se han redondeado en focos y muchas se han desprendido del vidrio. El efecto no viral puede distinguirse del efecto citopático viral por el patrón general, por la rapidez de aparición y por la imposibilidad de reproducir el efecto después del subcultivo en monocapas nuevas (180×). (B) Células de riñón de *Macaca mulatta*. Una muestra de heces ha sido inadecuadamente descontaminada antes de su siembra. Son evidentes las bacterias y las hifas micóticas sobre la monocapa, que tiene aspecto granuloso y se degenerará con rapidez. El medio puede estar ácido y turbio. Es necesario tratar nuevamente la muestra con antibióticos. También puede filtrarse la muestra, pero en ese caso pueden perderse los virus asociados con células (180×). (C) Fibroblastos MRC-5. Se ha sembrado sobre la monocapa un filtrado de heces que contiene *Clostridium difficile* 24 horas antes. La desorganización generalizada de la monocapa, con redondeamiento y desprendimiento celular, es típica de esta toxina. La identificación de la causa de la toxicidad se realiza mediante la neutralización del efecto con antisuero específico. La toxina de *C. difficile* puede dar al principio la impresión de un efecto citopático, pero éste no se reproduce cuando el tubo sospechoso se subcultiva sobre monocapas nuevas (180×). (D) Fibroblastos MRC-5. En estos fibroblastos inoculados con LCR se observa agrandamiento y redondeamiento celulares en focos, que sugieren una acción citopatogénica viral. La progresión atípica del efecto citopático y la observación de que algunos de los focos parecen superpuestos a los fibroblastos sugieren que se trata de una contaminación celular. Más tarde se aislaron células HEp-2 en este tubo, con un cariotipo idéntico a las utilizadas en el laboratorio. El mecanismo de contaminación no fue dilucidado nunca (180×).

tes positivos en el término de 3 días utilizando frascos ampolla y un anticuerpo monoclonal, en tanto que con el método convencional en tubos se detectó un tercio de los pacientes en un tiempo promedio de 7,5 días. Un factor importante en el rendimiento de los cultivos celulares es la línea celular elegida. Los fibroblastos diploides humanos son los utilizados con mayor frecuencia, pero el agregado de células de riñón de *Macaca mulatta*⁵¹⁴ o de células A549⁴⁴ mejora en forma sustancial la tasa de aislamiento en los cultivos convencionales en tubo. El incremento de la recuperación es menos evidente en el caso de los cultivos en frasco ampolla.⁴⁴ Es probable que la técnica de centrifugación utilizada con los frascos ampolla aumente el contacto del inóculo con la monocapa, pero los mecanismos exactos se desconocen. Se ha informado otra manipulación exitosa para el VZV, que consiste en la congelación y descongelación de la muestra antes de la centrifugación.⁴⁵ El mecanismo de este efecto no está aclarado, ya que la velocidad de la centrifugación no es suficiente para sedimentar el virus libre.

La técnica de frascos ampolla se aplicó además a virus distintos de los pertenecientes al grupo herpes, en especial el virus de la gripe.¹³⁷ Si bien otros virus respiratorios también se detectan con la técnica de frascos ampolla, la experiencia es más limitada y menos satisfactoria que con el virus influenza. La técnica de frascos ampolla se ha usado asimismo para el virus BK.³³⁰

Selección de cultivos celulares para el aislamiento de virus

Los requerimientos mínimos para el aislamiento de virus en cultivo son un cultivo primario de células de riñón de mono (para el aislamiento de mixovirus y enterovirus) y una línea de células diploides de origen humano (esencial para el aislamiento de CMV, rinovirus y VZV; útil para el aislamiento de virus del herpes simple). El agregado de una línea continua de origen humano (p. ej., HEp-2 o A549) también útil para el aislamiento de adenovirus y del virus sincitial respiratorio.

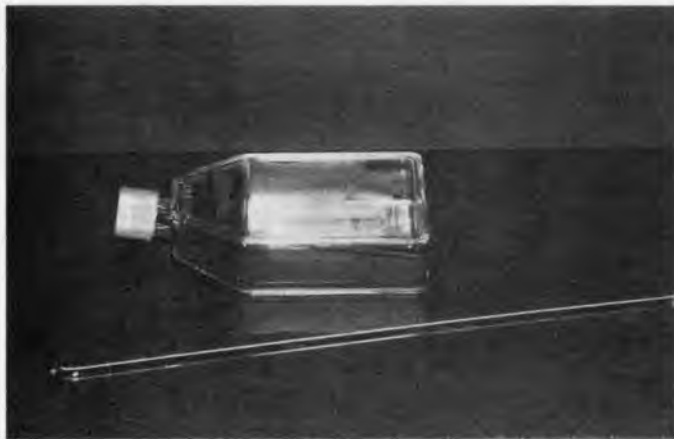


Figura 23-7 Frasco plástico en forma de T y varilla de vidrio con un tubo de goma en su extremo, conocida como *rubber policeman* ("bastón policial"). Las monocapas de líneas celulares pueden cultivarse en frascos grandes. De un solo frasco pueden prepararse muchos tubos para cultivo viral. El raspado mecánico por pipeteo o con la varilla de vidrio ayuda a desprender las células durante la tripsinización para el subcultivo.

Otras líneas celulares pueden representar sustitutos satisfactorios de estos tres tipos celulares básicos, si se desea el aislamiento de un virus determinado (cuadro 23-21). Las líneas celulares adicionales pueden utilizarse como sustituto de las líneas simianas si no se dispone de estas últimas; en forma alternativa, pueden utilizarse selectivamente para aumentar la proporción de aislamientos de virus específicos durante los períodos del año en que se espera que ocurran dichas infecciones. No existen sustitutos para los fibroblastos diploides humanos.

La calidad y la procedencia de las células utilizadas para el aislamiento son importantes. Estudios minuciosos de fibroblastos clonados de un solo feto hallaron una gran variación en el grado con el cual cada clon sustentaba el desarrollo de los virus respiratorios.⁴⁸⁴ Las variantes de líneas celulares continuas, como las HeLa y la HEp-2, difieren asimismo en su sensibilidad para el desarrollo de ciertos virus. Es importante asegurarse de que la variante celular elegida tenga la sensibilidad adecuada.

Recuadro 23-5 Procedimiento de mantenimiento de líneas celulares

1. La monocapa se lava con buffer de fosfatos pH 7,5.
2. Se agrega una solución al 0,25% o de partes iguales de tripsina al 0,25% y Versene 1:2 000 durante 15 a 30 segundos y luego se retira.
3. Se incuba la monocapa a 35 °C hasta que las células se despegan. La agitación suave de la botella puede aumentar la disociación.
4. Se agrega medio de cultivo y las células se resuspenden a la concentración deseada para el subcultivo. Como alternativa, las células pueden fraccionarse en forma arbitraria (1:2 o 1:3) según lo indique la experiencia.

Una vez que se ha encontrado una línea celular aceptable, deben congelarse múltiples alícuotas en nitrógeno líquido. Las células para uso diario pueden mantenerse en cultivo continuo. La provisión original debe utilizarse en forma periódica para renovar la reserva de trabajo, de modo que las células no muten a un estado que sea menos sensible al desarrollo viral.

Las células de riñón de *Macaca mulatta* y *Macaca fascicularis* son comparables en lo que respecta al aislamiento de mixovirus. Por otro lado, se ha publicado que los fibroblastos MRC-5 son más sensibles que los fibroblastos WI-38 para el aislamiento de CMV.²⁰² La sensibilidad de todas las líneas diploides disminuye a medida que aumenta el número de pasajes. Algunos proveedores comerciales están utilizando células que han sido subcultivadas hasta 30 veces. Debe buscarse el pasaje más bajo disponible de un proveedor fiable. Si las capas celulares, sobre todo las de líneas continuas, son demasiado gruesas, puede reducirse el aislamiento de virus y la evaluación de la acción citopatógena es difícil. Para algunos virus, es preferible tener islotes de células o una monocapa apenas confluyente que una capa de células totalmente confluyente.⁴⁸³

Además, las células deben estar en condiciones lo suficientemente buenas como para soportar las varias semanas necesarias para el aislamiento de los virus de desarrollo lento. Para asegurar tasas de aislamiento máximas, debe verificarse la ausencia de contaminación con especies de *Mycoplasma*. Los virus que se diseminan en forma directa de una célula a otra,

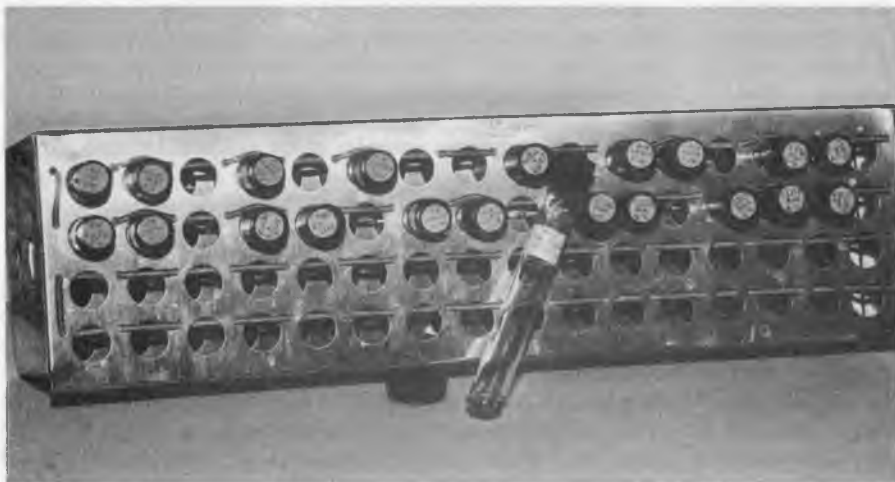


Figura 23-8 Los tubos para cultivos virales se inclinan en un ángulo fijo de 5° en una gradilla fija. Los resortes de metal sostienen los tubos en su lugar. Las etiquetas redondas en las tapas de los tubos facilitan la identificación de los cultivos, sin necesidad de sacarlos de la gradilla.

como el VZV, y no a través del medio de cultivo, requieren una monolapa saludable.

El uso de medio de crecimiento con 10% de suero puede aumentar el desarrollo y la progresión de la acción citopatógena causada por estos virus,⁵¹¹ aunque no creemos que esta maniobra sea necesaria. En cambio, el suero contiene inhibidores de los mixovirus y los paramixovirus. El medio de mantenimiento de las células utilizadas para estos virus (por lo general cultivos primarios de riñón de mono), debe estar libre de suero. Algunos fabricantes incluyen (u ofrecen) antisueros contra los virus simianos endógenos más comunes (p. ej., SV5 o SV40). Este procedimiento no está ampliamente aceptado; en la práctica, el antisero será eliminado cuando el medio de envío se reemplace por medio fresco sin el antisero.

Siembra e incubación de cultivos celulares

Los recipientes de transporte que contienen hisopos deben agitarse en forma mecánica y exprimir el material contenido en el hisopo en el medio que contiene antibióticos. Los tejidos se fragmentan y homogeneizan en un pequeño volumen de caldo de transporte. Puede ser necesario suspender las muestras de heces en 10 volúmenes de medio de transporte. Las heces, los tejidos y los aspirados respiratorios que contengan un exceso de detritos o moco deben centrifugarse a baja velocidad. La mayoría de los medios de transporte y medios de cultivo contienen antibióticos. Si se supone que hay contaminación bacteriana o fúngica de la muestra, se deben agregar antibióticos antes de su siembra (penicilina y estreptomycin o gentamicina más anfotericina B al doble de la concentración utilizada en los medios de cultivo).²⁴⁸ Después de procesada, la muestra puede sembrarse en el medio de cultivo. Como alternativa, el inóculo puede colocarse directamente sobre la monolapa después de eliminar la mayor parte del medio de cultivo. El contacto más directo de las partículas virales con las células aumenta la infecciosidad y puede incrementar tanto la cantidad de aislamientos como la velocidad con que se recuperan. Después de un período de adsorción del inóculo de 30 a 60 minutos a 36 °C a 37 °C, se agrega medio de cultivo y se continúa con la incubación. Las sustancias tóxicas presentes en la muestra también pueden ser más evidentes después de la adsorción del inóculo. Si se utilizan dos tubos de cada tipo celular, uno puede inocularse por adsorción y el otro por agregado directo de la muestra al medio de cultivo. Toda muestra sobrante debe mantenerse a 4 °C o congelada a -70 °C por si aparece toxicidad o contaminación bacteriana. Si se observa desarrollo bacteriano o fúngico, pueden añadirse más antibióticos a la muestra. La muestra puede filtrarse a través de filtros de microporo de 0,45 µm antes de sembrar nuevos cultivos, pero los virus asociados con células, como el CMV y el VZV, pueden perderse cuando las células infectadas quedan atrapadas en los filtros.³⁰⁷ La toxicidad inespecífica para la monolapa suele hacerse evidente dentro de las 24 horas; en ese caso, la muestra puede sembrarse nuevamente después de diluirla 1:10 en solución salina tamponada. También debe controlarse el pH de la muestra y corregirse la neutralidad si es muy ácida o muy alcalina. Si se observa degeneración inespecífica de la monolapa tras una incubación de varios días, las células y el medio pueden subcultivarse sobre una monolapa nueva.

Para el aislamiento de la mayoría de los virus, las monolapas deben incubarse entre 36 °C y 37 °C. La temperatura óptima de incubación para los virus respiratorios, en especial los rinovirus, es de 33 °C, pero a esa temperatura puede disminuir el aislamiento de otros virus. El uso de tambores giratorios (fig.



Figura 23-9 Frascos ampolla para el aislamiento de *Chlamydia trachomatis* y virus (técnica de *shell vial*). Los frascos son cilíndricos, con fondo plano y contienen un cubreobjetos circular sobre el que se desarrollan las células. La tapa puede ser de goma o plástico, como se muestra aquí. El cubreobjetos se extrae con pinzas o por medio de una aguja.

23-10) facilita el aislamiento de patógenos en cultivos primarios de riñón de mono y en fibroblastos diploides, sobre todo en muestras respiratorias.

Para el aislamiento de la mayoría de los demás virus es adecuada una incubación de dos semanas. El CMV puede necesitar incubaciones más prolongadas, pero Gregory y Menegus encontraron que el 92% de las cepas de CMV se aislaron antes de los 14 días cuando se utilizaron fibroblastos MRC-5.²⁰² Si se desea sólo aislar virus del herpes simple, el período de incubación puede acortarse a 7 días. La centrifugación del inóculo y la detección de antígeno acortan de manera notable el tiempo de detección para varios virus, como el CMV y el VZV. Las pruebas de hemadsorción deben realizarse después de la incubación de cultivos primarios de riñón de mono durante 5 y 10 días.

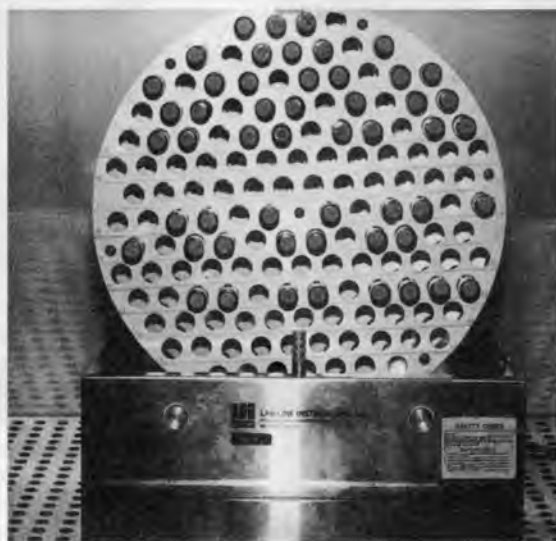


Figura 23-10 Tambor giratorio para cultivos virales. El efecto citopático de muchos virus, sobre todo los que causan infecciones respiratorias, aumenta por la rotación lenta de los tubos, aproximadamente a una revolución cada 3 minutos.

Detección de virus e identificación provisoria EFECTO CITOPÁTICO

El método más común para detectar un virus es la observación de los cultivos en busca de los daños que causó en la monocapa, o sea su efecto citopático. Las monocapas deben observarse diariamente si se busca virus del herpes simple y al menos tres veces por semana si se sospecha la presencia de virus de crecimiento más lento. Los tubos de vidrio pueden examinarse con un microscopio convencional, utilizando soportes sencillos para evitar que rueden de la platina (fig. 23-11). Si la monocapa por examinar se encuentra en frascos ampolla, debe utilizarse un microscopio invertido.

Puede hacerse a menudo una identificación provisoria de un virus específico (o al menos de un grupo viral específico) sobre la base del tipo de efecto citopático y el tipo de célula afectada. En el cuadro 23-23 se resumen los patrones típicos de acción citopatogénica y la frecuencia de aislamiento para los virus que se encuentran con mayor frecuencia en los laboratorios hospitalarios.

Cuando se examina un cultivo en el laboratorio, se ve el patrón de acción citopatogénica, pero no se conoce el nombre del virus. En el cuadro 23-24 se presenta un diagrama de flujo para analizar la acción citopatogénica de una muestra clínica. Este cuadro presenta los patrones más frecuentes de acción citopatogénica. La inclusión de todas las combinaciones posibles para todas las cepas haría que el cuadro fuera muy confuso y probablemente inútil.

Los efectos de los virus sobre las células pueden ser al principio sutiles. Aunque la cuantificación del inóculo viral sobre la base de la magnitud de la acción citopatogénica no es precisa, es útil hacer un registro de las estimaciones semicuantitativas, con fines comparativos (1+, < 25% de la monocapa afectada; 2+, 25% a 50%; 3+, 51% a 75%; 4+, > 75%). Estas estimacio-



Figura 23-11 Observación de cultivos en busca de efecto citopático. La observación de cultivos en busca de acción citopatogénica puede hacerse con un microscopio invertido o uno tradicional. Un soporte que calza en el soporte de muestras de la platina del microscopio evita que los tubos redondos rueden sobre ella. No es posible utilizar aumentos grandes, pero tampoco es necesario para el reconocimiento y la caracterización del efecto citopático.

nes hacen más sencillo documentar la progresión del efecto citopático y establecer la presencia de un agente citopático. Puede ser necesario subcultivar las células de un tubo con posible acción citopatogénica sobre monocapas nuevas. Si es posible, estos subcultivos deben hacerse después de alcanzar un grado 2+ de acción citopatogénica, mediante tripsinización, suspensión física de la monocapa con un *rubber policeman* o por ciclos repetidos de congelación y descongelación rápida. Luego, se siembra una alícuota sobre el tipo de célula en el cual se haya observado originalmente la acción citopatogénica y en cualquier otro tipo celular que pueda ser de utilidad para hacer un diagnóstico provisoria.

El efecto citopático en tres cultivos celulares de uso frecuente se muestran en forma secuencial en las figuras 23-12 a 23-15. En la mayoría de los casos se han representado las alteraciones precoces y tardías.

Existen relativamente pocas formas de expresión celular de citotoxicidad. El redondeamiento celular es una expresión habitual de daño, pero las células pueden aparecer hinchadas o contraídas y granuladas o lisas. Algunos virus producen factores que conducen a la fusión celular, lo que lleva a la formación de células gigantes multinucleadas, denominadas sincitios; el virus sincitial respiratorio, los virus parainfluenza 2 y 3, el virus del sarampión y el virus de las paperas pueden producir células sincitiales gigantes. Además, el virus del herpes simple y el VZV producen células gigantes multinucleadas más pequeñas.

No todos los aislamientos de virus sincitial respiratorio producen sincitios. La producción de la glucoproteína F (usión) es necesaria para que haya fusión celular. Shahrabadi y Lee demostraron que el medio de cultivo debe contener calcio para que el virus sincitial respiratorio produzca fusión en células HEp-2.⁴⁴⁹ La formación de sincitios gigantes también parece relacionada, al menos en parte, con la concentración de glutamina en el medio de cultivo.³²⁸

La acción citopatogénica suele comenzar en forma de focos y se ve con mayor facilidad en los bordes de la monocapa, donde la densidad celular es menor. En el caso de virus que se diseminan de una célula a otra a través del medio de cultivo, la acción citopatogénica progresa desde los focos hasta incluir la totalidad de la monocapa, a veces con gran rapidez. Si la cantidad de viriones en la muestra es muy grande, la mayoría de la monocapa puede infectarse simultáneamente; en este caso la acción citopatogénica diseminada debe diferenciarse de la citotoxicidad inespecífica subcultivando el medio sobre cultivos celulares nuevos. En el caso de virus que se diseminan en forma directa de una célula a otra (CMV y VZV), el efecto citopático progresa más lentamente y por extensión local desde los focos iniciales. Sin embargo, hemos visto cultivos en los que una gran cantidad de CMV en la muestra produjo acción citopatogénica en toda la monocapa, simulando la acción del virus del herpes simple.

Por supuesto, en cierta forma es artificial intentar capturar la considerable variabilidad de un proceso biológico en una sola toma fotográfica. En el laboratorio clínico, es posible examinar otras zonas de la monocapa, observar otros cultivos e incluso reexaminar el cultivo sospechoso después de incubarlo algunas horas más. Por lo tanto muchas veces es posible detectar cambios citológicos que son más precoces que los que demuestran las fotografías más convincentes.

HEMAGLUTININACIÓN Y HEMADSORCIÓN

Muchos virus tienen componentes de superficie que aglutinan eritrocitos de diferentes especies animales. Algunos virus,

Cuadro 23-23 Diagnóstico diferencial del efecto citopático viral

VIRUS	CULTIVO CELULAR			DÍAS NECESARIOS PARA EL AISLAMIENTO		DESCRIPCIÓN
	PMK	HDF	HEP-2	Mayo Promedio ^a	Mt. Zion, promedio ^b	
Virus influenza	+++	—	—	4	3,8	Ninguna o células granulosas localizadas agrandadas seguido de desprendimiento; progresión rápida
Virus parainfluenza	+++	+	+	11	6,4	Ninguna o redondeamiento localizado y células gigantes multinucleadas (tipos 2 y 3)
Virus sincitial respiratorio	++	+	+++	8,3	6,1	Células agrandadas, gigantes sincitiales brillantes; o células granulosas, redondas
Virus de la parotiditis	+++	+	—	6,9		Células agrandadas, sincitiales gigantes
Virus del sarampión	+	—	+			Células sincitiales gigantes vacuoladas; aisladas rara vez
Virus de la poliomielitis	+++	+++	+++	4,6		Células hinchadas, brillantes, dispersas; progresión rápida y desprendimiento de células del vidrio
Virus Coxsackie B	+++	+	+++	3,5	4,2	Células hinchadas, brillantes, localizadas; desprendimiento del vidrio
Echovirus	+++	+++	+	3,9	4,2	Células hinchadas, brillantes, localizadas; desprendimiento del vidrio
Rinovirus	+	+++	—	6,6		Células hinchadas o granulosas, localizadas
Adenovirus	++	+	+++	6,2	6,4	Células hinchadas, agrupadas (en racimo de uvas o en entramado)
Virus del herpes simple	++	+++	++	3,5	2,7	Células agrandadas o contraídas granulosas que comienzan en los bordes; progresión rápida y desprendimiento; puede haber células gigantes
Virus varicela-zóster	++	++	—	7,6	6,1	Focos bien definidos, alargados, de células agrandadas o contraídas; diseminación por contigüidad lenta aumentada por el uso de medio de crecimiento
Citomegalovirus	—	+++	—	10	5,8	Focos compactos de células agrandadas; progresión lenta por contigüidad

+++; células óptimas para la detección del efecto citopático (ECP); ++; ECP frecuente, puede ser el mejor sistema para la detección de ECP; +; ECP observado en ocasiones; — habitualmente no se observa ECP; PMK: células primarias de riñón de mono; HDF: fibroblastos diploides humanos; HEP-2: línea continua de origen humano.

^a De la Mayo Clinic, resumido de Herrmann EC Jr. Experience in providing a viral diagnostic laboratory compatible with medical practice. *Mayo Clin Proc* 1967;42:112-123; y Herrmann EC Jr. Efforts toward a more useful viral diagnostic laboratory. *Am J Clin Pathol* 1971;56:681-686.

^b De Mount Zion Hospital and Medical Center, San Francisco, resumido de Drew WL. Controversies in viral diagnosis. *Rev Infect Dis* 1986;8:814-824.

Adaptado de McIntosh K. Diagnostic virology. En: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL, et al., eds. *Virology*, 2ª ed. Nueva York: Raven Press, 1990:411-440.

en especial los de los grupos mixovirus y paramixovirus, también insertan hemaglutininas en las membranas de las células infectadas cuando el virus madura en la membrana citoplasmática. Algunos aislamientos de virus de influenza A y los virus parainfluenza pueden detectarse sólo por hemaglutinación o hemadsorción (véase fig. 23-12A y B).

La prueba de hemaglutinación se realiza con menor frecuencia que la prueba de hemadsorción para la detección de aislamientos en cultivos celulares, pero es necesaria si se han inoculado huevos embrionados. La hemaglutinación de eritrocitos se realiza en tubos o placas de microtitulación, después del agregado de material proveniente de huevos o cultivos infectados. Si es necesaria la caracterización de la cepa, el procedimiento más económico es la inhibición de la hemaglutinación con sueros antivirales específicos. En los laboratorios de referencia, las nuevas cepas de virus influenza se tipifican por este

método; la inhibición cruzada producida por antisueros contra cepas anteriores permite determinar cuán estrecha es la relación de la nueva cepa con los aislamientos previos.

La prueba de hemadsorción para mixovirus (véase fig. 23-12A a E) se realiza agregando eritrocitos frescos de cobayo a una monocapa infectada (véase protocolo 23-1).⁴⁹³ La prueba puede efectuarse sin dañar la monocapa y después de ello puede proseguirse la incubación. Además de la hemadsorción, puede verse hemaglutinación de los eritrocitos en la fase líquida. Los procesos de hemadsorción y hemaglutinación se muestran en la figura 23-16.

La hemadsorción es más conveniente que la hemaglutinación para detectar la presencia de virus en la mayoría de los laboratorios clínicos. La inhibición de la hemadsorción también puede ser útil para identificar aislamientos, pero consume mucho más antisuero que la inhibición de la hemaglutinación.

Cuadro 23-24 Diagnóstico diferencial del efecto citopático viral

AISLAMIENTO PRIMARIO EN:					VIRUS SOSPECHADO	COMENTARIOS Y PRUEBAS AUXILIARES	CONFIR- MACIÓN
PMK	HDF	HEP-2	HAD DE GR	TIPO DE ECP			
+	+	+	-	Hinchazón/retracción/hialina	Poliovirus		NT, FA
				Sincitios en HEP-2 y PMK	Virus sincitial respira- torio		NT, FA, EIA
				Células redondeadas, hin- chadas, especialmente en fibroblastos	Herpes simple	Desarrollo en riñón de conejo	FA, EIA
				Grupos hinchados/en entra- mado	Adenovirus		NT, FA, CF
+	+	-	-	Hinchazón/retracción/hialina	Echovirus y Coxsackie A		NT, FA
				Focalizada, hinchazón line- al/células gigantes	Varicela-zóster	Asociación con células en el pasaje	NT, FA
				Hinchazón/retracción	Rinovirus	Sensibilidad a pH 3	NT
				+ (Cobayo) Sincitios grandes granulosos	Paperas	Rara vez aislado	HAI, NT
+	-	+	-	Hinchazón/retracción/hialina	Coxsackie B		NT, FA
				Grupos hinchados/en entramado	Adenovirus		NT, FA, CF
				+ (Mono) Sincitios vacuolados	Sarampión	Rara vez aislado; histo- ria clínica; HAd	NT, FA
				+ (Cobayo) Redondeamiento, sincitios	Parainfluenza 2 y 3	HAd	FA, HAI
+	-	-	+ (Cobayo)	Ninguna/redondeamiento	Influenza y Parainfluenza 1 - 3	HAd 4 °C = 20 °C HAd 4 °C ≤ 20 °C	HAI, FA, CF HAI, FA, CF
				Sincitios	Parainfluenza 2	HAd	HAI, FA, CF
				Sincitios grandes granulosos	Paperas	Rara vez aislado	HAI, NT
				+ (Mono) Sincitios vacuolados	Sarampión	Rara vez aislado, histo- ria clínica, HAd	NT, FA
2	1	2	2	Focal/células agrandadas	Citomegalovirus	Asociación con células	FA, H-E
				Focal, placas lineales	Varicela-zóster	Asociación con células; H-E	FA, CF
				Focal/hinchazón	Rinovirus	Sensibilidad a pH 3	NT

PMK: células primarias de riñón de mono; HDF: fibroblastos diploides humanos; HEP-2: línea celular continua de origen humano; ECP: efecto citopático; citopatogénica; HAd: hemadsorción; FA: inmunofluorescencia; NT: neutralización; CF: fijación de complemento; EIA: enzimo-inmunoanálisis en fase sólida; H-E: tinción para cuerpos de inclusión.

MICROSCOPIA ÓPTICA

A medida que se replican, algunos virus producen masas de nucleoproteína y viriones en diferentes estadios de ensamblaje. El anatomopatólogo o el citólogo utilizan estas inclusiones virales para detectar la presencia de una infección viral e identificar en forma presuntiva el agente.^{470,526} Si bien las caracte-

rísticas de la acción citopatogénica en monocapas sin teñir suelen ser suficientes para hacer un diagnóstico provisorio, el virólogo puede obtener más información sencillamente tiñendo las células con hematoxilina-eosina, con la tinción de Papapanicolaou o con naranja de acridina (véase lámina en color 23-1).

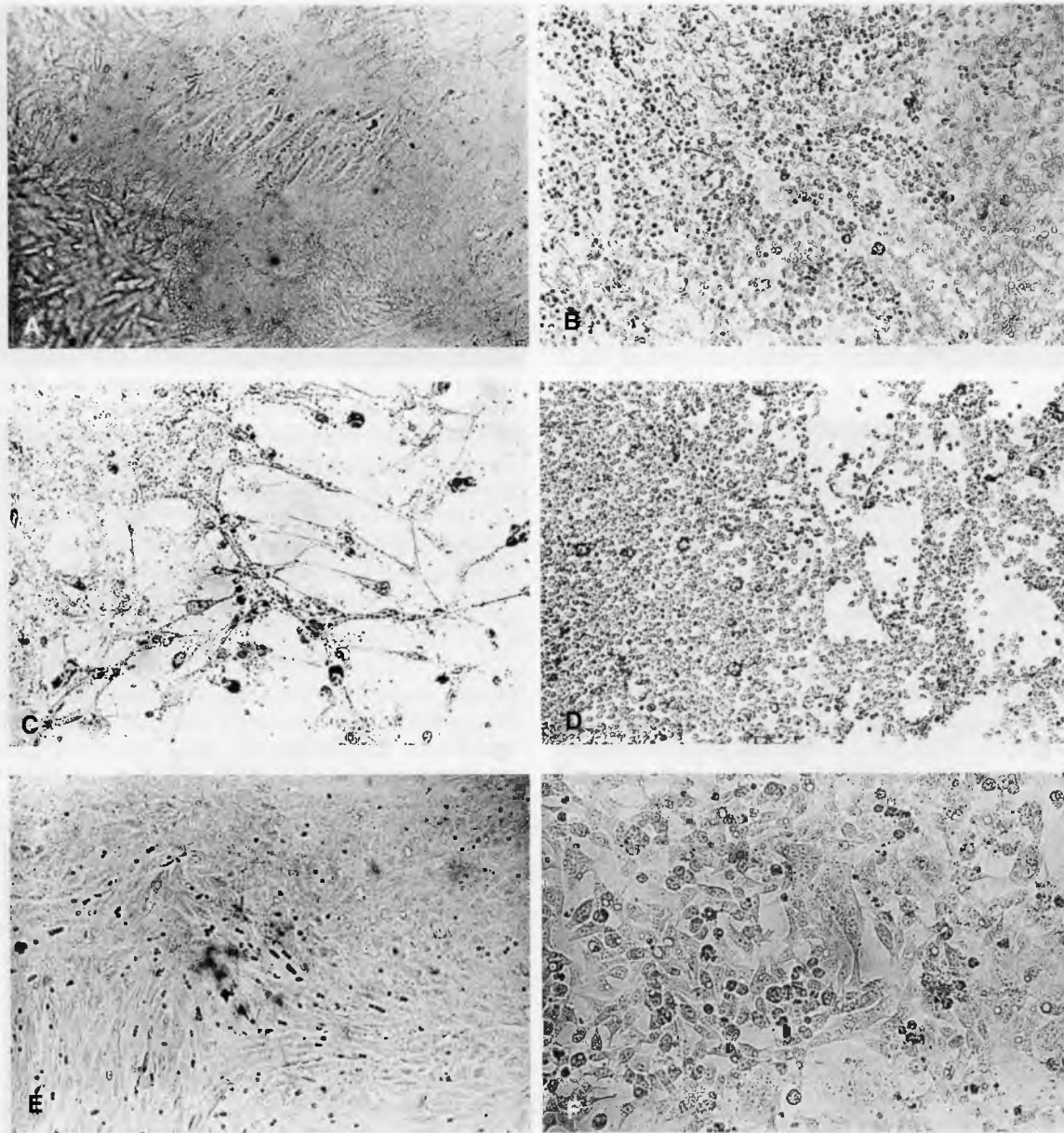


Figura 23-12 Efecto citopático de los mixovirus. (A) Células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas por virus influenza A. Este aislamiento no produce efecto citopático en la monocapa. Una prueba de hemadsorción detecta la presencia de virus. Muchas de las cepas actuales de virus influenza A y la mayoría de las cepas de influenza B producen efecto citopático, que suele desarrollarse con mayor rapidez que la producida por los virus parainfluenza (180×). (B) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por virus influenza A. La monocapa está intacta, pero se encuentra cubierta por numerosos eritrocitos de cobayo. Los eritrocitos se han adherido a las hemaglutininas virales presentes en la superficie de las células infectadas. Puede observarse hemaglutinación de los eritrocitos en la fase líquida, producida por el virus libre, pero no se muestra en la fotografía (180×). (C) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por parainfluenzavirus 3. La monocapa ha degenerado y las células se han desprendido del vidrio. Muchas de las células remanentes son granulosas o están agrandadas. Con frecuencia, los aislamientos de virus parainfluenza no producen efecto citopático evidente y deben detectarse por hemadsorción (180×). (D) Células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas por virus parainfluenza 3. Se ha realizado una prueba de hemadsorción. Las células remanentes están cubiertas con eritrocitos de cobayo que se han unido a la hemaglutinina viral presente en la superficie de las células (180×). (E) Células de riñón de *Macaca mulatta* no infectadas, que muestran una reacción negativa de hemadsorción. Hay unos pocos eritrocitos pegados a la monocapa, pero no se observa la masiva adherencia de eritrocitos que caracteriza a una prueba positiva. Las células sedimentadas también se desprenden con mayor facilidad por agitación de la monocapa no infectada que de una monocapa infectada por mixovirus. (F) Células HEp-2 infectadas por virus parainfluenza 3. Se han formado grandes células gigantes multinucleadas (conocidas como sincitios) en la monocapa por fusión de células adyacentes. Este tipo de efecto citopático es característico de los virus parainfluenza 2 y 3 en células de riñón de mono y del virus parainfluenza 3 en células HEp-2. Otros virus también pueden formar sincitios, en especial el virus sincitial respiratorio. Los virus parainfluenza pueden diferenciarse del virus sincitial respiratorio con facilidad por medio de una prueba de hemadsorción (180×).

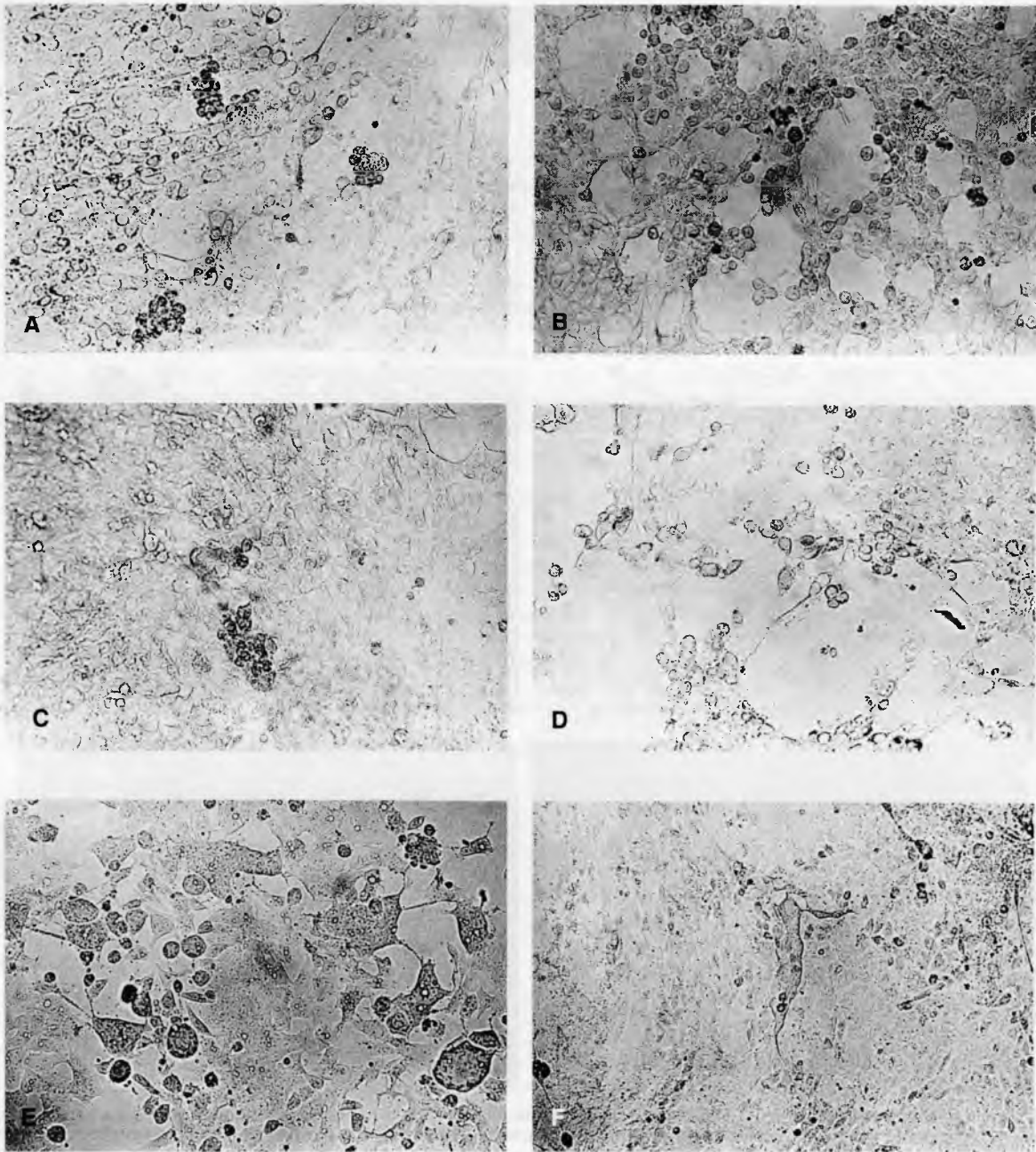


Figura 23-13 Efecto citopático de otros virus respiratorios. (A) Células HEP-2 infectadas por adenovirus. Se observan varios focos de células agrandadas, granuladas. Las células infectadas por adenovirus suelen agruparse en forma de racimos de uvas, muy similar a como lo hacen los estafilococos en una coloración de Gram (180×). (B) Células HEP-2 infectadas por adenovirus. La mayoría de las células de la monocapa son ahora redondeadas; muchas se han desprendido del vidrio y dejaron múltiples agujeros. En varias zonas puede verse agrupación de las células. Algunas de las células residuales están comunicadas por filamentos de citoplasma, lo que produce el comienzo de un aspecto en encaje o entramado (180×). (C) Células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas por adenovirus. Se observa un grupo de células agrandadas, granuladas. Si se encuentran múltiples focos en un cultivo, puede emitirse un informe preliminar. Si se encuentran sólo algunos, es mejor seguir observando la monocapa en espera de la progresión del efecto citopático (180×). (D) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por adenovirus. La magnitud del efecto citopático ha aumentado en forma considerable. Son evidentes los grupos de células hinchadas con puentes citoplasmáticos intercelulares. Muchas se han desprendido del vidrio. Finalmente sólo habrá unas pocas células diseminadas en el tubo, como evidencia de que alguna vez hubo una monocapa (180×). (E) Células HEP-2 infectadas por virus sincitial respiratorio. Muchas de las células de la monocapa han sido fusionadas por el virus para formar células sincitiales gigantes, muy similares a las formadas por los virus parainfluenza. Otras células están agrandadas o se han desprendido del vidrio. Una prueba de hemadsorción sobre esta monocapa sería negativa (180×). (F) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por virus sincitial respiratorio. Se ha formado un gran sincitio en la monocapa. Puede diferenciarse este aislamiento de un virus parainfluenza por hemadsorción o por identificación de antígenos específicos.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En los laboratorios que disponen de un microscopio electrónico, la morfología ultraestructural de un aislamiento puede identificar el grupo al que pertenece.^{6,366} La tinción negativa para microscopia electrónica es sencilla y puede efectuarse con rapidez en sobrenadantes o células lisadas. Esta técnica puede ser muy útil para la diferenciación de la toxicidad inespecífica de la acción citopatogénica producida por un inóculo con grandes cantidades de virus.

DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA

Las alteraciones citolíticas causadas por los rinovirus pueden ser semejantes a las de los enterovirus, aunque los rinovirus se replican con menor rapidez y tienen la labilidad propia de los rinovirus al medio ácido. Para realizar esta determinación, se toman alícuotas de cultivos celulares infectados y se llevan a pH 3 o 7,4 durante 3 horas. Luego se obtiene una estimación de la infecciosidad residual sembrando diluciones seriadas al décimo en cultivos celulares. Si el virus es un rinovirus debe observarse una disminución de la infecciosidad de 2 a 4 log₁₀.²⁴⁸ En la práctica, puede demostrarse la sensibilidad al ácido sin recurrir a las diluciones seriadas.

ASOCIACIÓN CON LAS CÉLULAS

La demostración de la asociación de los viriones con las células infectadas es útil para diferenciar los miembros del grupo herpes. El virus del herpes simple se libera al medio de cultivo, en tanto que el CMV y el VZV permanecen asociados con las células. El virus del herpes simple infecta con rapidez toda la monocapa (véase fig. 23-14B). La acción citopatogénica del CMV y del VZV es casi siempre en focos (véase fig. 21-14E a H), porque los viriones no se diseminan por el medio. Sin embargo, grandes cantidades de partículas virales presentes en el inóculo pueden producir una acción citopatogénica diseminada similar a la del herpes simple. El subcultivo por separado del medio de cultivo y de las células rotas demuestra la asociación con las células del aislamiento.

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

Además de utilizarse para la confirmación de la identidad de un agente citopatogénico, la demostración de antígenos específicos en cultivos se ha utilizado como método para detectar la presencia de un virus, aun en ausencia de acción citopatogénica. Las pruebas para detección de antígenos pueden realizarse después de una breve incubación, si se desea realizar un diagnóstico rápido, procedimiento que se ha usado con más frecuencia con amplificación por centrifugación. Las mejoras más notables en la rapidez con la cual se detectan aislamientos tienen lugar con los virus que presentan el crecimiento más lento en sistemas convencionales, como el virus sincitial respiratorio, el citomegalovirus y el virus de la varicela zóster (lámina en color 23-2D y F).

La bibliografía abunda en informes disímiles acerca de la sensibilidad de estos métodos acelerados para el diagnóstico virológico. Por ejemplo, el porcentaje de aislamientos de virus influenza recuperados por amplificación por centrifugación ha variado del 56%¹⁴⁹ al 98%.¹³⁷ Las diferencias en las variables de operación, como las líneas celulares y el origen de los anticuerpos monoclonales, así como las variaciones en las poblaciones de pacientes, hacen que las recomendaciones generales sean traicioneras. Está claro que las técnicas de cultivo acele-

rado pueden aportar información útil, pero existe un conflicto entre la sensibilidad y la rapidez cuando se decide la duración del tiempo de incubación. La inclusión de cultivos convencionales o tomar muestras varias veces de los frascos ampolla aumenta la sensibilidad, pero también incrementa los costos. Aunque es difícil de demostrar, la provisión más rápida de resultados puede tener importancia clínica y económica.²⁰ En el futuro, la detección molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), puede hacer estéril esta discusión.

Aunque la mayoría de los laboratorios no encontrarán virus de la rubéola, Schmidt y cols. han informado que la tinción con inmunoperoxidasa de células RK-13 o BSC-1 facilita la detección de este virus con requerimientos nutricionales especiales.⁴⁴⁰

ARTEFACTOS Y ALTERACIONES NO CAUSADOS POR VIRUS

A medida que las células envejecen en los cultivos pueden aparecer cambios morfológicos no relacionados con la infección viral (véase fig. 23-5). La densidad de las células en las líneas celulares diploides y, en particular, en las líneas celulares establecidas, puede hacerse muy alta; las células en proceso de necrosis o de división pueden aparecer redondeadas o granuladas. En cualquier cultivo pueden aparecer células atípicas aisladas que son especialmente notables en las áreas menos densas, como los bordes de la monocapa, donde asimismo puede hacerse evidente en primer lugar el efecto citopático de un virus. Por lo tanto, es importante mantener controles no inoculados de células del mismo lote utilizado para la siembra de las muestras.

Los cultivos primarios de células de riñón de mono pueden estar infectados por virus simianos que causan diversos cambios degenerativos,²⁴⁸ como un aspecto espumoso o vacuolado de la monocapa.

La presencia de células extrañas que sedimentan sobre la monocapa también puede ser causa de confusión (véase fig. 23-6D). En estas circunstancias puede parecer que hay efecto citopático debido a que las células contaminantes tienen un aspecto distinto del de la monocapa original. El efecto suele ser similar al de un virus que ocasiona alteraciones focalizadas en la monocapa, como el CMV. El artefacto puede sospecharse porque las células se hallan sobre la monocapa en lugar de formar parte integral de ella. Las células contaminantes pueden ser de origen humano, como células epiteliales o mesoteliales que se encuentren en la muestra, o provenir de otros cultivos celulares, sobre todo si se ha realizado un subcultivo de una línea celular a otra.

Existen diversos agentes no virales o sustancias presentes en las muestras clínicas que pueden ser tóxicos para las monocapas celulares (véase fig. 23-6A). Si hay desarrollo bacteriano o micótico (véase fig. 23-6B), la naturaleza del problema es evidente; la muestra debe tratarse nuevamente con antibióticos o filtrarse y sembrarse en cultivos celulares adicionales.

La naturaleza de la citotoxicidad casi siempre se desconoce. La solución habitual es diluir la muestra y sembrar monocapas adicionales. Howell y cols. encontraron que la toxicidad del semen de pacientes con SIDA puede evitarse sembrando la monocapa con un sedimento celular, obtenido por centrifugación a alta velocidad.²⁴⁷ El CMV, que es un patógeno frecuente en los pacientes con SIDA, se asocia con los leucocitos. Por otro lado, las sustancias tóxicas se concentran en el sobrenadante.

El efecto citopático puede a veces ser "específico", aunque la causa sea inesperada y quizás indeseable. La toxina de

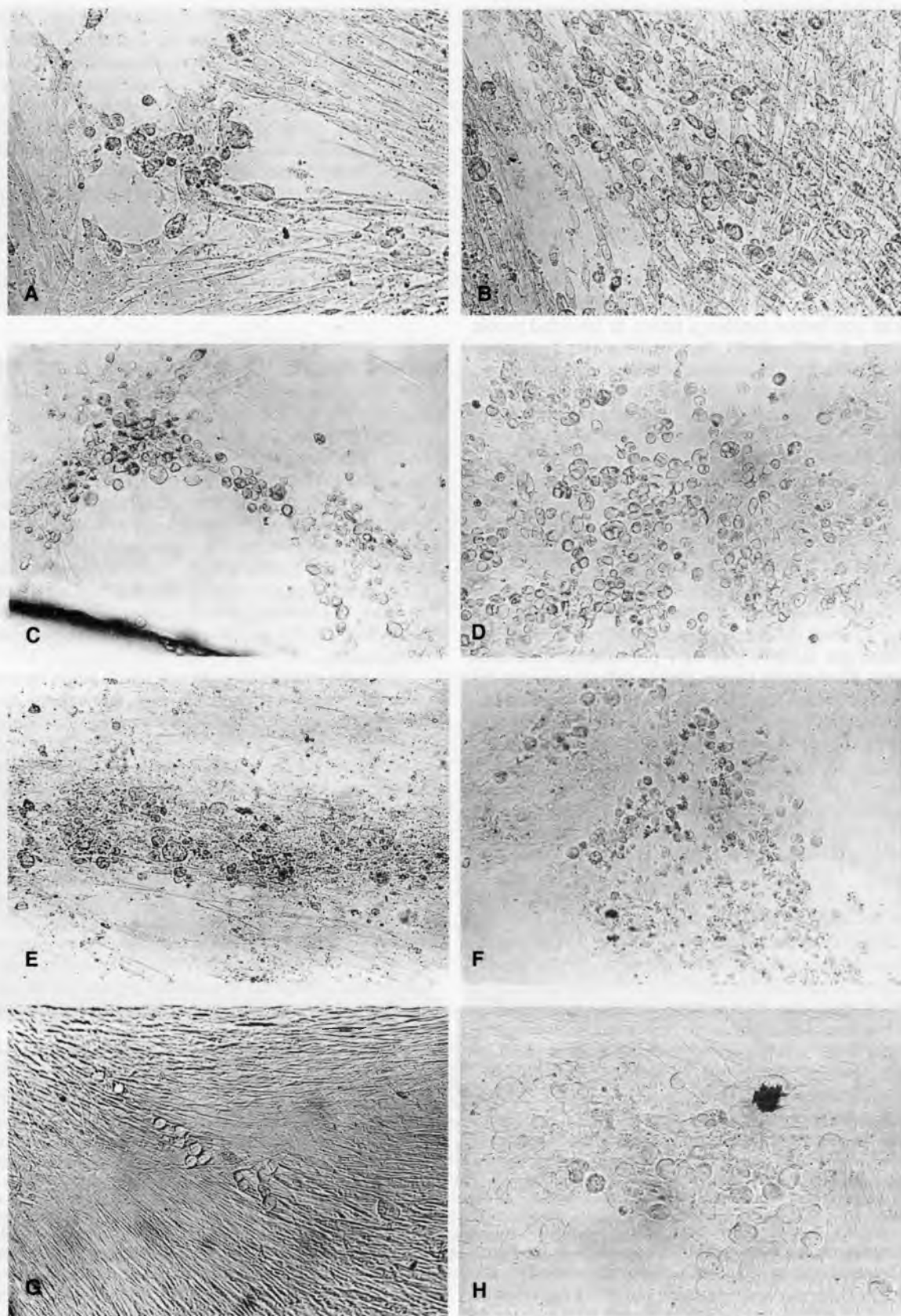


Figura 23-14 Efecto citopático de los herpesvirus. (A) Fibroblastos MRC-5 infectados por el virus del herpes simple. Se observa en la monocapa un foco de células redondeadas, agrandadas. Muchas se han desprendido del vidrio. Estos focos se agrandarán rápidamente y afectan con frecuencia la totalidad de la monocapa en algunos días (180×). (B) Fibroblastos MRC-5 infectados por el virus del herpes simple. El efecto citopático ha progresado de tal forma que casi todas las células de la monocapa están afectadas. Nuevamente se observan células agrandadas, incluso globulosas, y granulosas. Este tipo de efecto citopático generalizado

Clostridium difficile presente en muestras de heces (véase fig. 23-6C) puede causar un efecto citopático similar al daño que producen los enterovirus.⁴⁴¹

Gentry y cols. publicaron el aislamiento de *Trichomonas vaginalis* en cultivos de células BHK.¹⁸¹ Estos flagelados causan un efecto citopático similar al virus del herpes simple; el efecto citopático se reprodujo cuando se agregaron *Trichomonas* viables o lisados de cultivos axénicos a los cultivos celulares. Cuando los cultivos se examinaron con cuidado pudieron visualizarse tricomonas móviles.

Se ha publicado el aislamiento de *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) en pacientes con SIDA. La proliferación seriada de este parásito unicelular es difícil de lograr en el laboratorio, pero los microorganismos han desarrollado en cultivos celulares, incluidos fibroblastos diploides humanos MRC-5.³⁰³ Los aislamientos de *P. jirovecii* produjeron una acción citopatogénica que simulaba una acción viral. *Toxoplasma gondii* puede crecer en líneas de cultivos celulares, como fibroblastos diploides humanos, aunque no se ha evaluado la sensibilidad de los cultivos.⁹⁰

Identificación definitiva de los aislamientos

En un laboratorio de diagnóstico, la combinación de historia clínica y acción citopatogénica proporciona información suficiente para identificar algunos virus, como el del herpes simple, CMV, VZV, adenovirus y sincitial respiratorio. Los enterovirus pueden identificarse casi siempre a nivel de género. La identificación completa de los aislamientos, incluida la serotipificación, requiere la caracterización inmunológica de los antígenos virales o del ácido nucleico viral.

Las pruebas inmunológicas pueden adaptarse para identificar antígenos o anticuerpos dirigidos contra estos antígenos. Los antisueños, que tradicionalmente eran policlonales, están siendo reemplazados cada vez más por sueros monoclonales (véase cap. 3). La prueba inmunológica más específica para la mayoría de las infecciones virales es la prueba de neutralización. La identificación de un aislamiento viral desconocido se realiza por el análisis del grado con el cual un antisuero de reactividad conocida impide que el virus infecte células de cultivo de tejidos, huevos o animales. Las desventajas de las pruebas de neutralización son el tiempo y el costo necesarios para su realización. Se utilizan con mayor frecuencia en los laboratorios de referencia.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación representa una alternativa conveniente y económica de la prueba de neutralización para los virus que producen hemaglutininas. El principio es similar al de la prueba de neutralización, pero el punto final es la inhibición de la reacción de aglutinación mediada por el virus en lugar de la inhibición de su infecciosidad. Para caracterizar un aislamiento viral se utilizan sueros de referencia de reactividad conocida.

La prueba de fijación del complemento, la piedra angular del diagnóstico virológico durante muchos años, ha sido reemplazada por otros ensayos, más sencillos y fiables en la mayoría de los laboratorios.

Muchas pruebas virales son importantes para el análisis epidemiológico pero, con excepción de los mixovirus, rara vez son necesarias con fines diagnósticos de rutina. En los casos en los que se requiere una caracterización completa (p. ej., una enfermedad paralítica), el aislamiento puede enviarse a un laboratorio de referencia. Una exposición completa de la caracterización antigénica, que se encuentra más allá del alcance de este capítulo, puede encontrarse en los libros de texto sobre virología y diagnóstico virológico.^{248,284,462}

Para numerosos laboratorios de hospital, las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoenzimáticas proporcionan una alternativa viable por medio de las cuales puede realizarse la identificación definitiva de muchos virus a nivel de género o especie. Por fortuna, el catálogo cada vez más amplio de reactivos que se venden en el comercio, cuya calidad va en aumento, simplifica la tarea. Los enterovirus y los rinovirus son excepciones notables porque sus complicadas composiciones antigénicas dificultan la identificación definitiva sin las pruebas de neutralización.

Las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoenzimáticas tienen un principio similar, y difieren principalmente en el sistema de detección (véase cap. 3). La prueba de inmunofluorescencia se ha utilizado durante muchos años con diversas variantes. La prueba de fluorescencia directa es la más fácil de realizar, pero se requieren antisueños conjugados específicos. Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, con antiglobulina, proteína A del estafilococo o complemento, son más sensibles, pero a menudo menos específicas. A diferencia de la prueba directa, no son necesarios múltiples reactivos conjugados para realizar la prueba indirecta, pero el procedimiento es más largo ya que requieren múltiples pasos.

La fase sólida de las pruebas inmunoenzimáticas puede ser la misma muestra colocada en un portaobjetos. En este caso, la

puede verse en ocasiones con el citomegalovirus, si se encuentran presentes cantidades muy grandes de virus, como sucede en los pacientes con SIDA. El citomegalovirus puede distinguirse del virus del herpes simple por identificación de antígenos específicos y por demostración de que es necesaria la transferencia celular para reproducir el efecto citopático en forma eficaz en cultivos nuevos (180×). (C) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por el virus del herpes simple. Como sucede casi siempre al principio, este foco de efecto citopático se encuentra en el borde de la monocapa. Células agrandadas y redondeadas rodean el centro del foco, en el que las células ya se han desprendido del vidrio (180×). (D) Células HEp-2 infectadas por el virus del herpes simple. Se observa un gran foco de células hinchadas. Algunas tienen características de células gigantes multinucleadas, aunque es difícil delinear la morfología celular en un preparado sin teñir y con bajo aumento (180×). (E) Fibroblastos MRC-5 infectados por el virus de la varicela-zóster. El foco de efecto citopático consiste en grandes células degeneradas, hinchadas y granulosas. El foco se está extendiendo en dirección de los fibroblastos subyacentes. La aparición y la progresión lentas de los focos son características. La transferencia del efecto citopático requiere la transferencia de células infectadas. El efecto citopático tiene cierta similitud a la causada por el citomegalovirus; los focos de citomegalovirus tienden a ser más compactos y a diseminarse en forma centrífuga, sin tener una orientación lineal tan pronunciada (180×). (F) Células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas por el virus de la varicela-zóster. El foco de células agrandadas e hinchadas es menos evidente que sobre células MRC-5. Puede diferenciarse del producido por el virus del herpes simple por la velocidad con la que aparece y progresa. El citomegalovirus no causa efecto citopático en células de mono (180×). (G) Fibroblastos WI-38 infectados por citomegalovirus. Se observa en la monocapa un pequeño foco de células granulosas agrandadas (180×). (H) Fibroblastos MRC-5 infectados por citomegalovirus. Es evidente un foco de efecto citopático en evolución. Las células están hinchadas y el foco es bastante compacto. El efecto citopático del citomegalovirus aparece en forma tardía y progresa con lentitud. Tiende a ser más compacta y menos lineal que la producida por el virus de la varicela-zóster. La diferenciación con la varicela se efectúa por la historia clínica, por la demostración de células gigantes multinucleadas en el caso de la varicela y por la demostración de antígenos específicos (180×).

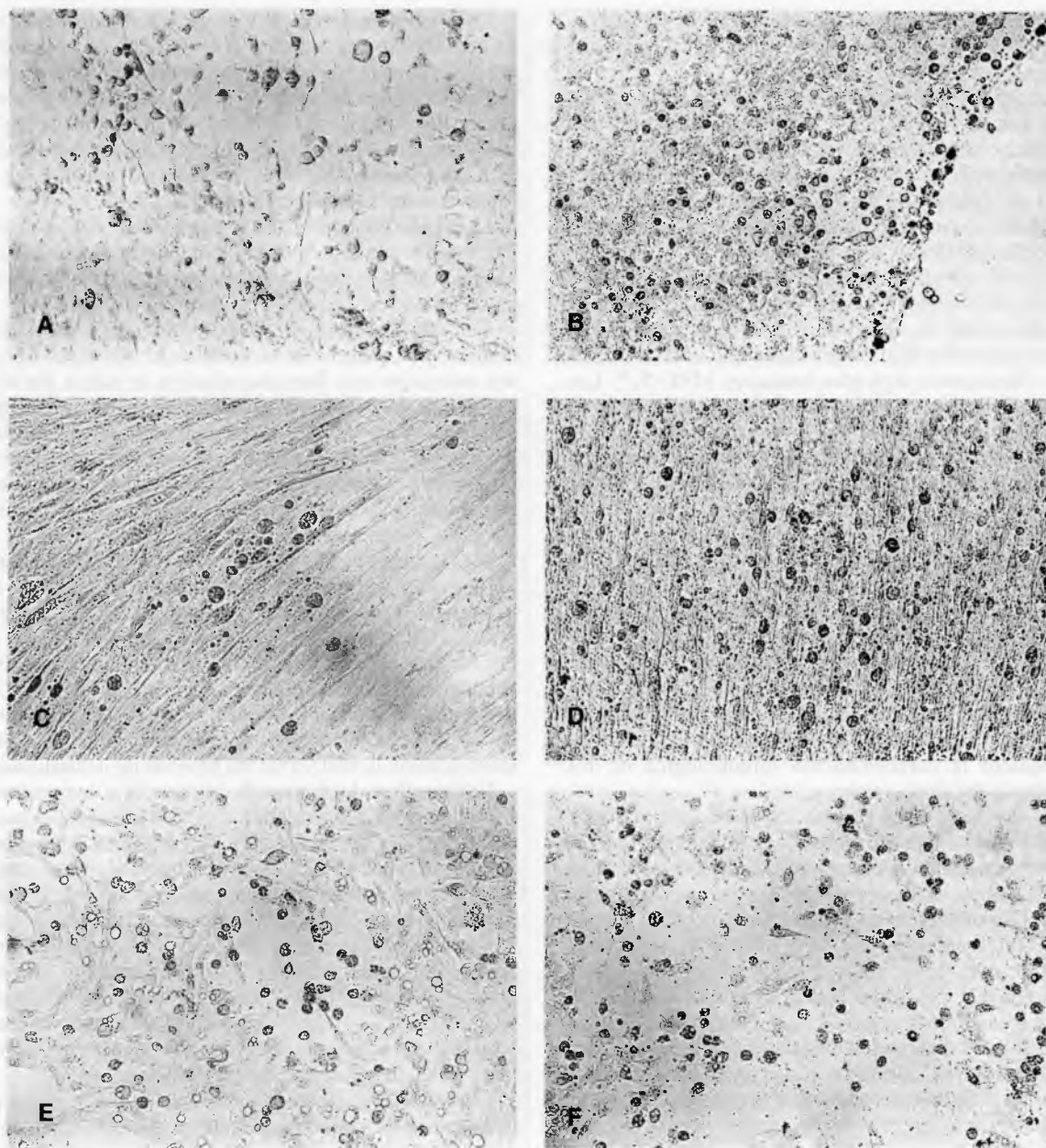


Figura 23-15 Efecto citopático de los enterovirus. (A) Células de riñón de mono *Macaca mulatta* infectadas por virus Coxsackie B. Se observa un foco de efecto citopático en el que las células están o bien pequeñas y contraídas, o bien agrandadas. Algunas tienen el aspecto refringente o vidrioso típico del efecto citopático de los enterovirus. Las células alargadas con forma de "renacuajo" también son características de la citopatología producida por este grupo de virus (180×). (B) Células de riñón de *Macaca mulatta* infectadas por virus Coxsackie B. El efecto citopático progresa de forma relativamente rápida en el caso de los enterovirus; el virus de la poliomielitis puede destruir por completo la monocapa de un día para el otro. En esta microfotografía casi todas las células de la monocapa están dañadas y grandes segmentos de la capa celular se han desprendido por completo (*abajo a la derecha*) (180×). (C) Fibroblastos MRC-5 infectados por echovirus 11. Se observa un foco de efecto citopático temprano. Las células aparecen agrandadas y granulosas. Puede ser difícil en este estadio certificar la identidad del virus. La mayoría de las cepas de echovirus se desarrollan bien en fibroblastos diploides humanos, en tanto que los aislamientos de virus coxsackie no lo hacen (180×). (D) Fibroblastos MRC-5 infectados por echovirus 11. El efecto citopático se ha extendido para afectar casi toda la monocapa. El virus se disemina en forma extracelular a través del medio de cultivo, de modo que el efecto citopático tiende a variar de localizado a generalizado, de manera bastante rápida (180×). (E) Células HEP-2 infectadas por virus coxsackie B. Un pequeño foco de efecto citopático se manifiesta en las células HEP-2 por células pequeñas, contraídas y desprendimiento de las células del vidrio. El efecto citopático temprano es mucho más difícil de detectar si la monocapa es muy densa y las células están superpuestas unas con otras (180×). (F) Células HEP-2 infectadas por virus coxsackie B. Casi todas las células de la monocapa se han desprendido del vidrio. Las que quedan tienen características anormales. La mayoría de los aislamientos de virus coxsackie B se desarrollan bien en células HEP-2, en tanto que el coxsackie A y los echovirus no lo hacen (180×).

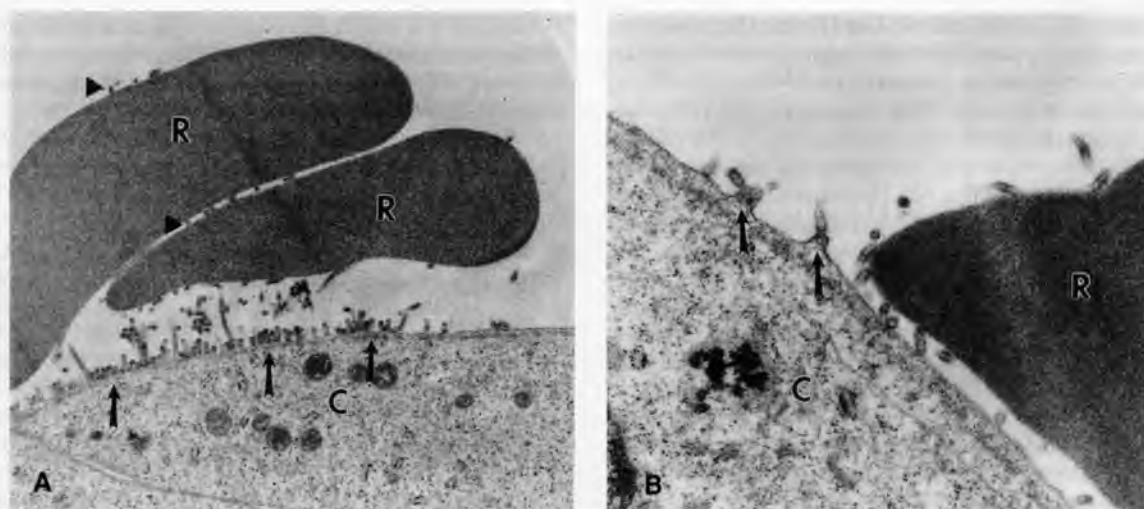


Figura 23-16 Microscopía electrónica de la hemadsorción y la hemaglutinación causadas por virus influenza A. (A) Dos eritrocitos (R) se han adherido a la monocapa de células de riñón de mono *Macaca mulatta* (C). El adhesivo que los mantiene unidos es la gran cantidad de viriones de influenza que están brotando (*budding*) en la superficie de las células renales (*flechas*) o que se encuentran adheridos a los eritrocitos (*puntas de flecha*) (35 000x). (B) Con mayor aumento, pueden verse con claridad las proyecciones de la membrana celular en los sitios de brotación (*flechas*). La espículas de la hemaglutinina y la neuraminidasa sobre las partículas virales tienen el aspecto de "flecós" (80 000x).

reacción se detecta visualmente con el microscopio. Los inmunoanálisis en fase sólida también pueden realizarse en tubos o microcubetas.

Los inmunoanálisis enzimáticos y por fluorescencia pueden considerarse equivalentes para la mayoría de las aplicaciones, aunque las pruebas de fluorescencia han sido ligeramente más sensibles en algunos casos.²⁹⁸ La inespecificidad ha sido un problema en algunos inmunoanálisis enzimáticos y deben incluirse controles de especificidad. Por otro lado, los ensayos visuales, como la inmunofluorescencia directa, están sujetos a una considerable variación entre observadores. Las pruebas en las cuales la reacción positiva se determina por microscopía tienen dos ventajas: 1) puede evaluarse la celularidad (y la calidad) de la muestra y 2) puede determinarse la relación del antígeno con las células.¹³⁰

La decisión acerca de qué prueba utilizar dependerá de los recursos locales, de la experiencia y de la cantidad de ensayos por realizar. La inmunofluorescencia es más sencilla que la mayoría de los inmunoanálisis enzimáticos para procesar pequeñas cantidades de muestras. Cuando la cantidad de muestras aumenta y las pruebas pueden realizarse en lotes, los enzimoimunoanálisis o las nuevas sondas moleculares son más atractivos porque pueden utilizarse sistemas automatizados. El advenimiento de inmunoanálisis sencillos sobre membranas ha hecho que esta técnica sea rápida y muy conveniente. Estos paquetes unitarios están destinados a la detección directa, pero también pueden usarse para la confirmación de cultivos.

En estas pruebas deben incluirse controles positivos y negativos, como se indica en el prospecto del envase. La especificidad de los enzimoimunoanálisis clásicos puede mejorarse mediante una prueba de bloqueo.⁴⁶

También se ha realizado la identificación de aislamientos virales por hibridación de ácidos nucleicos. Los métodos moleculares continuarán sin duda aumentando su popularidad, pero la extrema sensibilidad de la amplificación no es esencial cuando el cultivo ya ha proporcionado la amplificación que se precisa.

Conservación de los aislamientos virales

Si se cree que será necesaria una caracterización adicional de un aislamiento determinado, el sobrenadante del cultivo celular infectado debe congelarse a -70°C . Si el laboratorio tiene los medios, es de buena práctica conservar todos los aislamientos durante un tiempo determinado. Una regla general es que las células de mamíferos deben congelarse lentamente, en tanto que los agentes infecciosos deben congelarse con rapidez. El notable descenso de viabilidad que acompaña al proceso de congelación se reduce al mínimo si los cultivos se congelan en forma súbita (*snap freezing*) y se incluye un agente estabilizador en el medio. Una forma conveniente para la congelación súbita de agentes virales es una mezcla de hielo seco y alcohol. Se han utilizado muchos agentes estabilizadores. Howell y Miller encontraron que el caldo sacarosa fosfato que se usa como medio de transporte para el aislamiento de *Chlamydia* funciona tan bien como el sorbitol al 70% para el mantenimiento de algunos de los virus con requerimientos nutricionales especiales, como el citomegalovirus y el virus sincitial respiratorio.²⁴⁶

Resumen de la detección e identificación de los virus en cultivo

Los ortomixovirus, los paramixovirus y el virus sincitial respiratorio (véanse figs. 23-12 y 23-13) producen una variedad de acciones citopatógenicas en cultivos de tejidos. Muchos aislamientos de virus influenza y parainfluenza no causan alteraciones visibles en la monocapa y deben ser detectados por otros métodos. Las cepas citopatógenicas pueden diferenciarse de otros virus con efectos similares poniendo de manifiesto la restricción de la acción citopatógena a células de riñón de mono y por demostración de hemadsorción, como ya se describió. En las monocapas que han sido infectadas por virus del sarampión, virus sincitial respiratorio (véase fig. 23-13E y F), parainfluenza (véase fig. 23-12F) y virus de la parotiditis, se observan células gigantes multinucleadas; estas células son el resultado de la

fusión de células adyacentes causada por el virus (formación de sincitios). Este tipo de células también puede observarse en pacientes infectados (véase lámina en color 23-1F y G).^{470,526}

Los aislamientos se identifican en forma definitiva por métodos inmunológicos. Se cuenta con antisueros de buena calidad para la mayoría de los mixovirus habituales. El género o el tipo del virus (p. ej., virus influenza A o virus sincitial respiratorio) puede identificarse por inmunofluorescencia de las células infectadas. La caracterización de cepas de virus influenza debe realizarse por inhibición de la hemaglutinación.

Los adenovirus (véase fig. 21-13A a D) pueden identificarse presuntivamente por observación de la citopatología característica en cultivos celulares. Son típicos los grupos de células infectadas edematosas o el aspecto en encaje de la monocapa. Se han identificado antígenos específicos de grupo comunes a todos los serotipos de adenovirus y se han preparado anticuerpos monoclonales contra los determinantes comunes. Para la mayoría de las aplicaciones clínicas es suficiente la confirmación del género adenovirus por inmunofluorescencia. Si debe determinarse el tipo de adenovirus, es necesario realizar pruebas de neutralización.

El grupo de los herpesvirus produce diversas acciones citopatógenas en los cultivos celulares. El EBV no crece en los cultivos celulares habituales en los laboratorios clínicos; las infecciones causadas por este virus se diagnostican casi siempre por serología. El CMV y el VZV están íntimamente asociados con las células (véase fig. 23-14E a H). Su crecimiento es difícil en cultivos celulares y crecen con lentitud. El subcultivo exitoso requiere la transferencia de células infectadas. Tanto el CMV como el VZV producen células edematosas en focos que crecen lentamente por diseminación directa; las placas de VZV, en particular, tienden a seguir la orientación de los fibroblastos del cultivo de tejidos. En cambio, el virus del herpes simple se disemina en forma extracelular (véase fig. 23-14A a D); el efecto citopático comienza de manera localizada pero se disemina con rapidez para afectar otras zonas de la monocapa.

La centrifugación del inóculo sobre la monocapa ha acelerado el aislamiento de virus del herpes simple, VVZ y CMV. Los anticuerpos monoclonales han resultado valiosos tanto para la detección como para la identificación de CMV, VZV y virus del herpes simple. La separación de aislamientos de virus del herpes simple en tipos 1 y 2 puede lograrse de forma fiable mediante anticuerpos monoclonales con marcación fluorescente.³¹¹

Los enterovirus crecen con bastante rapidez en cultivos celulares y producen un efecto citopático diseminado (véase fig. 23-15). Las células afectadas pueden estar contraídas y con granulaciones o tener un aspecto refringente vidrioso. La mayoría de los serotipos de Coxsackie A no crecen bien en los cultivos celulares habituales. Los aislamientos de Coxsackie B no suelen crecer bien en líneas diploides de fibroblastos humanos; las cepas de echovirus no crecen bien en células HEP-2. La identificación definitiva de un enterovirus requiere la identificación serológica. En el comercio se venden anticuerpos monoclonales con marcación fluorescente dirigidos contra un antígeno específico de género y serotipos seleccionados. La inmunofluorescencia no es infalible, en especial para los enterovirus diferentes de los de la poliomielitis.⁴²⁰ El método de referencia para la identificación es la prueba de neutralización. Se ha demostrado que la secuenciación genética se correlaciona bien con los tipos serológicos.³²⁶

El coronavirus del SARS se detectó en un principio por técnicas de aislamiento, pero los métodos moleculares han superado a los cultivos debido a su rapidez y comodidad. El virus

se detecta con mayor facilidad en muestras respiratorias durante las primeras 2 semanas de la enfermedad y se aísla con poca frecuencia después de 3 semanas, aunque todavía puede detectarse el RNA viral.⁸⁵

Detección directa de virus en muestras clínicas

El deseo de obtener mayor rapidez en el diagnóstico de las infecciones virales ha sido estimulado por la disponibilidad de métodos de diagnóstico rápido en otras áreas del laboratorio y por el desarrollo de una terapéutica antiviral eficaz. Se dispone de numerosos métodos que varían desde los tradicionales hasta los experimentales.

Detección de cuerpos de inclusión por microscopía óptica

La detección de cuerpos de inclusión virales en frotis o tejidos por microscopía óptica ha sido el método tradicional para demostrar directamente una infección viral.^{470,526} En general, los virus que se ensamblan en el núcleo (habitualmente virus de DNA) producen inclusiones intranucleares, en tanto que el ensamblaje citoplasmático (en forma predominante, virus de RNA) da como resultado cuerpos de inclusión citoplasmáticos.

Las inclusiones intranucleares se encuentran en células que han sido infectadas por virus del herpes simple, VZV, CMV, adenovirus y papovavirus. Las inclusiones del virus del herpes simple (véase lámina en color 23-1A, B y C) y las del VZV son indistinguibles entre sí. Los núcleos presentan un aspecto homogéneo, eosinofílico o ligeramente basófilo y la cromatina nuclear basófila, granular, está desplazada contra el borde de la membrana nuclear. Otras células infectadas pueden presentar un cuerpo de inclusión más eosinófilo, que está acentuado por la presencia de un halo entre el cuerpo de inclusión y la membrana nuclear. Este halo es un artefacto de fijación, pero es útil desde el punto de vista diagnóstico. Ultraestructuralmente, los cuerpos de inclusión están compuestos por una mezcla de desoxirribonucleoproteína y viriones ensamblados (véase fig. 23-3A); a medida que los viriones atraviesan la membrana nuclear adquieren una membrana que contiene lípidos. Las células infectadas pueden ser mononucleadas o multinucleadas.

El citomegalovirus produce inclusiones basófilas en una célula agrandada (véase lámina en color 23-1D). Estas células distintivas, patognomónicas de infección por CMV, se consideraron al principio protozoos que estaban invadiendo el tejido.²⁵⁸ Con frecuencia se encuentra un halo alrededor del cuerpo de inclusión. En el citoplasma de algunas células infectadas pueden encontrarse inclusiones granulares basófilas.

En las infecciones causadas por adenovirus pueden encontrarse diversos cuerpos de inclusión. Las inclusiones tempranas son eosinófilas y pueden ser muy parecidas a las de las células infectadas por herpesvirus. Las inclusiones se hacen más basófilas a medida que maduran y llenan en forma progresiva el núcleo (véase lámina en color 23-1E). Por último, se hacen extremadamente basófilas y pueden deformar por completo la célula; estas células diagnósticas se denominan "células tiznadas" y deben diferenciarse de las células no infectadas con núcleos hipercromáticos. Los cuerpos de inclusión de los adenovirus están compuestos por nucleoproteína y numerosos viriones, que suelen exhibir un ordenamiento paracristalino porque su forma icosaédrica permite la agrupación cercana de las partículas (véase fig. 23-3B).

Los virólogos clínicos no encuentran a menudo las inclusiones intranucleares del grupo papovavirus, ya que es difícil o

imposible obtener desarrollo de estos virus en cultivo. Las inclusiones en las verrugas humanas comienzan como un material eosinófilo granular que más tarde se condensa para formar masas basófilas redondeadas; las inclusiones citoplasmáticas en las células epidérmicas de las verrugas están compuestas por queratina condensada y no son producidas por el virus. Las inclusiones de la leucoencefalopatía multifocal progresiva se observan en los astrocitos y en la oligodendroglía (células no nerviosas que tienen función de sostén); las inclusiones varían entre un material en gránulos pequeños y grandes masas basófilas que llenan el núcleo.

En las células infectadas por virus sincitial respiratorio, virus de la rabia y virus del grupo pox se pueden encontrar inclusiones intracitoplasmáticas. Las del virus sincitial respiratorio son eosinófilas y brillantes (véase lámina en color 23-1G); suelen hallarse en cultivos celulares, pero con menor regularidad en muestras clínicas y consisten ultraestructuralmente en ribonucleoproteína fibrilar (véase fig. 23-3C). Las inclusiones intracitoplasmáticas del virus de la rabia se conocen como cuerpos de Negri (véase lámina en color 23-1H). Pueden ser únicas o múltiples y se presentan en neuronas que tienen por otra parte aspecto saludable. Los bordes de las inclusiones están netamente definidos, como si estuvieran limitados por una membrana. Los espacios claros o el punteado basófilo que pueden observarse dentro del cuerpo de inclusión son el resultado de la incorporación de cierta cantidad de material citoplasmático a la masa de ribonucleoproteína viral (véase fig. 23-3E). Por fortuna, es improbable encontrar en la actualidad las inclusiones intracitoplasmáticas de los poxvirus, conocidas como cuerpos de Guarnieri.

En las infecciones sarampionosas se encuentran inclusiones intranucleares e intracitoplasmáticas. En el estadio prodrómico del sarampión aparecen células gigantes en el tejido linfático de todo el organismo. Estas células gigantes, denominadas células de Warthin-Finkeldey, contienen hasta 100 núcleos y rara vez contienen cuerpos de inclusión. Más tarde puede originarse un segundo tipo de células gigantes del tejido epitelial, como el que tapiza las vías respiratorias bajas. Estas células gigantes tienen menos núcleos, pero las inclusiones son casi constantes. Las inclusiones intranucleares recuerdan las producidas por los virus herpes, pueden ser únicas o múltiples y varían en su grado de eosinofilia (véase lámina en color 23-1F).

La detección de los cuerpos de inclusión proporciona información valiosa en determinadas situaciones clínicas. La prueba de Tzanck, que se realiza preparando frotis teñidos de raspados de las vesículas, puede usarse para demostrar la presencia de un herpesvirus por la observación de células gigantes multinucleadas (véase lámina en color 23-1C). También pueden utilizarse tinciones con hematoxilina-eosina o de Papanicolaou. Los núcleos deben tener un aspecto de vidrio esmerilado y estar multifacetados o moldeados.⁴⁵⁹ Las inclusiones intranucleares, que se acentúan en los cortes histológicos por el artefacto en forma de halo causado en los tejidos por la fijación con formalina, no siempre se ven en los frotis. Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de infección por herpes, aunque la diferenciación entre herpes simple y VZV no es posible sólo por criterios morfológicos.

Solomon y cols. encontraron pruebas de Tzanck positivas en 11 pacientes con varicela clínica (virus de la varicela) y en 12 de 15 pacientes (80%) con "culebrilla" (virus del herpes zóster). Sin embargo, se aisló el virus de la varicela en sólo 7 de los 11 pacientes con varicela.⁴⁵⁹ En lesiones cutáneas provenientes de 18 de 21 pacientes (86%) en las cuales se aisló virus del herpes simple, se demostraron células gigantes multinu-

cleadas, cuerpos de inclusión o ambos.³⁶³ Un análisis de la eficacia con la que los dermatólogos interpretaron en forma correcta un estudio compuesto por 10 frotis demostró la existencia de una "curva de aprendizaje inversa" (o de pérdida de sinapsis neuronales con el aumento de la edad).²⁰³ Los residentes de segundo y tercer año interpretaron en forma correcta, en promedio, el 91% de los frotis; los dermatólogos con menos de 10 años de práctica tuvieron un promedio del 84% de respuestas correctas; los dermatólogos con más de 10 años de práctica obtuvieron un 67% en promedio de diagnósticos correctos.

Aunque los frotis directos han funcionado bien para el estudio de las lesiones cutáneas, lamentablemente su sensibilidad ha sido baja para otras aplicaciones. Sólo una minoría de muestras positivas en cultivos, provenientes del aparato genital⁴⁷⁸ o del aparato respiratorio³⁷¹ contenían células con cuerpos de inclusión. Asimismo, Nahmias y cols. hallaron inclusiones intranucleares en sólo el 56% de 113 casos de encefalitis causada por el virus del herpes simple.³⁷⁰ La especificidad fue mucho más alta (86%) que la sensibilidad en este estudio en colaboración sobre terapéutica antiviral, pero los resultados positivos falsos son peligrosos si llevan a omitir el tratamiento para algún otro cuadro, como un acceso cerebral bacteriano. Se informaron inclusiones intranucleares en 10 pacientes en los cuales no se aisló virus del herpes simple; en 7 de éstos, se estableció un diagnóstico alternativo no asociado con los cuerpos de inclusión. Estos resultados subrayan la importancia de la utilización cuidadosa e informada de las pruebas morfológicas "sencillas".

La detección histológica de cuerpos de inclusión del CMV en tejidos es menos sensible que el cultivo, pero puede ser equivalente a la de técnicas más "sofisticadas", como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*, para revelar la presencia de citomegalovirus en los tejidos.⁴⁷¹ Los métodos morfológicos tienen la ventaja de correlacionarse mejor con la enfermedad causada por el citomegalovirus que el cultivo, aunque éste sea más sensible.

En la infección por parvovirus B19 se hallan también cuerpos de inclusión intranucleares dentro de pronormoblastos gigantes, que se encuentran en la médula ósea.²⁸⁸ Estas células características también pueden verse en sangre periférica y otros tejidos en fetos infectados.

Detección de partículas virales por microscopía electrónica

La microscopía electrónica puede aplicarse al estudio tanto de muestras clínicas como de cultivos celulares, ya sea en cortes de tejido delgados o por microscopía con tinción negativa. La falta de disponibilidad de un microscopio electrónico en la mayoría de los laboratorios clínicos y los errores de muestreo inherentes al examen de pequeñas muestras de tejido han conspirado en contra de la aplicación sistemática de esta técnica para el diagnóstico virológico. En un estudio, el uso de la microscopía electrónica fue específico para el diagnóstico de encefalitis causada por herpes simple (98%), pero los viriones herpéticos se detectaron sólo en el 45% de los casos.³⁷⁰ La técnica se utilizó eficazmente para la detección de los agentes virales de la gastroenteritis, en especial los que no se aíslan en cultivos celulares convencionales (rotavirus, agentes similares al Norwalk y adenovirus entéricos). No obstante, el diagnóstico ultraestructural sigue siendo una técnica de investigación en la mayoría de los laboratorios.

La microscopía electrónica con tinción negativa ha despertado renovado interés como resultado de la preocupación planteada por el bioterrorismo. Cuando se examina una muestra

con el microscopio electrónico, no hay requisitos previos de qué antígeno o ácido nucleico debe ser detectado. El diagnóstico de infecciones virales importantes, como la viruela, puede hacerse con rapidez y seguridad si la muestra puede inactivarse antes de ser examinada.²¹⁹

Detección inmunológica de antígenos virales

Las técnicas inmunológicas, y más recientemente, las técnicas moleculares, se han utilizado con eficacia para acelerar el diagnóstico de ciertas infecciones virales. La tinción por inmunofluorescencia o inmunoenzimática de muestras clínicas o tejidos son técnicas utilizadas con frecuencia. Los ensayos moleculares están complementando o reemplazando cada vez más a las técnicas inmunológicas.

Estas técnicas tienen muchas ventajas y funcionan bien cuando son utilizadas por personal entrenado. El riesgo de resultados erróneos es grande si no existe el equipamiento y el entrenamiento adecuados.¹³⁰ Para casi todos los procedimientos el estándar sigue siendo el cultivo del agente infeccioso. Siempre que sea posible, los cultivos deben efectuarse en paralelo con pruebas inmunológicas rápidas hasta que se demuestre la eficiencia en la realización de la técnica.

VIRUS RESPIRATORIOS

El método de detección antigénica más fiable para los virus respiratorios es la inmunofluorescencia directa (IFD). En un estudio, la IFD fue tan eficaz como el cultivo para todos los virus respiratorios, excepto los adenovirus. Cuando los portaobjetos para inmunofluorescencia se preparan en una citocentrífuga, menos del 10% de las pruebas tienen una cantidad inadecuada de células respiratorias.²⁹⁷ En cambio, la sensibilidad de las pruebas inmunoenzimáticas, sobre todo en sus formatos rápidos, ha sido mucho más baja en la mayoría de los informes.^{2,84,298,414} Además, algunos inmunoanálisis han producido la suficiente cantidad de positivos falsos como para hacer necesaria la confirmación por un segundo método.²

Aunque la inmunofluorescencia directa es sin duda el mejor de los dos métodos, por razones prácticas a menudo se eligen pruebas inmunoenzimáticas. Estas últimas se realizan con rapidez y simplicidad sin necesidad de poseer un microscopio de fluorescencia ni de un entrenamiento especial del personal.

VIRUS DEL GRUPO HERPES

Virus del herpes simple. La inmunofluorescencia directa en general ha tenido buenos resultados en comparación con el cultivo, sobre todo cuando se efectúa en lesiones visibles y se perfecciona por citocentrifugación.^{299,415,430} Los resultados variables pueden reflejar las diferencias de reactivos, de poblaciones de pacientes, de tipo de lesiones y de serotipos del virus. Sin embargo, el virus del herpes simple se desarrolla con rapidez en el cultivo, por lo que las ventajas de un diagnóstico acelerado no son tan marcadas como con otros virus de crecimiento más lento.

Virus de la varicela-zóster. El VZV se desarrolla lentamente en el cultivo. No es sorprendente que la inmunofluorescencia directa tenga mejor rendimiento que el VZV que con el virus del herpes simple. En realidad, la IFD de lesiones de la piel puede ser la mejor forma de establecer el diagnóstico.¹¹¹ Además del examen directo de frotis del material, la tinción de los preparados obtenidos por citocentrifugación del medio de transporte han demostrado ser útiles.³⁴²

Citomegalovirus. Los anticuerpos monoclonales han facilitado el diagnóstico inmunológico rápido de las infecciones por CMV en muestras de pacientes, así como en cultivos celulares. Hackman y cols. pudieron detectar CMV por inmunofluorescencia en 25 de 27 muestras de biopsia de pulmón, de las cuales luego se cultivó el virus;²⁰⁶ se demostraron cuerpos de inclusión por microscopía óptica en sólo 20 de las muestras. Estudios preliminares con muestras de lavado broncoalveolar provenientes de pacientes inmunosuprimidos^{108,141,331} han arrojado estimaciones muy diferentes en lo que respecta a la sensibilidad, que varía del 31,6% al 100%. La cantidad de pacientes en estos estudios era pequeña, los anticuerpos eran diferentes y la composición de los grupos de pacientes puede haber sido distinta. La correlación de la detección inmunológica de antígeno viral en tejidos (sin cuerpos de inclusión o anomalías histopatológicas) con la enfermedad clínica no está aclarada.

La detección de antigenemia para el CMV es más sensible que el cultivo,^{31,508} se vende en el comercio y ha reemplazado al cultivo en muchos laboratorios. La toxicidad de la sangre para las monocapas celulares ha limitado la utilidad de los cultivos. En la prueba para antigenemia, la fracción abundante en leucocitos de una muestra de sangre periférica se examina en busca de la presencia de pp65, un antígeno temprano/intermedio que se produce en el curso de la infección de las células por CMV. Una de las mayores desventajas de la prueba de antigenemia, la cantidad de horas-hombre requeridas, se ha superado en gran medida por el desarrollo de procedimientos de inmunofluorescencia comerciales rápidos.^{296,464} La prueba ha resultado de utilidad para predecir la enfermedad clínica y para controlar la respuesta a la terapéutica antiviral en los pacientes de alto riesgo, en especial los receptores de trasplantes de órganos.⁵⁴ El valor de la prueba en pacientes infectados por el HIV es más discutido.^{31,92} Los protocolos para el momento y la frecuencia de realización de la prueba varían entre los principales centros de trasplante. En algunos casos, la prueba se realiza de manera habitual durante un período después del trasplante; en otros, la aparición de síntomas clínicos determina el pedido de la prueba. Cuando la densidad de la suspensión celular está estandarizada, puede hacerse una determinación cuantitativa del grado de antigenemia. La leucopenia intensa a veces dificulta el examen de una cantidad suficiente de células. La cuantificación del nivel de antigenemia es importante: la antigenemia de alto nivel (> 50 neutrófilos infectados cada 2×10^5 células) indica el mayor riesgo de enfermedad inminente, de ineficacia de la terapéutica antiviral o de posible recaída. La prueba de antigenemia para CMV sigue siendo el método de referencia y es muy útil cuando se examinan pocos pacientes.³⁴¹

OTROS VIRUS

Los rotavirus humanos son difíciles de aislar en cultivos celulares. Las infecciones causadas por estos virus pueden diagnosticarse en forma eficaz, ya sea por un ensayo inmunoenzimático o por aglutinación de partículas del látex. La sensibilidad para ambos métodos ha variado entre el 80% y el 90%; la especificidad ha sido del 90% al 100%.^{98,140,480} Krause y cols. han cuestionado la fiabilidad del inmunoanálisis Rotazyme® en recién nacidos.²⁸⁹

Técnicas moleculares

La era molecular se encuentra inextricablemente unida a las enfermedades infecciosas desde su mismo origen, y el ritmo de innovaciones no parece disminuir. Ya hemos atravesado varias

etapas, comenzando con la hibridación de ácidos nucleicos hasta concluir con la técnica de amplificación molecular (véase cap. 4). La reacción en cadena de la polimerasa y otros métodos de amplificación han ganado un lugar en los laboratorios clínicos para algunos patógenos muy importantes, lo que ha justificado la presentación de productos comerciales.⁴⁹²

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Las únicas pruebas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) para el diagnóstico inicial de infecciones por HIV son las pruebas para anticuerpos. La detección molecular no se recomienda para este propósito, porque existen reacciones positivas falsas ocasionales.⁴¹⁷ Esta política es análoga al enfoque para la sífilis, en la que la especificidad de la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) se salvaguarda usándola sólo en una población de pacientes con una probabilidad anterior alta de tener sífilis porque ya han tenido una prueba VDRL o de reagin plasmática rápida (RPR) positivas (véase cap. 20).

Una vez que se hace el diagnóstico, el manejo de la infección por HIV-1 se basa por completo en los métodos moleculares. Sin embargo, hay dos situaciones en las que la comprobación de la carga viral es adecuada para el diagnóstico inicial. En ambos casos puede no haber habido tiempo suficiente para que se desarrolle una respuesta serológica. La primera situación es la infección aguda por el HIV, que puede manifestarse como una enfermedad febril multifacética con síntomas referibles a cualquier sistema orgánico.²⁶⁹ Esta enfermedad inicial es transitoria y no suele durar más de 14 días. Puede haber grandes cantidades de virus antes de que se genere la respuesta inmunitaria. La segunda situación clínica es la infección neonatal, cuando se sabe que la madre está infectada. En este caso es necesaria la detección molecular del virus, porque los anticuerpos transferidos pasivamente a través de la placenta al recién nacido complican el análisis serológico.

La columna vertebral del control del curso de la infección y de la respuesta a la terapéutica antiviral es la medida cuantitativa del RNA viral, las denominadas pruebas de carga viral. La detección cualitativa de RNA es el método actual para la detección sistemática en hemoderivados antes de la transfusión, pero no se usa para manejar las infecciones de pacientes. La detección cuantitativa del RNA viral se ha hecho en diversas muestras, como líquidos corporales, suero y leucocitos de sangre periférica. Sin embargo, la muestra estándar es el plasma. Se han usado tres métodos moleculares en las pruebas de carga viral aprobadas por la FDA y un cuarto se ha utilizado como ensayo cualitativo para la detección sistemática en bancos de sangre.

La reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR) ha sido la plataforma predominante. Las pruebas Amplicor HIV-1 monitor® y COBAS Amplicor HIV-1 monitor® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) se presentan en un formato estándar y como prueba ultrasensible, que fue introducida para descubrir bajas cantidades de copias después del tratamiento antiviral eficaz. Las versiones manuales y automatizadas tienen un rendimiento similar.^{226,238} El rango dinámico es de 400 a 750 000 copias por mililitro (estándar) y 50 a 75 000 copias por mililitro (ultrasensible). El segundo enfoque usa DNA de cadena ramificada (bDNA; Versant HIV-1 Assay®; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) que proporciona resultados reproducibles en un rango de copias de 75 a 500 000 por mililitro.³⁶⁵

Otros enfoques incluyen la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA; NucliSens HIV-1 QT®; BioMérieux, Durham, NC)¹⁸⁵ para la determinación cuantitativa de carga viral y un análisis cualitativo de amplificación mediado por transcripción (TMA; Gen-Probe, San Diego, CA).¹⁸³ Estos análisis no han sido aprobados todavía por la FDA para probar muestras clínicas, aunque el procedimiento TMA ha sido autorizado para la detección sistemática de muestras de bancos de sangre. Se describieron análisis en tiempo real de varios tipos que tendrán, sin duda, mayor importancia en el futuro.^{118,383}

Las dos estrategias principales (PCR y bDNA) tienen un rendimiento equivalente para la cuantificación de cepas del grupo M (las cepas predominantes en los Estados Unidos), pero las pruebas de PCR no son tan buenas para detectar las cepas del grupo O⁴⁷⁴ o las cepas no pertenecientes al clado B²⁵⁶ como los procedimientos de bDNA. El coeficiente de variación de las pruebas de carga viral es alto, y varía en los casos típicos de 30 a 40 (según la cantidad de virus presente) y el número de copias no puede compararse directamente entre diferentes enfoques moleculares. Por consiguiente, es esencial seguir a los pacientes en forma secuencial con el mismo tipo de prueba; si el ensayo se cambia a un enfoque diferente, debe establecerse un nuevo valor basal para el paciente.

Los tubos de plástico y los tubos Vacutainer® de vidrio para la obtención de sangre para realizar pruebas de carga viral son equivalentes.³⁰⁰ Los tubos Vacutainer para preparación de plasma (PPT) son un método conveniente para obtener sangre si se congelará o se enviará a un laboratorio de referencia para efectuar las pruebas.²³⁷ Se ha registrado una amplia variación en los informes de pacientes proporcionados a los médicos por los laboratorios clínicos, incluidos informes incompletos o inútiles.¹⁶⁴

Con el advenimiento de la terapéutica antiviral eficaz, la detección de resistencia en los aislamientos clínicos se ha transformado en una prioridad. La relevancia clínica de las pruebas de resistencia pronto se hizo evidente¹³⁸ y se han publicado recomendaciones consensuadas actualizadas.²²⁹ Las pruebas de resistencia se recomiendan en las mujeres embarazadas y después del fracaso de la terapéutica antiviral, ya sea la terapia primaria o regímenes posteriores. En este momento está claro que la evaluación de la resistencia es útil para tratar a los pacientes recién infectados (infectados dentro de los 12 meses anteriores a la prueba), en particular si se sabe que el individuo que es la fuente de infección ha estado tomando antirretrovirales. Además, la realización de pruebas a pacientes que han estado infectados durante 2 años (y quizá más) se ha encontrado útil para diseñar regímenes terapéuticos.²²⁸

Se han usado dos enfoques para detectar resistencia. La evaluación de la resistencia fenotípica involucra el aislamiento del virus y la evaluación tradicional de inhibición por fármacos antivirales. La complejidad del aislamiento viral ha llevado a usar un mecanismo alternativo, en el que el RNA plasmático de los genes de la polimerasa y la proteasa se amplifica y se usa para fabricar un virus recombinante con estructuras de laboratorio. Usando de soporte un virus estándar en el que se han insertado los dos genes más importantes de la cepa del paciente, se ha mejorado la estandarización del ensayo. Las pruebas de sensibilidad a los fármacos pueden realizarse en el término de varias semanas, usando métodos automatizados y genes indicadores. Los ensayos fenotípicos son Pheno-Sense® (ViroLogic, South San Francisco, CA) y The Anti-virogram® (VIRCO Lab USA, Raritan, NJ).

A diferencia de los ensayos fenotípicos, que miden la sensibilidad viral, los ensayos genotípicos detectan las mutaciones que confieren la resistencia fenotípica.⁴⁴⁷ El paso inicial en los ensayos basados en PCR es similar al enfoque recombinante fenotípico: amplificación de las secuencias de HIV-1 de muestras de plasma que contienen 500 a 1 000 copias por mililitro. Por consiguiente, este enfoque genotípico no funciona con muestras que contienen una cantidad pequeña de virus. El siguiente paso consiste en genotipificar todos los codones pertinentes o en detectar codones seleccionados por hibridación.^{212,229} Varias compañías han intentado predecir el fenotipo por el análisis del resultado genotípico: el denominado fenotipo virtual. Los ensayos genotípicos son The VirtualPhenotype® (VIRCO), GeneSeq HIV® (ViroLogic), ViroSeq® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y Trugene HIV-1® (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY).

Los ensayos fenotípicos tienen el atractivo de proporcionar una evaluación más directa (y tradicional) de la resistencia, aunque la interpretación clínica de los resultados no está completamente definida ni es sencilla. En el caso de los pacientes en los que han fracasado varios regímenes de tratamiento, los ensayos genotípicos pueden documentar muchas mutaciones virales que son difíciles de interpretar; en esta situación, los análisis fenotípicos pueden proporcionar una mejor orientación. Los fenotipos tienen la considerable desventaja de ser laboriosos y caros.

Los ensayos genotípicos son más sencillos, más rápidos y menos caros; el problema reside en que a veces la resistencia fenotípica importante no se detecta con precisión y la importancia de las nuevas mutaciones no es clara. Para ambos enfoques, la reproducibilidad y la complejidad de los análisis son factores importantes. Otro problema es que una minoría de viriones resistentes en la población de diferentes viriones que constituye la cepa infectante de un paciente determinado pueden ser pasados por alto (en forma análoga al problema de detectar células resistentes en una población de bacterias heterorresistentes, como se explica en el cap. 17).⁴⁴⁷

Aunque la preocupación sobre los ensayos genotípicos no se ha disipado, estudios comparativos han demostrado una buena correspondencia entre los ensayos genotípicos y fenotípicos para los mecanismos de resistencia clínicamente importantes.⁴³ A medida que se adquiere experiencia y se perfeccionan los productos comerciales, se ha establecido la reproducibilidad y fiabilidad de la genotipificación.^{172,197}

Hay evidencias de que las pruebas de resistencia pueden predecir la respuesta a la terapia antiviral o el tiempo que transcurrirá hasta la supresión del virus.^{196,538} Sin embargo, los factores que determinan el éxito o el fracaso del tratamiento de cualquier infección son complejos. Como sucede con todos los informes de laboratorio, los resultados de las pruebas de resistencia del HIV deben ser interpretados por un médico experimentado a la luz de todos los datos disponibles. Continúa la búsqueda de un algoritmo útil que facilite la toma de decisiones clínicas.⁴⁴⁷

VIRUS DE LA HEPATITIS C

El enfoque diagnóstico para el virus de la hepatitis C es similar al de las infecciones por HIV.^{25,398} La identificación de pacientes infectados se realiza en forma óptima por métodos serológicos. Sin embargo, para diferenciar los pacientes en quienes se ha eliminado la infección de aquellos que están infectados crónicamente y tienen riesgo de enfermedad crónica, es necesario determinar si hay virus circulante.³⁹⁸ La detec-

ción molecular es la única opción, porque el virus de la hepatitis C nunca ha sido cultivado in vitro.

Se comercializan varios ensayos cualitativos: prueba Cobas AmpliCor HCV versión 2.0® (Roche Diagnostics) que usa la técnica PCR, y Versant HCV RNA Qualitative Assay® (Bayer Diagnostics), que emplea TMA (pruebas de amplificación molecular). Los dos ensayos tienen un rendimiento similar, aunque el enfoque con TMA es algo más sensible y menos engorroso.²⁸⁷

Las pruebas cuantitativas (carga viral) son necesarias para el control del tratamiento. Existen ensayos comerciales basados en PCR (Cobas AmpliCor HCV Monitor Test v2.0®; Roche Diagnostics) y en bDNA (Versant HCV RNA Test v3.0®; Bayer Diagnostics). La prueba basada en bDNA se considera de alta fiabilidad y reproducibilidad. Es menos sensible que la prueba basada en PCR, pero esta última infravalora la carga viral.^{23,355} Es probable que se disponga de pruebas en tiempo real en el futuro. Como sucede con el HIV, un paciente determinado debe ser seguido con la misma prueba. Aunque son útiles para controlar la terapéutica antiviral, no se ha demostrado que ninguna de las pruebas tenga correlación con el pronóstico.

El tercer componente del enfoque molecular al virus de la hepatitis C es la genotipificación, que es necesario realizar una sola vez.²⁵ Se han usado como diana varias partes del genoma; dos ensayos comerciales usan como diana la región 5' no codificante, por un método de secuenciación directa estandarizado (Trugene HCV 5'NC®; Visible Genetics, Toronto, ON, Canadá) o por una sonda de hibridación inversa (INNO-LiPA HCV II®; Bayer Diagnostics). Los dos ensayos proporcionaron resultados genotípicos congruentes en el 99,4% de 172 muestras clínicas, que incluyeron seis genotipos del virus de la hepatitis C.^{177,376} Sin embargo, a nivel de subtipo, hubo sólo un 68,2% de concordancia. En alrededor del 15% de las muestras de cada ensayo no se determinó el serotipo o la determinación del subtipo fue ambigua. Por lo tanto, estos dos métodos comerciales son útiles para la genotipificación, pero no deben usarse para la subtipificación.

VIRUS DE LA HEPATITIS B

Las pruebas para el diagnóstico molecular para el virus de la hepatitis B no han logrado la utilización que alcanzaron las de la hepatitis C, porque la variedad de pruebas serológicas disponibles para la hepatitis B ha cubierto la mayor parte de las necesidades. Sin embargo, la detección de DNA viral en sangre, que es la definición de infección activa, es más sensible que la presencia de HBeAg y pueden encontrarse precocemente virus mutantes en ausencia de seroconversión para HBeAg.²⁵ No obstante, la detección molecular no se recomienda aún para todos los pacientes infectados; debe reservarse para los que son candidatos a la administración de antivirales. Los métodos comerciales, ninguno de los cuales ha sido aprobado todavía por la FDA para uso clínico, son la captura de híbridos, bDNA y PCR.⁵²⁹ Los ensayos que usan PAM y PCR en tiempo real están en desarrollo. Se ha planteado la preocupación de que algunos de ellos no sean suficientemente sensibles para el control fiable de la terapéutica antiviral eficaz.⁴⁸⁷ Además, se han creado varios ensayos comerciales de genotipificación. Sin duda, a medida que aumente la experiencia con el tratamiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis B y la resistencia se haga más prevalente, estas pruebas asumirán cada vez mayor importancia.

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El diagnóstico molecular es el único enfoque práctico para este grupo de virus. Las técnicas laboriosas, como la hibridación de ácidos nucleicos por el método de Southern blot (véase la edición anterior de este libro) han sido reemplazadas por métodos más convenientes y sensibles. La única prueba comercial aprobada por la FDA para uso diagnóstico es el ensayo de captura híbrida (Hybrid Capture II HPV®, Digene, Gaithersburg, MD). La segunda generación de esta prueba ha mejorado mucho en sensibilidad en comparación con la versión inicial; los resultados son reproducibles,⁵⁹ aunque debe tenerse gran cuidado con los detalles técnicos del procedimiento. Sólo está aprobada para probar muestras genitales y está disponible para dos grupos de virus: HPV con riesgo mínimo para neoplasia cervical y genotipos con riesgo moderado a alto. Las recomendaciones consensuadas sugieren usar sólo el panel de alto riesgo.⁵²⁷

Una tercera generación del ensayo de captura híbrida, que está en desarrollo, puede tener una sensibilidad ligeramente superior y una especificidad similar.⁶⁰ Se han informado métodos de amplificación dirigida, como PCR y PCR en tiempo real, pero no están aprobados para el uso diagnóstico.⁴⁴⁸

PARVOVIRUS B19

Las infecciones por parvovirus suelen diagnosticarse en forma clínica o serológica; la valoración de riesgo se basa en el nivel inmunitario (inmune). Sin embargo, a veces es útil la documentación virológica de una infección grave. El parvovirus no crece en cultivo, de modo que la detección molecular es el único método disponible. Se han ideado varios ensayos de amplificación,^{112,122,213} aunque no está aprobada por la FDA, la detección molecular se realiza en los laboratorios de referencia.

VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL

El recién llegado a la lista de virus transmitidos por artrópodos, el virus del Nilo Occidental, se ha transformado en un problema clínico importante en los Estados Unidos. Los medios preferidos de diagnóstico son el análisis serológico de sangre y LCR.³⁹⁶ La detección molecular de ácido nucleico viral en LCR no es suficientemente sensible para reemplazar las pruebas serológicas y sigue siendo un tema de investigación.^{295,385}

VIRUS DEL HERPES SIMPLE

El principal abordaje de diagnóstico de las infecciones por el virus del herpes simple es el cultivo, que proporciona un resultado relativamente rápido con este virus. Se han necesitado biopsias de cerebro para conseguir una muestra apropiada para el diagnóstico por cultivo de la encefalitis, que es la infección herpética más grave en los adultos, porque el virus no se aísla en forma fiable en el LCR. Sin embargo, la detección amplificada por PCR es suficientemente sensible para lograr la identificación del DNA viral en el LCR, tanto en las encefalitis como en las meningitis recurrentes.^{349,452} Aunque no hay ningún producto comercial aprobado por la FDA, la prueba se ha adaptado al protocolo de PCR en tiempo real y está fácilmente disponible como prueba validada en varios laboratorios de referencia. La preparación de DNA para la amplificación puede lograrse bien tanto por métodos manuales como automatizados.¹⁴⁷ Por fortuna, el DNA es lo suficientemente estable como para que puedan guardarse las muestras sin una disminución en la sensibilidad a 4 °C, ya sea como DNA extractado o como muestra sin extraer, durante un máximo de 16 meses antes de

hacer la prueba de PCR en tiempo real.²⁵⁷ Los recursos del laboratorio pueden mejorarse mediante la detección sistemática de muestras en busca de pleocitosis en el LCR antes de hacer las pruebas, porque se ha demostrado la presencia de neutrófilos en todas las muestras positivas, por lo menos en los adultos.⁴⁵¹ Sin embargo, los niños con encefalitis pueden tener muy pocos neutrófilos en el LCR y las pruebas de PCR iniciales pueden ser negativas si se realizan muy temprano en el curso de la infección.¹¹⁹

Aunque la PCR en tiempo real es muy útil para diagnosticar la encefalitis herpética, la amplificación molecular ha resultado más sensible que el cultivo para detectar infecciones de las mucosas.⁴⁹⁷ A medida que estos ensayos se simplifican, podrá proporcionarse una detección sistemática a las mujeres embarazadas cerca del término con mayor facilidad que en este momento.

CITOMEGALOVIRUS

El ensayo de antigenemia se ha transformado en el método de referencia para controlar las infecciones por CMV en pacientes inmunosuprimidos. Los intentos iniciales de sustituirla por ensayos de amplificación molecular se vieron impedidos por la mala correlación con la enfermedad clínica, debido a su alta sensibilidad. Más tarde, diversos ensayos cuantitativos se han correlacionado bien con la enfermedad clínica y con el ensayo de antigenemia. Los métodos que se usaron con éxito son PCR, PCR en tiempo real y la captura híbrida.^{53,125,232,310,341} Uno de los factores que pueden considerarse para seleccionar un ensayo es la cantidad de pruebas que se prevé realizar.³⁴¹

Los usuarios de la amplificación molecular deben tener presente una particularidad: a diferencia del virus del herpes simple, la cantidad de CMV detectada en plasma aumenta con el tiempo cuando la muestra se guarda a 4 °C, al parecer por la liberación de ácido nucleico de leucocitos infectados.⁴³⁴ En el caso de muestras positivas en el ensayo de antigenemia hubo pocos cambios en el resultado de la amplificación; sin embargo, si el paciente estaba infectado en forma latente y la prueba de antigenemia había sido negativa, la cantidad de virus en plasma aumentó significativamente con el tiempo.

ENTEROVIRUS

Se sospecha que el cultivo, que ha sido el apoyo diagnóstico principal para los enterovirus, es bastante insensible. Esta impresión se ha confirmado con la aparición de pruebas genéticas de amplificación actualmente en uso en muchos laboratorios de referencia (aunque ninguna ha sido aprobada todavía por la FDA para uso diagnóstico). Los ensayos incluyen PCR, PCR en tiempo real y NASBA.^{37,293,301} Como no existe ningún agente antiviral de uso general para las infecciones por enterovirus, el diagnóstico rápido no es tan imprescindible como en el caso del virus del herpes simple, pero el diagnóstico rápido de laboratorio facilitaría el manejo clínico.

CORONAVIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE (SRAG)

El RNA viral es detectable en las muestras clínicas durante más de un mes en algunos pacientes. La recuperación de ácido nucleico aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 11 días después del inicio de la enfermedad clínica. El ácido nucleico pudo detectarse en el 60% de los pacientes con infección diagnosticada clínicamente y en un número muy pequeño de pacientes sin enfermedad evidente. Las muestras más útiles en los primeros 5 días fueron los aspirados nasofa-

ríngeos, los hisopados de fauces y el esputo. En etapas posteriores de la enfermedad, el virus se detectó más fácilmente en muestras de heces.⁸⁵ También se han creado ensayos de PCR en tiempo real para este virus.⁵³⁷ En este momento, las pruebas de diagnóstico están restringidas a los laboratorios de referencia.

OTRAS INFECCIONES VIRALES

Se han desarrollado ensayos de amplificación molecular para casi todos los agentes infecciosos, incluso PCR en tiempo real para la mayoría de ellos. Con la disponibilidad creciente de reactivos comerciales fiables (aun en ausencia de instrumental o reactivos de diagnóstico), se puede esperar el mismo tipo de expansión que ocurrió después de que los reactivos para inmunofluorescencia e inmunoenzimáticos estuvieron al alcance de todos.

Es probable que los ensayos para algunos de los agentes permanezcan en el ámbito de los laboratorios de referencia. Los ejemplos son los virus exóticos, como los virus de las fiebres hemorrágicas;¹³¹ los agentes muy virulentos que tienen uso potencial para el bioterrorismo, como la viruela;⁴⁵⁸ y los virus que rara vez se consideran, como los poliomavirus (JC y BK,⁵¹⁵ el del sarampión,¹²² el de la rubéola¹²² y el de la parotiditis.³⁹⁹

Cada vez muchos más de los agentes que en este momento se detectan en forma rutinaria por cultivo serán identificados por métodos moleculares más rápidos. Los ejemplos son los virus respiratorios y otros virus herpéticos.^{109,204,490,494,516}

Selección de pruebas para diagnóstico rápido

La elección de una técnica para la detección directa de virus debe depender de la disponibilidad de equipos, de la experiencia del personal y de la cantidad de muestras por evaluar. La detección microscópica de cuerpos de inclusión es sencilla y económica, pero poco sensible; funciona bien para la determinación de lesiones herpéticas cutáneas. La microscopia electrónica tiene indicaciones restringidas. Los inmunoanálisis en fase sólida microscópicos (inmunofluorescencia y pruebas enzimáticas) tienen ventajas sobre las pruebas para detección de antígenos solubles: 1) la localización y el tipo de tinción pueden evaluarse morfológicamente y 2) pueden procesarse con rapidez pequeñas cantidades de muestras. Estas ventajas pueden ser contrarrestadas por las desventajas que representan la subjetividad de la interpretación y la necesidad de adquirir un costoso microscopio para fluorescencia.

Los enzimoimmunoanálisis son más útiles cuando deben evaluarse grandes cantidades de muestras o cuando éstas pueden recogerse y evaluarse en lotes. El punto final puede leerse por medio de un espectrofotómetro, lo que elimina las decisiones subjetivas. Los nuevos enzimoimmunoanálisis sobre membrana, de un solo uso, se han transformado en la forma más conveniente para proporcionar resultados rápidos con mínima complejidad, aunque muchas veces se ve afectada la sensibilidad.

Para el estudio de corte de tejidos en busca de elementos virales, la inmunoperoxidasa tiene como ventajas sobre otros marcadores que los antígenos virales suelen estar disponibles para la reacción sin necesidad de otros tratamientos. Deben bloquearse por completo las peroxidasas endógenas presentes en los cortes. Antes de realizar una inmunofluorescencia para la detección de algunos antígenos, el tejido fijado e incluido debe ser tratado con un agente proteolítico como la tripsina.^{87,239}

Ha habido y seguirá habiendo una tendencia a usar la detección molecular como el procedimiento de elección, en particular la técnica de amplificación en tiempo real. Es muy probable

que en el curso de la próxima década este método reemplace a la detección de antígenos en los laboratorios más avanzados y quizá también en otros ámbitos.

Diagnóstico serológico de las infecciones virales

Las pruebas serológicas son la piedra angular del diagnóstico de ciertas infecciones virales, como las causadas por los virus de hepatitis, el EBV y el virus de la rubéola. Siempre que el aislamiento del virus en cultivo sea difícil o imposible, la demostración de una respuesta inmunitaria contra el agente seguirá siendo importante. En ciertos casos, como ocurre en la evaluación de las infecciones por rubéola, el diagnóstico serológico puede ser tan rápido como el cultivo del virus, aun cuando haya que esperar 2 o 3 semanas para obtener una muestra de suero del período convaleciente. En las situaciones en las que el cultivo del virus es fiable y fácil de obtener, el diagnóstico serológico tiene un papel auxiliar o de apoyo.

Los principios inmunológicos generales también tienen aplicación cuando se establece el diagnóstico de una enfermedad viral utilizando métodos serológicos. Los anticuerpos contra muchos agentes virales persisten durante meses o años después de una infección aguda. La demostración de un aumento significativo (por lo general un aumento de 4 veces) en el título de anticuerpos se considera diagnóstico de infección reciente con el agente en cuestión (a menos que exista la posibilidad de reacciones cruzadas).

Si en la muestra inicial no se encuentran anticuerpos, este aumento diagnóstico del título de anticuerpos se denomina seroconversión. En estos casos es probable que la infección represente el primer contacto con el virus. La infección puede ser primaria o una reactivación de una infección latente si se encuentran anticuerpos, aun en títulos bajos, en la muestra inicial.³⁷⁰ El diagnóstico serológico de las infecciones herpéticas suele complicarse por la enfermedad recidivante. Por ejemplo, en un paciente con enfermedad del SNC, las lesiones bucales herpéticas pueden reactivarse por el estrés de la enfermedad aguda. La respuesta serológica que pueden producir las lesiones bucales reactivadas puede interpretarse falsamente como evidencia de que la enfermedad del SNC está causada por un herpesvirus.

Existen reacciones serológicas cruzadas dentro de muchos grupos de virus e incluso entre grupos, notablemente entre los enterovirus, paramixovirus y togavirus. Por lo tanto, todos los diagnósticos serológicos deben considerarse hasta cierto punto presuntivos.

Una disminución de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos sugiere una infección pasada. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos desaparece lentamente, de modo que suele ser difícil estar seguro de cuán reciente fue la infección.

Cuando se realiza un diagnóstico debe tenerse en cuenta el cuadro clínico. Incluso una seroconversión demuestra sólo una infección reciente por el agente en cuestión. La asociación con la enfermedad manifiesta es una inferencia clínica.

Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana persiste en los pacientes que han desarrollado anticuerpos contra él. Las pruebas serológicas para HIV han utilizado para detección sistemática porque el aislamiento del virus en cultivos celulares es difícil y no está siempre disponible. Las pruebas moleculares para

detección de ácido nucleico viral se reservan para el control de los pacientes que ya tienen una infección demostrada serológicamente.

El método serológico de referencia es una prueba de inmunotransferencia Western blot, en el cual el suero se hace reaccionar con proteínas virales separadas antes por electroforesis en gel de poliácridamida y transferidas sobre papel de nitrocelulosa. Esta prueba requiere para su realización experiencia y cuidado considerables. Se han creado otros sistemas de ensayo de realización más sencilla. El que se ha evaluado más ampliamente es un enzimoimmunoanálisis. La prueba es sensible y específica para la mayoría de las cepas M que se encuentran en los Estados Unidos.²⁸⁵ En los pacientes con SIDA el valor pronóstico de un resultado positivo es alto. En la población general de dadores de sangre, entre los cuales la infección por HIV es muy infrecuente, incluso unos pocos falsos positivos dan como resultado un valor pronóstico inaceptablemente bajo. En la mayoría de los laboratorios una muestra que contenga anticuerpos contra HIV por enzimoimmunoanálisis se confirma primero con el mismo enzimoimmunoanálisis; si es nuevamente positiva, la especificidad de la reacción se documenta por Western blot.¹⁰⁶ No todos los Western blot producen resultados concluyentes. La prueba no se interpreta como positiva a menos que existan múltiples bandas de proteínas que puedan considerarse realmente independientes.⁶² En el cuadro 23-25 se resumen los criterios sugeridos por varios grupos de expertos para la determinación de Western blot positivos. La falta de uniformidad entre los laboratorios para aplicar los criterios de interpretación de la prueba dificultó la comparación de los resultados. En una encuesta realizada en 1990, el 22% de los laboratorios utilizaban varios conjuntos de criterios. Incluso en el 78% de los laboratorios que seguían un solo criterio existían varios estándares.⁶⁵ Por esta razón se han hecho considerables esfuerzos para promulgar estándares nacionales de interpretación.

Cuadro 23-25 Criterios para Western blots positivos para anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana

ORGANIZACIÓN	CRITERIOS
Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors/CDC	Dos cualesquiera de: p24 gp41 gp120/gp160
Prueba DuPont aprobada por la FDA	p24 y p31 y gp41 o gp 120/gp160
Cruz Roja Americana	≥ 3 bandas: 1 de cada grupo de productos genéticos: GAG y POL y ENV
Consortium for Retrovirus Serology Standardization	≥ 2 bandas: p24 o p31 más gp41 o gp120/gp160

Adaptado de la referencia⁶².

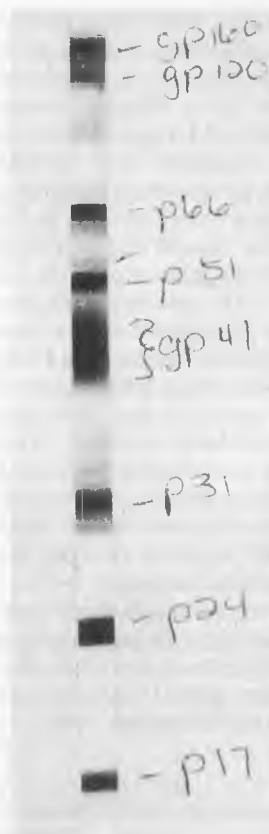


Figura 23-17 Western blot para anticuerpos contra el HIV-1. El virus degradado se sometió a electroforesis en gel de poliácridamida, después de lo cual fue transferido (*blotted*) sobre papel de nitrocelulosa. Luego se hizo reaccionar el suero del paciente con las tiras de nitrocelulosa y se agregó gammaglobulina antihumana marcada con enzimas. El desarrollo de la reacción enzimática reveló múltiples bandas con este suero de un paciente infectado por el HIV-1. La electroforesis separó las diversas proteínas y glucoproteínas de acuerdo con su peso molecular. Las bandas están marcadas según la proteína viral que han detectado.

En la figura 23-17 se muestra un ejemplo de un Western blot positivo. Se observan Western blot indeterminados en el 10% al 20% de los sueros positivos por enzimoimmunoanálisis.⁸³ El riesgo de desarrollar SIDA de las personas con un enzimoimmunoanálisis repetidamente positivo y un Western blot indeterminado depende de los factores de riesgo individuales. Si no existen factores de riesgo de infección por el HIV, el paciente o dador no requiere seguimiento posterior. Hay un período determinado, poco después de la infección, en el cual puede encontrarse virus infeccioso en ausencia de anticuerpos detectables.

Se han introducido varias innovaciones en la serología para el HIV. El Oral Fluid Vironostika HIV-1 Microelisa System® (BioMérieux) usa secreciones bucales como medio de prueba, evitando así la punción venosa y las muestras de sangre. En este momento, este ensayo es la única prueba aprobada por la FDA para uso en muestras bucales. No es tan sensible como los análisis inmunológicos realizados en muestras de sangre y no puede emplearse para la detección sistemática en dadores de sangre.

En segundo lugar, la FDA ha aprobado tres inmunoanálisis rápidos para uso clínico (<http://www.cdc.gov/hiv/pbs/rtlab>).

htm):³⁷⁷ 1) el dispositivo para obtención de muestras OraSure HIV-1®, para pruebas en saliva y el Oraquick Rapid HIV-1 Antibody Test® (OraSure Technologies, Bethlehem, PA) (una prueba exenta de cumplir la ley Clinical Laboratory Improvement Amendments de 1988 [CLIA] para uso en sangre entera), 2) el Reveal Rapid HIV Antibody Test® (MedMira, Halifax, NS, Canadá) (una prueba de moderada complejidad según la CLIA, para suero o plasma) y 3) el Uni-Gold Recombigen® HIV Test (Trinity Biotech, Bray, Irlanda) (una prueba exenta de cumplir la CLIA para sangre total, suero o plasma). La prueba Oraquick está aprobada por la FDA para uso en sangre obtenida por punción digital así como por punción venosa; otros fabricantes están solicitando una aprobación similar de la FDA.

Las pruebas rápidas deben interpretarse de la misma forma que los análisis convencionales. Los resultados negativos deben ser seguidos por la repetición de la prueba, si está clínicamente indicado. Los resultados positivos deben confirmarse con una prueba de fluorescencia o un Western blot. No pueden usarse inmunoanálisis convencionales para confirmación. Un ensayo convencional negativo tampoco demuestra que una prueba positiva rápida es incorrecta.

No es sorprendente que individuos inescrupulosos hayan comercializado pruebas que no han sido aprobadas por la FDA o hayan presentado declaraciones falsas. En algunos casos, se han iniciado acciones legales (http://www.fda.gov/ora/about/enf_story/archive/2001/ch6/default.htm).

Virus de la hepatitis B y virus de Epstein-Barr

Existen pocas excepciones a la regla general que dice que para establecer un diagnóstico debe demostrarse una seroconversión. En unas pocas infecciones virales aparecen anticuerpos dirigidos contra una variedad de antígenos, a diferentes tiempos después de la infección, que persisten por períodos variables. Es posible establecer un diagnóstico definitivo con una única muestra de suero cuando se detecta un anticuerpo que aparece sólo en la fase aguda. Los dos ejemplos principales son la mononucleosis infecciosa causada por el EBV (fig. 23-18) y la hepatitis B (fig. 23-19). En ambos casos, ciertos anticuerpos, como el anticuerpo IgG contra el EBV, persisten durante largos períodos; debe detectarse una seroconversión contra estos antígenos. Otros anticuerpos, como los dirigidos contra el antígeno temprano (EA) del EBV, aparecen en forma transitoria y pueden servir como marcadores de infección aguda.⁴¹¹

Si el agente infeccioso no es eliminado por la respuesta inmunitaria, la presencia de anticuerpos significa que el paciente puede ser aún portador del microorganismo. Por ejemplo, los pacientes que tienen anticuerpos contra CMV, que causa a menudo una infección latente, tienen mayores probabilidades de transmitir el virus si se utiliza su sangre para transfusiones o sus órganos para trasplante que los individuos seronegativos.²³¹

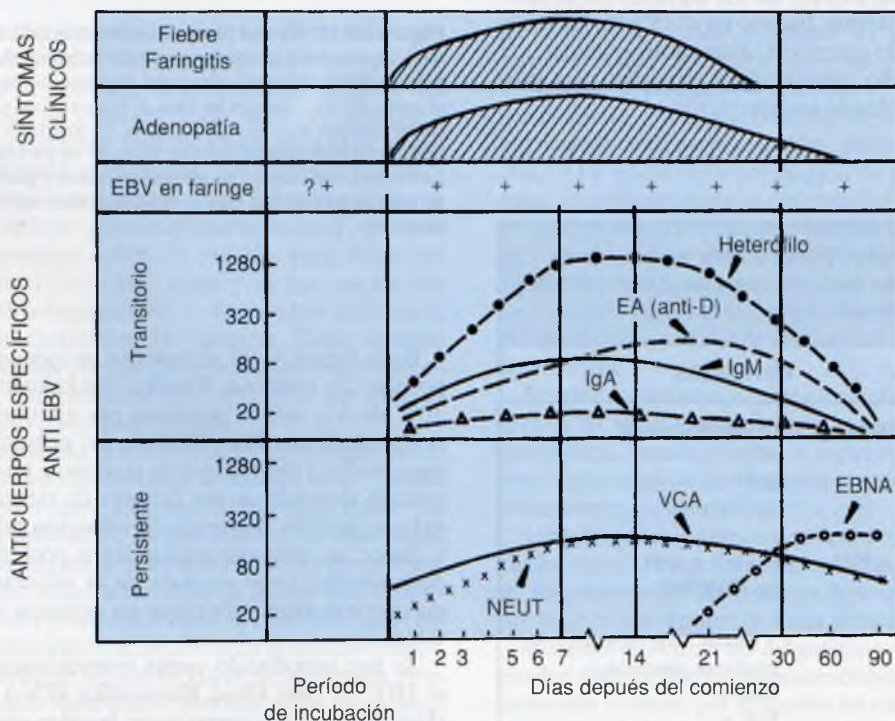


Figura 23-18 Evolución de las infecciones causadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) y la respuesta serológica. Aunque el virus puede ser detectado en secreciones bucales, las técnicas de cultivo son dificultosas y están disponibles sólo en laboratorios de investigación. La respuesta de anticuerpos heterófilos es el método clásico de demostrar mononucleosis infecciosa y sigue siendo la prueba de mayor utilidad. La aparición transitoria de los anticuerpos heterófilos, de IgM dirigida contra antígenos de la cápside viral y de anticuerpos contra antígeno temprano (EA) permite asociar la presencia de anticuerpos con la enfermedad actual. Los anticuerpos neutralizantes y los anticuerpos IgG contra el antígeno de la cápside viral (VCA) persisten meses o años. Estas pruebas son útiles para determinar que el paciente ha estado antes infectado y que, por lo tanto, es inmune; también pueden ser de utilidad para el diagnóstico si la primera muestra se toma en forma adecuadamente precoz y puede demostrarse seroconversión. Si el paciente es visto cuando la enfermedad ya está avanzada, el diagnóstico puede hacerse por detección de una seroconversión contra el antígeno nuclear viral (EBNA). (Modificado con autorización de James C. Niederman, Yale University School of Medicine, New Haven, CT).

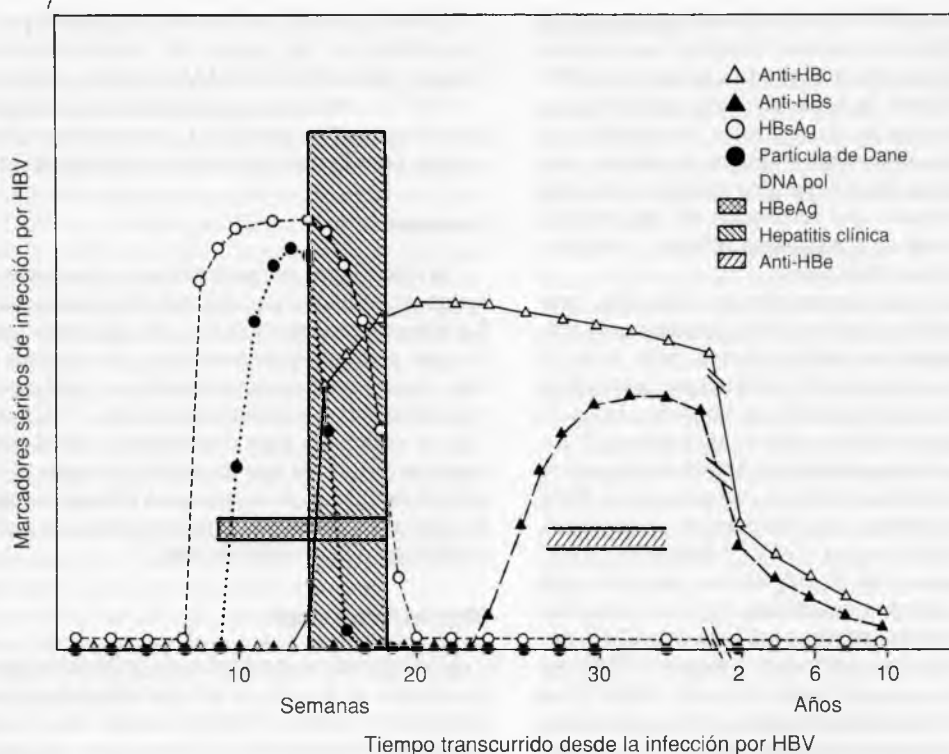


Figura 23-19 Antígenos y anticuerpos después de la infección autolimitada por virus de la hepatitis B. La aparición de antígenos y anticuerpos después de la infección autolimitada con virus de la hepatitis B es un ejemplo de cómo el conocimiento de la biología de la infección conduce a estrategias diagnósticas muy eficaces, aunque el virus en sí mismo sea muy difícil o imposible de cultivar. Deben buscarse tanto antígenos como anticuerpos para una detección eficaz de casos. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es el que aparece en primer lugar; después de que se elimina de la sangre pueden detectarse anticuerpos contra este antígeno (anti-HBsAg). Sin embargo, puede existir un período durante el cual el antígeno se ha eliminado pero aún no hay anticuerpos detectables; esta eventualidad se cubre mediante la detección de anticuerpos contra el antígeno del core (anti-HBc). La presencia de HBs no es sinónimo de infección aguda autolimitada, porque algunas personas pueden ser portadoras. (Modificado con autorización de William S. Robinson, Stanford University Medical Center, Stanford, CA).

El conocimiento de la secuencia de acontecimientos es muy importante para el diagnóstico de la infección causada por el virus de la hepatitis B. La detección de antígeno viral, sobre todo el antígeno de superficie (HBsAg), tiene un importante papel en el diagnóstico de la infección aguda. El antígeno e del virus de la hepatitis B se detecta al mismo tiempo que la actividad de DNA polimerasa, lo que constituye un marcador de virus infeccioso; la presencia de antígeno e se ha correlacionado con la enfermedad aguda y contagiosa en muchos estudios,³⁶⁸ como ya se explicó. Los anticuerpos contra el core viral (HBc) son importantes desde el punto de vista diagnóstico durante el período en el cual el antígeno de superficie ha sido eliminado de la circulación y todavía no son detectables los anticuerpos contra él. La presencia de antígeno del core se correlaciona con el DNA viral circulante.²⁷⁹ Algunos pacientes desarrollan una infección crónica en la cual la antigenemia persiste en ausencia de anticuerpos séricos; este grupo tiene mayor riesgo de sufrir enfermedad hepática crónica. En la actualidad es evidente que muchos de estos pacientes tienen anticuerpos circulantes que no son detectados por los sistemas comerciales porque se encuentran unidos al antígeno.³³⁵ Además, se ha demostrado que algunos pacientes que tienen anticuerpos circulantes sin antígeno de superficie detectable poseen DNA viral circulante, detectable por técnicas de amplificación durante períodos de hasta 5 años.³⁴⁷

En forma similar, el diagnóstico de mononucleosis infecciosa puede hacerse con una única muestra de suero si se detectan

anticuerpos contra el antígeno temprano y anticuerpos IgM contra el antígeno de la cápside viral (VCA). Un título alto de anticuerpos IgG contra VCA, en ausencia de anticuerpos contra EA y anticuerpos IgM anti-VCA, sugiere una infección pasada. Es importante conocer la evolución de la infección en el tiempo cuando se interpretan los resultados serológicos.⁴¹¹

La prueba más común para detectar infecciones causadas por el EBV es la prueba de anticuerpos heterófilos. Estos anticuerpos son inmunoglobulinas que reaccionan con sustancias pertenecientes a otras especies. En el curso de una infección por EBV, se producen anticuerpos contra una variedad de antígenos extraños. Se producen aglutininas para eritrocitos de oveja y de caballo, hemolisinas para eritrocitos vacunos y anticuerpos contra el antígeno OX19 de *Proteus*, detectables por la reacción de Weil-Felix. Los anticuerpos heterófilos que son muy específicos para la mononucleosis infecciosa son absorbidos por eritrocitos vacunos, pero no por riñón de cobayo. La prueba de Paul-Bunnell-Davidsohn diferencial se diseñó para caracterizar estos anticuerpos heterófilos. Es altamente específica de EBV y es un diagnóstico de laboratorio confirmatorio de mononucleosis infecciosa.¹¹⁶ En la actualidad se cuenta con diversas pruebas simplificadas para detectar la respuesta heterófila de la mononucleosis infecciosa; la mayoría utiliza aglutinación de eritrocitos equinos después de la absorción adecuada de los sueros.^{158,243} Los resultados que no concuerdan con los datos clínicos o hematológicos deben ser evaluados por realización de la prueba diferencial en tubo o por la detección de

anticuerpos específicos para EBV. Las pruebas de aglutinación para anticuerpos heterófilos son pruebas “simples” que pueden ser realizadas por “cualquier persona” sin dificultades. En 1990 se detectó una pseudoepidemia de mononucleosis infecciosa en Puerto Rico.⁶⁶ Los resultados de los controles de calidad y de realización de las pruebas no revelaron ningún problema, pero una investigación cuidadosa indicó que dos técnicos con poca experiencia habían informado los resultados de las pruebas como positivos sobre la base de “reacciones débiles”, categoría que no existía para el método utilizado.

El 90% de los adultos con mononucleosis infecciosa presenta anticuerpos heterófilos. En los niños pequeños, la frecuencia de estos anticuerpos es mucho menor. Sólo 3 de 11 niños menores de 2 años desarrollaron anticuerpos heterófilos después de una primoinfección por EBV, en tanto que 16 de 21 niños entre 2 y 4 años desarrollaron dichos anticuerpos.²⁴¹ La mononucleosis infecciosa con anticuerpos heterófilos negativos y linfocitos atípicos circulantes suele ser causada por el EBV (demostrable por la presencia de anticuerpos específicos contra componentes virales) o por CMV.²⁴² Horwitz y cols. encontraron que los sueros del 38,1% de los pacientes con mononucleosis con anticuerpos heterófilos positivos reaccionaban en forma cruzada en una prueba para IgM anti-CMV, pero el suero de los pacientes con infección aguda por CMV no reaccionaba en la prueba de IgM anti-VCA del EBV.²⁴² Se detectaron anticuerpos de reacción cruzada contra componente D o R del antígeno temprano en sueros de 9 de 36 pacientes (25%) con mononucleosis causada por agentes diferentes del EBV (seis casos de infección por CMV, un caso de toxoplasmosis, un caso de probable hepatitis y un caso de etiología desconocida).

Virus de la hepatitis A

El virus de la hepatitis A es el único virus de hepatitis importante que se ha cultivado *in vitro*. El virus se desarrolla en una variedad de células de origen simiano, en especial en los primeros pasajes de células de riñón de mono verde africano.²⁸ Sin embargo, el cultivo no es una opción de diagnóstico viable porque el aislamiento en muestras primarias no es fiable. La hepatitis A se diagnostica serológicamente por detección de anticuerpos IgM específicos.^{407,457,472} Muy al principio de la infección, los anticuerpos IgM pueden no ser detectables, de modo que la prueba debe repetirse 2 semanas después si la sospecha clínica es alta.²²⁷

Virus de la hepatitis C

El diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C requiere una combinación de pruebas serológicas y moleculares. La primera generación de enzimoimmunoanálisis carecía de sensibilidad y especificidad, pero la segunda y la tercera generación presentan mejoras sustanciales con respecto a las primeras pruebas. Un panel de expertos ha recomendado un criterio para el diagnóstico similar al usado para el HIV. La evaluación inicial se hace con un enzimoimmunoanálisis sensible. Si esta prueba de detección sistemática es positiva, el resultado se confirma mediante un método diferente.⁷

La FDA ha aprobado varios inmunoanálisis para uso diagnóstico: Abbott HCV EIA 2.0® (Abbott Laboratories), Ortho HCV version 3.0 Elisa® (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) y Vitros Anti-HCV Assay® (un ensayo de quimioluminiscencia intensificada; Ortho-Clinical Diagnostics). Los tres ensayos usan antígenos recombinantes del HCV.⁷

La única prueba confirmatoria aprobada por la FDA para uso diagnóstico es un ensayo de inmunoelectrotransferencia: el Chiron RIBA HCV 3.0 SIA® (Chiron, Emeryville, CA).

Una vez establecido el diagnóstico serológico de infección por el virus de la hepatitis C, se necesitan herramientas moleculares para la caracterización completa de la infección.

Parvovirus

Las infecciones por parvovirus en los niños suelen ser transitorias y no requieren apoyo del laboratorio para su diagnóstico. La mayor preocupación son los pacientes inmunosuprimidos, los que padecen drepanocitosis y las mujeres embarazadas. Se han creado enzimoimmunoanálisis, pruebas de inmunoelectrotransferencia y radioinmunoanálisis.⁴⁷ La determinación de IgG es suficiente para determinar el nivel inmunitario de una mujer embarazada que ha estado expuesta al virus; la determinación de IgM es necesaria para demostrar infección aguda. Si se teme o se sospecha hidropesía fetal, los enfoques serológico y virológico se complementan.⁵³⁶

Virus del herpes simple

El diagnóstico serológico de infección por el virus del herpes simple no ha sido de utilidad debido a la alta prevalencia de anticuerpos contra el herpes simple tipo 1 desde edades tempranas y la incapacidad de los equipos comerciales de diferenciar ambos serotipos.

El antígeno de la glucoproteína G del virus del herpes simple induce la formación de anticuerpos específicos; en la actualidad existen equipos comerciales de enzimoimmunoanálisis y de inmunoelectrotransferencia para detección de IgG. Estas pruebas proporcionan una forma conveniente de demostrar el nivel inmunitario de las mujeres embarazadas y (probando muestras de período agudo y convaleciente) infección reciente en pacientes inmunosuprimidos y mujeres embarazadas.^{16,496} Aunque se han planteado dudas acerca del momento de la seroconversión, uno de los equipos comerciales, que usa la proteína gG, dio resultados similares a un procedimiento de inmunoelectrotransferencia de referencia.¹⁵

Cuando se prueban en infecciones genitales demostradas por cultivo, los ensayos serológicos específicos para tipo tienen buena especificidad y sensibilidad.³⁶⁰ También se dispone de pruebas para el virus tipo 1, aunque la urgencia diagnóstica es menor que para el virus tipo 2.⁴⁹⁶

Potencialmente, el uso principal de estas pruebas serológicas es definir el riesgo de una primoinfección herpética que se presenta en una mujer embarazada cerca del término, cuando puede transmitirla al recién nacido. El mayor riesgo existe en una mujer que carece de anticuerpos (que no ha estado previamente infectada) y tiene una pareja seropositiva. En esta situación es indispensable evitar la primoinfección. Debe hacerse notar que la eliminación recurrente de virus no es infrecuente en mujeres seropositivas,⁴⁹⁹ aunque el riesgo para el recién nacido es menor en las infecciones recurrentes que en la primoinfección.

Virus de la varicela-zóster

El papel de la serología en el diagnóstico de las infecciones por el VZV es la determinación del nivel inmunitario del paciente o del personal de atención médica. La prueba de aglutinación del látex es comparable con la prueba de fluorescencia.^{283,467} y es más sensible que los enzimoimmunoanálisis.⁴⁶⁷ Sin embargo, estos últimos han dado resultados satisfactorios.¹²⁶

Citomegalovirus

La serología es de importancia secundaria en el diagnóstico de infección y enfermedad por citomegalovirus.³²⁹

No obstante, tiene un papel importante en la evaluación de riesgo de receptores de trasplantes. La infección por citomegalovirus, que a menudo es asintomática, puede acompañarse por la presencia de DNA en sangre periférica durante muchos meses después de la primoinfección, aun cuando existe una vigorosa respuesta de anticuerpos.⁵³⁵ El recrudecimiento de este virus latente puede acompañarse por una respuesta de IgM, de modo que este marcador tradicional de primoinfección queda eliminado en esta situación.¹³⁰ Los problemas con la detección válida de anticuerpos IgM complican el cuadro. En un cuidadoso estudio de enfermedad intrauterina causada por CMV, sólo el 10% de las mujeres con anticuerpos IgM, determinados por un enzimoimmunoanálisis, dieron a luz a un niño infectado congénitamente.³⁰⁴ Sin embargo, cuando la presencia de anticuerpos IgM se confirmó mediante una prueba de inmunoelectrotransferencia específica³⁰⁵ el riesgo fue similar al de una infección demostrada durante el primer trimestre.

El mayor riesgo de desarrollo de una infección grave por CMV se presenta en un trasplante de órganos de un dador seropositivo a un receptor seronegativo.⁴⁷³ Siempre que sea posible debe evitarse esta combinación.

Virus del Nilo Occidental

Como sucede con otros flavivirus, el virus del Nilo Occidental no crece con facilidad en los cultivos celulares que se usan en la mayoría de los laboratorios de virología. El diagnóstico de esta infección se hace por serología y, todavía en menor medida, por técnicas moleculares. La enfermedad clínica es principalmente una encefalitis, de manera que la muestra preferida es el LCR. Pueden detectarse en forma fiable anticuerpos IgG e IgM en suero y LCR.⁴⁰² La presencia de anticuerpos IgM específicos demuestra la infección. Al principio se supuso que el brote inicial era encefalitis de San Luis, ya que estos dos flavivirus comparten antígenos. Por lo tanto, las pruebas positivas para anticuerpos deben confirmarse con un segundo método. Hasta que no se adquiera más experiencia, se ha sugerido que la validación continua de las pruebas es un curso de acción prudente.³²⁵

Rubéola

La prueba tradicional para evaluar la inmunidad contra la rubéola es la inhibición de la hemaglutinación, pero ha sido reemplazada en la mayoría de los laboratorios por pruebas más convenientes, en particular enzimoimmunoanálisis.¹⁹⁵ Estas pruebas funcionan bien para determinar el nivel inmunitario. Para el diagnóstico de infecciones congénitas, es necesaria la determinación de anticuerpos IgM con un método validado en forma rigurosa.

Coronavirus del SRAG

Los anticuerpos contra el coronavirus del SRAG pueden detectarse en más del 90% de los pacientes con enfermedad clínica evidente, mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta.⁸⁵ Un muy pequeño porcentaje de pacientes sin enfermedad evidente también muestran seroconversión. En este momento, el diagnóstico serológico parece ser el método más sensible para diagnosticar la infección.

Anticuerpos IgM

En general, los anticuerpos IgM aparecen antes que los IgG después de una infección aguda y son transitorios. Además, la IgM no atraviesa la placenta, de modo que la demostración de estos anticuerpos en un recién nacido indica una infección congénita o perinatal, y no la transferencia pasiva de anticuerpos de la madre.

Por lo tanto, la demostración de anticuerpos IgM contra cualquier antígeno sugiere una infección reciente. La prueba debe utilizarse sólo en los laboratorios en los que los resultados han sido controlados con cuidado, ya que existen varios inconvenientes teóricos y prácticos que pueden conducir a interpretaciones erróneas. Lo más importante es que muchas veces las decisiones clínicas críticas dependen de un resultado exacto.

Es importantísimo que el procedimiento para la detección de la clase IgM sea demostrablemente específico. La presencia de anticuerpos IgM suele realizarse por demostración de la disminución de los títulos de anticuerpos después de eliminar la IgM, por demostración de la actividad residual después de eliminar la IgG, por la utilización de antiglobulinas específicas antiIgM o por una combinación de estos procedimientos.

Si se utiliza un anticuerpo anti-IgM para determinar que una infección es aguda, debe demostrarse la especificidad de esta antiglobulina. Los resultados negativos falsos pueden deberse a la presencia de muy altos niveles de IgG, que pueden bloquear los sitios que podrían haber reaccionado con la IgM. Los resultados positivos falsos pueden encontrarse cuando existen en el suero del paciente antiglobulinas como el factor reumatoideo. Si un suero reacciona con varios antígenos (p. ej., rubéola, CMV, virus del herpes simple y *Toxoplasma gondii*) debe sospecharse la presencia de una antiglobulina.

Por último, aunque los anticuerpos IgM en suero son en general transitorios, se han demostrado casos en los cuales han persistido durante meses e incluso años. Además, ahora se sabe que puede detectarse IgM cuando se reactivan ciertas infecciones latentes.¹³⁰

Procedimientos serológicos diversos

Existe una gran variedad de procedimientos que pueden utilizarse para el diagnóstico serológico de las infecciones virales (cuadro 23-26). Los enzimoimmunoanálisis y las pruebas de inmunofluorescencia se utilizan cada vez con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos; muchas de estas pruebas se comercializan en forma de equipos.

Diagnóstico de otras infecciones virales

El diagnóstico de algunas infecciones virales está más allá del alcance de la mayoría de los laboratorios de hospital, porque las infecciones son raras o exóticas, los agentes etiológicos son peligrosos o es necesario disponer de instalaciones especiales para el diagnóstico. Las pruebas para rabia, para infecciones causadas por arbovirus y para fiebres hemorrágicas virales se realizan casi siempre en laboratorios de referencia como los instalados en los departamentos sanitarios estatales o en los CDC de los Estados Unidos.

Pruebas de sensibilidad a los antivirales

La resistencia a los antivirales es un hecho lamentable, aunque todavía no ha alcanzado proporciones epidémicas. La evaluación de pacientes en los cuales fracasa el tratamiento anti-

Cuadro 23-26 Diagnóstico serológico de las infecciones virales

VIRUS	PRUEBAS REALIZADAS HABITUALMENTE	COMENTARIOS
Infecciones respiratorias		
Influenza A y B	FC, IHA, EIA	IHA usada para el antígeno específico de cepa
Parainfluenza	FC, IHA, EIA	
Sincitial respiratorio	IF, EIA, IB	
Adenovirus	FC, IHA, EIA	Eritrocitos de <i>Macaca mulatta</i> o de rata para la IHA
Coronavirus	NT, EIA, IF, IB	Datos limitados para el virus SARS
Infecciones del sistema nervioso central		
Enterovirus	NT	No se hace habitualmente
Papera	FC, IHA, IF, EIA	
Herpes simple	EIA, IB	Se requieren reactivos específicos de tipo
Rabia	NT, EIA	Para nivel de inmunidad
Hepatitis		
Hepatitis A	EIA	Véase el texto
Hepatitis B	EIA, RIA	Prueba de detección sistemática seguida por una prueba confirmatoria
Hepatitis C	EIA, IB	Se hace raras veces
Hepatitis D	EIA, RIA	
Hepatitis E	EIA	
Infecciones cutáneas		
Sarampión	IHA, EIA	
Varicela-zóster	EIA, ACIF, FAMA, AL	Para determinación de nivel inmunitario
Infecciones genitales		
Herpes simple	EIA, IB	Se requieren reactivos específicos de tipo
HIV	EIA, IB	Prueba de detección sistemática seguida de una prueba confirmatoria
Otras infecciones		
Citomegalovirus	EIA, IFA, Aglutinación pasiva de partículas de látex	Fundamentalmente para determinación de nivel inmunitario
Rubéola	IHA, EIA, AL, IB	IHA es el método de referencia
Epstein-Barr	FC, IF, EIA	Véase la explicación
Parvovirus	RIA, EIA	
Herpes humano 6 y 7	NT, IF, EIA, IB	

ACIF: inmunofluorescencia anticomplemento; FC: fijación del complemento; EIA: enzoinmunoanálisis; IF: inmunofluorescencia; FAMA: prueba de anticuerpos fluorescentes contra antígenos de membrana; IHA: inhibición de la hemaglutinación; IB: inmunoblot o inmunocromatografía; AL: aglutinación de partículas del látex; NT: neutralización (la prueba de referencia para la mayoría de los virus, aunque no es necesaria con frecuencia); RIA: radioinmunoanálisis.

ral contra el HIV es una parte habitual del tratamiento, como ya se explicó. La resistencia de otros agentes virales, en particular los pertenecientes al grupo de los virus herpéticos, es bien conocida, pero por fortuna, infrecuente. Las pruebas de sensibilidad para aislamientos clínicos están disponibles en determinados laboratorios de referencia.⁴⁷⁵

Infecciones causadas por especies de *Chlamydia*

Las clamidias son patógenos bacterianos intracelulares estrictos. Tres especies de *Chlamydia* causan enfermedad humana. *Chlamydia psittaci* provoca infecciones respiratorias agudas, por lo general transmitidas por aves infectadas.⁴³⁵ Las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, que tiene 15 variantes serológicas (serovariedades) son mucho más frecuentes.⁴³² Las serovariedades L1, L2 y L3 producen una enfermedad de transmisión sexual: el linfogranuloma venéreo. El tracoma, una con-

juntivitis crónica complicada a menudo con ceguera, se asocia con las serovariedades A, B1, B2 y C. El miembro más nuevo del género, *Chlamydia pneumoniae*, fue al principio denominado bacilo TWAR por las iniciales de los dos pacientes en los que se aisló la bacteria. Los estudios genéticos demostraron que las tres especies están íntimamente relacionadas.¹⁷⁸

Todas las clamidias pueden aislarse en huevos embrionados y en cultivos celulares. No debe intentarse el aislamiento de *C. psittaci* en estos últimos, a menos que se cuente con instalaciones estrictas de aislamiento para la protección del personal del laboratorio. Asimismo, deben tomarse precauciones para evitar las infecciones adquiridas en el laboratorio si se sospechan serovariedades que causan el linfogranuloma venéreo.

Chlamydia trachomatis

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLOGÍA

La conjuntivitis de inclusión (una infección que difiere del tracoma por la ausencia de cicatriz de la córnea), la neumonía

en los recién nacidos y las infecciones transmitidas sexualmente en los adultos, todas las cuales están causadas por las serovariedades D a K, son las enfermedades producidas por clamidias de mayor importancia para los laboratorios diagnósticos.²⁶⁶ Las infecciones transmitidas sexualmente son la uretritis, la cervicitis mucopurulenta y la salpingitis. Estas infecciones y las infecciones del recién nacido están, de hecho, relacionadas en forma directa. Schachter y cols. realizaron el seguimiento de 131 recién nacidos de madres de cuyo cuello uterino se había cultivado *C. trachomatis*.⁴³³ El 18% de los niños desarrollaron conjuntivitis de inclusión confirmada por cultivos y el 16% presentó neumonía neonatal por clamidias.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras cervicales y oculares se obtienen en forma óptima por raspado de la mucosa. Los hisopos son fáciles de conseguir y son mínimamente traumáticos. Deben evitarse los hisopos de madera y los fabricados con alginato de calcio; algunos hisopos de algodón han sido tóxicos para *Chlamydia*; se prefiere el dacrón o el rayón.¹⁰¹ Las muestras uretrales y nasofaríngeas pueden obtenerse con un hisopo fino hecho sobre un alambre flexible. El hisopo debe insertarse hasta 3 a 5 cm dentro de la uretra. El semen y las secreciones uretrales purulentas no se consideran muestras adecuadas para cultivo.¹⁰¹ *C. trachomatis* puede detectarse en muestras de la primera orina de la mañana con técnicas de amplificación, como se explica más adelante.

Las muestras cervicales se recogen del endocervix después de una eliminación cuidadosa del moco. La tasa de aislamiento aumenta si los hisopos uretral y cervical se colocan en el mismo frasco de transporte.

AISLAMIENTO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN CULTIVOS CELULARES

Aunque las clamidias son bacterias, son patógenos intracelulares estrictos. Los métodos para el aislamiento en cultivo son similares a los que se emplean en los laboratorios de virología. Sin embargo, es esencial que los cuerpos elementales infecciosos de las clamidias se centrifuguen sobre la monocapa en un frasco ampolla (véase fig. 23-9). El aislamiento de las bacterias se optimiza si se alcanza una fuerza centrífuga de 3 000 g durante 60 minutos.⁴⁵⁶ Para los cultivos se utilizan células que han sido irradiadas o tratadas con un inhibidor metabólico. Las células de McCoy tratadas con cicloheximida son la línea celular más utilizada;⁵³¹ se agrega cicloheximida (1 µg/mL) a los medios de cultivo celulares que se utilizan después de la infección de la monocapa. El polibreno, un polícatión utilizado para aumentar la infecciosidad de los retrovirus, también aumenta la cantidad de inclusiones de clamidias y la tasa de aislamientos en materiales clínicos.⁴³¹ Sabet y cols. utilizaron con éxito células HeLa 229 que habían sido tratadas con DEAE-dextrano y cicloheximida para el aislamiento de *C. trachomatis*.⁴²⁶ Se ha informado que las células de mono verde Buffalo son superiores a las células de McCoy.²⁹⁰

Los cuerpos de inclusión de *C. trachomatis* contienen glucógeno, que puede colorearse con yodo. Después de una incubación durante 48 a 72 horas, los cubreobjetos se extraen y se tiñen con yodo o, para una sensibilidad algo mayor, con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína⁴⁶⁵ (véase lámina en color 23-2C). Se dispone de anticuerpos monoclonales específicos de especie dirigidos contra las proteínas de membrana externa y de anticuerpos específicos de género diri-

gidos contra el lipopolisacárido. Las inclusiones de clamidias son estructuras citoplasmáticas bien definidas. Si el cultivo es negativo después de un único pasaje, se puede lograr una mayor de manera considerable.

Se describieron micrométodos para el cultivo en los que se siembran microplacas de 96 cubetas con células de McCoy, ya sea antes o en el momento de la siembra con las muestras clínicas.^{476,531} Las cubetas se examinan con el microscopio después de la tinción con yodo o antisuero conjugado con fluoresceína. Las microplacas son mucho más económicas que los frascos ampolla individuales y diferentes investigadores han encontrado que presentan una sensibilidad equivalente.⁵³¹ Sin embargo, otros investigadores consideran menos sensible el micrométodo que los cultivos convencionales.²⁶⁷ Gran parte de los argumentos acerca de si los subcultivos a ciegas aumentan el aislamiento de *Chlamydia* derivan probablemente de la variación de protocolos de los cultivos primarios.²⁶⁷ En general, hay poco rendimiento de los subcultivos a ciegas si se siembran envases con una gran superficie y se utilizan anticuerpos monoclonales para detectar las inclusiones. Los micrométodos dan mejores resultados que los subcultivos de rutina.

DETECCIÓN DIRECTA DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN MUESTRAS CLÍNICAS

Detección morfológica de inclusiones. Si hay gran cantidad de cuerpos de inclusión de clamidias, el diagnóstico puede establecerse con facilidad por los métodos de coloración de frotis de Giemsa o de Giménez. Se prefiere la coloración de Giménez, que contiene fucsina fenicada, porque se colorean bien las inclusiones, pero casi siempre está más al alcance la coloración de Giemsa. Las inclusiones, que se ubican en el citoplasma de las células epiteliales, a menudo tienen una localización perinuclear y deben diferenciarse de los artefactos, como los núcleos fragmentados (véase lámina en color 23-2A). La frecuencia con la que se detectan inclusiones en los frotis es máxima en la conjuntivitis neonatal, más baja en la conjuntivitis de inclusión del adulto y en el tracoma, y mínima en las uretritis y cervicitis, en los que rara vez se las encuentra. En la práctica casi nunca se intenta la visualización directa.

Detección de antígenos. Los procedimientos iniciales de diagnóstico de laboratorio diferentes del cultivo fueron la inmunofluorescencia directa (véase lámina en color 23-2B) y, con posterioridad, los enzimoanálisis. Aunque aún se dispone de productos comerciales para algunas de estas pruebas han sido sustituidos por los métodos moleculares. Los lectores interesados pueden consultar la edición anterior de este libro.

Detección de ácidos nucleicos. La primera prueba molecular comercial aplicada a *C. trachomatis* fue una sonda de DNA dirigida contra rRNA (Pace 2 System Assays®, Gen-Probe, San Diego, CA). La sensibilidad de la prueba osciló entre el 80% y el 95%, según la población de pacientes estudiados, el origen de la muestra, la versión de la prueba evaluada y el método de referencia aplicado.

La segunda generación de pruebas moleculares son las pruebas de amplificación de varios tipos. La mayoría de los estudios comparativos han evaluado ya sea ensayos de hibridación (o ensayos de antígenos) o ensayos de amplificación en comparación con el cultivo. La evidencia acumulada sugiere que los ensayos de amplificación son el método más sensible, pero la conclusión se obtuvo por vía indirecta. Sin embargo, en un estudio que comparó los tres métodos nuevamente los ensayos de amplificación fueron más sensibles que sus competidores.⁵²⁸

Las pruebas moleculares empleadas con mayor frecuencia en este momento son la reacción en cadena de la polimerasa (Amplicor CT/NG Test® y Cobas Amplicor *Chlamydia trachomatis* [CT]/*Neisseria gonorrhoeae* [NG] Test®; Roche Diagnostics),³¹³ la amplificación por desplazamiento de hebra (pruebas BD ProbeTec CT® y CT/GC®; BD Diagnostics),⁴⁸⁸ la amplificación mediada por transcripción (prueba Gen-Probe Aptima Combo 2®; Gen-Probe)¹⁷⁹ y el método de captura híbrida (prueba Hybrid Capture 2 CT/NG DNA®; Digene).¹¹³ Un producto, que usaba la reacción de ligasa en cadena, ha sido retirado del mercado.

Los diversos métodos de amplificación parecen funcionar en forma similar. Todos son más sensibles que otros métodos, pero también son más costosos. El precio parece ser el principal factor que ha impedido que los laboratorios adopten un método que es claramente el más sensible de los enfoques diagnósticos.²² Además de su sensibilidad, los métodos de amplificación también son convenientes. Pueden aplicarse a muestras de orina, que es una alternativa más aceptable para los hombres y para las mujeres que no requieren un examen pélvico por otras razones. Los estudios de investigación han demostrado la aceptabilidad de los hisopos vaginales obtenidos por la misma paciente,⁴⁴⁶ por lo que éste puede ser un método de obtención aceptado en el futuro. En general, las muestras de endocervix son apenas más sensibles que las de orina en las mujeres, pero esta última es más sensible que los hisopados uretrales en los varones asintomáticos.²⁶²

También existen diferencias entre las pruebas. Aunque este no es un problema para *C. trachomatis*, se han demostrado reacciones cruzadas entre *N. gonorrhoeae* y las especies conmensales de *Neisseria* con pruebas que usan la reacción en cadena de la polimerasa y el desplazamiento de hebra,²⁶³ lo que llevó a un grupo de investigadores a recomendar que los resultados positivos sean confirmados.⁴⁸⁹ Las reacciones cruzadas no se han demostrado con el método de amplificación mediada por transcripción.

Cabe hacer notar que la mayoría de las autoridades en el tema consideran presuntivas todas las pruebas de detección sistemática positivas,²⁶³ y que requieren confirmación, a menos que la especificidad sea absoluta (criterio que sólo cumple el cultivo). El tema es más candente para *N. gonorrhoeae* que para *C. trachomatis* debido a la menor prevalencia de la primera. La mayoría de las pruebas para *C. trachomatis* se efectúan en ausencia de síntomas clínicos y, por lo tanto, son pruebas de detección sistemática. El director de cada laboratorio debe tomar la decisión. Si por consideraciones económicas la repetición confirmatoria de pruebas no puede generalizarse, la repetición está indicada cada vez que haya alguna duda clínica acerca de la validez del resultado. La complejidad del tema ha sido revisada con cuidado por un panel de expertos.²⁶³ Por ejemplo, si la prueba se repite, ¿debe usarse un método diferente? ¿Una segunda muestra? Si los dos resultados difieren, ¿cuál es el correcto?

Un problema importante de las pruebas de amplificación es la presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras clínicas. Algunos productos comerciales ofrecen un control de amplificación, pero no lo requieren de modo específico. Si una sustancia normalmente presente en la muestra (p. ej., β -globina) no es amplificada, un resultado negativo debe considerarse sospechoso. Lamentablemente, el costo de la prueba aumenta con este procedimiento. La amplificación mediada por transcripción no parece afectarse por los inhibidores.⁹⁵ Al menos en un estudio, los resultados obtenidos por el método de desplazamiento de hebra no se vieron afectados cuando se usó un control de

amplificación.⁴⁸⁸ El tema no es sólo académico, debido a que la sensibilidad de la prueba aumenta probando mayores volúmenes de orina, lo que no es sorprendente (aumentan los inhibidores si es que afectan los resultados de la prueba).³⁵²

Un enfoque frecuente de la citología endocervical es el uso de un medio líquido de recolección. Esta muestra también puede usarse para la detección de virus del papiloma y es también de utilidad para la amplificación de DNA de *C. trachomatis*.²⁷

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Los anticuerpos contra *C. psittaci* y las serovariedades de *C. trachomatis* pueden detectarse por pruebas de fijación del complemento. Una prueba de microinmunofluorescencia para anticuerpos contra *C. trachomatis* es más sensible para el diagnóstico de infecciones por linfogranuloma venéreo y puede también utilizarse para demostrar infecciones por otras serovariedades.¹⁶⁶ Esta prueba es menos común y deben probarse múltiples antígenos. Es de máxima utilidad para estudios seroepidemiológicos de poblaciones con alto riesgo de infecciones por clamidias.²⁶³

OTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La detección citológica de *Chlamydia* no suele considerarse fiable. Sin embargo, Kiviat y cols. han informado un patrón citológico inflamatorio que sugiere con firmeza la presencia de infección por clamidias.²⁸⁰ Cuando había presencia de linfocitos “transparentes” y una cantidad aumentada de histiocitos, se aisló *C. trachomatis* en el 53% de los pacientes; en ausencia de esos hallazgos, *C. trachomatis* se aisló sólo en el 4% de los pacientes. Si se observan estas características en un frotis cervical, debe considerarse la posibilidad de realizar pruebas específicas para clamidias.

Se dispone de pruebas para realizar a la cabecera del paciente, con menos requerimientos. Son menos sensibles y más caras que las que se efectúan en el laboratorio.²⁶³

DIAGNÓSTICO DE ABUSO SEXUAL

Entre los aspectos menos atractivos de las infecciones por *Chlamydia* se encuentra la aparición del microorganismo en los niños que han sufrido abuso sexual.¹¹⁴ La prueba de elección para la investigación de sospecha de abuso sexual o para otros fines legales es el cultivo.²⁶³

Chlamydia psittaci

Chlamydia psittaci es el agente etiológico de la psitacosis u ornitosis. La fuente de la infección es una variedad de aves, en especial las especies de psitácidos, como los loros.²¹⁴ En Carolina del Norte ocurrió un brote de psitacosis en una planta de procesamiento de pavos.⁶³ En el huésped natural pueden afectarse múltiples sistemas orgánicos. En el ser humano, el blanco de la infección primaria es el pulmón.⁴³⁵ La neumonía resultante suele ser subaguda o crónica, aunque puede manifestarse una infección leve asintomática,³⁵⁷ o una infección aguda fulminante.⁵¹ *C. psittaci* también causa endocarditis con cultivos negativos.⁵⁰⁶

El diagnóstico de psitacosis suele llevarse a cabo por serología. La prueba tradicional era la fijación del complemento, pero la de microinmunofluorescencia se ha transformado en la prueba serológica de referencia para esta infección.¹⁶⁶ Se detectaron anticuerpos fijadores de complemento para *C. psittaci* en 36 de 78 sueros (46%) enviados para serología para clamidias.⁵²⁴

Otros 12 sueros (15%) fueron positivos por microinmunofluorescencia y 9 sueros más tenían anticuerpos contra *C. pneumoniae* por microinmunofluorescencia.

El microorganismo puede aislarse en cultivos celulares utilizando los métodos ideados para *C. trachomatis*, pero este agente tiene mayor potencial para causar infecciones de laboratorio, de modo que deben tomarse más precauciones con las muestras. Se necesitan antisueros específicos de especie para la identificación definitiva de los aislamientos. Si la monocapa reacciona con anticuerpos contra el lipopolisacárido, pero no contra la proteína de la membrana externa de *C. trachomatis*, sugiere que hay otra especie de *Chlamydia* presente. Se ha informado la identificación presuntiva de *C. psittaci* directamente en secreciones respiratorias utilizando antisueros para lipopolisacáridos de clamidias.³⁷⁸ Se ha utilizado la PCR para identificar el microorganismo directamente en muestras clínicas¹²⁰ y después del aislamiento en cultivo.¹⁵⁰

Chlamydia pneumoniae

Chlamydia pneumoniae fue al principio aislada en pacientes con infecciones respiratorias y se denominó TWAR, por el nombre de los pacientes de los que provenía. Causa enfermedad respiratoria baja esporádica y epidémica caracterizada como una neumonía atípica.¹⁹⁹ Se ha calculado que el 10% de las neumonías de todo el mundo son originadas por este microorganismo,²⁷⁷ pero la mayoría de las infecciones no requieren hospitalización. La infección asintomática ocurre en el 2% al 5% de los individuos. *C. pneumoniae* fue detectada por cultivo o por PCR en la nasofaringe de 2 de 104 (1,9%) adultos asintomáticos.²⁵³ La prevalencia de anticuerpos contra *C. pneumoniae* en esta población fue del 82%.

La primoinfección tiene lugar en niños y adultos jóvenes, pero la inmunidad no es permanente y son frecuentes las reinfecciones en los adultos.²⁷⁷ El comienzo de la neumonía a menudo es insidioso, sin esputo purulento ni leucocitosis. La radiografía de tórax varía de normal hasta un compromiso amplio y no hay características diagnósticas. En la infección primaria, el patrón más común es el infiltrado alveolar unilateral.³⁴³ Pueden ocurrir infecciones pulmonares crónicas y los pacientes pueden tener síntomas durante semanas o meses.²¹¹

Chlamydia pneumoniae es una causa de faringitis por sí sola y combinada con otros agentes²⁵² y puede ser una causa de endocarditis con cultivos negativos.¹⁸⁰ Múltiples estudios han demostrado una asociación entre *C. pneumoniae* y la aterosclerosis, con enfermedad coronaria o sin ella.²⁷⁰ El microorganismo ha sido demostrado en repetidas ocasiones en las lesiones anatomopatológicas. Sin embargo, la causalidad de la asociación sigue siendo motivo de discusión y de más investigación.¹⁹⁸

Chlamydia pneumoniae puede cultivarse en el laboratorio utilizando células HeLa 229 con dextrano, células HL,¹⁰⁰ células HEP-2³¹⁸ o células NCI-H292.^{318,523} Si se utilizan las células HL o células 292, puede no ser necesario tratar las monocapas o realizar un pasaje ciego.⁵²³ El medio mínimo esencial de Eagle o el glutamato-sacarosa fosfato, con el agregado de una fuente proteica, como el suero fetal bovino, como se utiliza para los virus y para *C. trachomatis*, son medios de transporte útiles.³¹⁶ Las cepas de *C. pneumoniae* adaptadas al laboratorio son bastante estables, pero las cepas silvestres son más lábiles y no sobreviven bien más de algunas horas, aun a 4 °C. Las muestras deben ser congeladas, de preferencia a -70 °C, si no pueden procesarse el día de la recolección. Se dispone de antisueros monoclonales marcados con fluoresceína para la detección e identificación de aislamientos en cultivos.³⁵³ Los cultivos se

incubaban durante 72 horas. Se ha informado que la incubación en un medio sin suero aumenta la infecciosidad de las cepas adaptadas al laboratorio para las células HL de 10 a 50 veces y la cantidad de inclusiones producidas por una cepa silvestre.³¹⁷

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por *C. pneumoniae* se complica por la dificultad de su cultivo y por la inexistencia de un método de referencia fiable alternativo. La mayoría de las infecciones se diagnostican en forma serológica. La serología puede ser más complicada de lo que se cree en la actualidad. La variación antigénica entre aislamientos fue lo suficientemente grande en un estudio como para que los pacientes produjeran anticuerpos dosables sólo contra sus propios aislamientos.²⁹ La prueba de referencia es la microinmunofluorescencia. Se han creado enzimoimmunoanálisis, pero su rendimiento es variable.²²³ Se recomienda la demostración de seroconversión haciendo pruebas en suero de fase aguda y convaleciente¹²⁹ y representa el método serológico más reproducible entre diferentes laboratorios.³⁹¹ La reproducibilidad de las determinaciones de IgM entre laboratorios trabajando en colaboración fue muy variable.³⁹¹

Se han desarrollado métodos de amplificación molecular para la detección de *C. pneumoniae* en muestras respiratorias debido a las dificultades inherentes a los enfoques de cultivo y serológicos. En este momento, la falta de estandarización limita la utilidad de estas pruebas potencialmente importantes.³⁵ Es lamentable que menos del 25% de las pruebas de PCR cumplan los criterios de validación sugeridos por un panel de expertos.¹²⁹

Infecciones por *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*

El orden *Rickettsiales* incluye las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*.¹³⁵ El género más numeroso e importante es *Rickettsia*. *Rickettsia tsutsugamushi* ha sido reclasificada como *Orientia tsutsugamushi*. Estos microorganismos se encuentran dentro del subgrupo alfa-I de *Proteobacteria*. *Coxiella*, antes clasificada dentro del orden *Rickettsiales*, se encuentra ahora más relacionada con *Legionella* y *Francisella*, miembros del subgrupo gamma de *Proteobacteria*.³⁴⁰ El diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por rickettsias y la identificación de rickettsias en garrapatas han sido analizados por La Scola y Raoult.²⁹¹ Un siglo después del reconocimiento de estos agentes infecciosos, David Walker describió los orígenes del campo de la rickettsiología y la vida de Howard Ricketts, que finalmente sucumbió al tifus en la ciudad de México.⁵⁰³

Rickettsia y *Coxiella*

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLOGÍA

Las especies de *Rickettsia* infectan las células del endotelio vascular. Las manifestaciones clínicas de la infección son en consecuencia preestacionales y pueden reflejar el daño de cualquier sistema orgánico. La piel, los pulmones y el cerebro son los comprometidos por los síntomas con mayor frecuencia. El género *Rickettsia* puede dividirse en los grupos del tifus, de la fiebre fluvial japonesa y de la fiebre manchada (cuadro 23-27). El agente de la fiebre Q, *Coxiella burnetii*, es también un patógeno intracelular estricto. El principal medio de transmisión de las infecciones por rickettsias es la picadura de un artrópodo infectado, con la excepción de *C. burnetii*, que también puede transmitirse a través de leche infectada o de aerosoles.

El tifus epidémico ha sido uno de los grandes flagelos de la humanidad, que aparecía durante los períodos de hacinamiento

Cuadro 23-27 Infecciones causadas por *Rickettsias*

ENFERMEDAD	ESPECIE	INSECTO VECTOR
Grupo del tifus		
Tifus epidémico ^a	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Piojo del hombre
Tifus murino ^a	<i>R. typhi</i>	Pulga
Tifus recurrente (enfermedad de Brill-Zinsser) ^a	<i>R. prowazekii</i>	
Grupo de las fiebres manchadas		
Fiebre manchada de las Montañas Rocosas ^a	<i>R. rickettsii</i>	Especies de <i>Dermacentor</i>
Fiebre manchada del Mediterráneo (fiebre botonosa)	<i>R. conorii</i>	Especies de <i>Haemaphysalis</i>
Tifus por garrapatas de Siberia	<i>R. sibirica</i>	Especies de <i>Haemaphysalis</i> , Especies de <i>Dermacentor</i>
Tifus por garrapatas de Queensland	<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> , <i>Ixodes tasmanii</i>
Tifus por garrapatas israelí	<i>Rickettsia</i> del tifus por garrapatas israelí	Especies de <i>Rhipicephalus</i>
Fiebre manchada japonesa (oriental)	<i>R. japonica</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> ; <i>Dermacentor taiwanensis</i>
Fiebre manchada de la Isla Flinders	<i>R. honei</i>	<i>Aponomma hydrosauri</i>
Fiebre de Astracán	<i>Rickettsia</i> de la fiebre de Astracán	Especies de <i>Rhipicephalus</i>
Fiebre por picadura de garrapatas africana	<i>R. africae</i>	Especies de <i>Amblyomma</i>
Pox rickettsial ^a	<i>R. akari</i>	<i>Allodermanyssus sanguineus</i> (ácaro)
"Tifus por pulgas de gato"	<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> (pulga de gato)
Fiebre manchada innominada	" <i>R. mongolitomonae</i> "	Especies de <i>Hyalomma</i>
Grupo de la fiebre fluvial japonesa (scrub typhus)		
Fiebre fluvial japonesa	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	<i>Leptotrombidium</i> (larvas de ácaros)
Grupo de la fiebre Q		
Fiebre Q ^a	<i>Coxiella burnetii</i>	Animales parturientos, productos lácteos sin pasteurizar

^a Se encuentra en los Estados Unidos.
Adaptado de la referencia⁴⁰⁹.

e inanición. *R. prowazekii* se ha demostrado en las ardillas voladoras en el este de los Estados Unidos⁵²⁵ y ha ocurrido una pequeña cantidad de infecciones humanas asociadas. También se ha registrado un caso de tifus epidémico en el sudoeste.³³⁶

Aunque el tifus epidémico (transmitido por piojos) no es un problema grave en los Estados Unidos, hace muy poco, en 1996-1997, esta enfermedad clásica mató a 6 000 personas en Burundi. En los Estados Unidos, el tifus endémico (transmitido por pulgas o murino) ha recibido renovada atención. En la década de 1990 se identificó un foco de tifus murino en el sur de California y el sur de Texas. Fue transmitido por la pulga del gato y se perpetuó en gatos y zarigüeyas.⁴⁶¹ Los agentes etiológicos eran *R. typhi* clásica⁴⁶¹ y un nuevo agente, denominado inicialmente ELB.^{442,522} Es difícil la diferenciación serológica entre ambas rickettsias, de manera que es necesario el análisis molecular.⁴⁴² La rickettsia ELB se clasifica actualmente como *R. felis*.²²⁵ Por análisis molecular pertenece al grupo de las fiebres manchadas de las rickettsias, en lugar del grupo del tifus.³⁸

En los Estados Unidos, la infección por rickettsias más importante es la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, causada por *R. rickettsii*.⁵⁰⁰ Esta enfermedad febril multisistémica suele acompañarse por una erupción cutánea que comienza en las extremidades.⁵⁰¹ La infección está diseminada por todo el país, siempre que existan las garrapatas vectores (véanse cap. 22 y apéndice I). Paradójicamente, la infección es más común en los estados del medio oeste y centrales del sur que en el oeste y en los estados montañosos.²¹⁷ Infecciones similares, causadas por otras especies de rickettsias, se distribuyen en todo el mundo (cuadro 23-27).⁴⁰⁹

La fiebre fluvial japonesa no es endémica en los Estados Unidos. El agente causal se ha reclasificado como *Orientia tsutsugamushi*. La fiebre fluvial japonesa se acompaña a menudo por una escara primaria, que se ve sólo muy rara vez en la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. Las escaras primarias se observan también en el rickettsiosis pustulosa, causado por *Rickettsia akari*. La infección se demostró por primera vez en la ciudad de Nueva York y se asoció con la picadura de ácaros hematófagos. La rickettsiosis pustulosa es una enfermedad leve que no se encuentra a menudo, pero que existe en todo el mundo. Sigue estando presente en la ciudad de Nueva York.²⁷⁵

La fiebre Q suele causar infección asintomática, enfermedad febril indiferenciada, hepatitis granulomatosa o neumonía atípica.^{340,410} Puede ser transmitida por la leche, productos de la concepción o excretas de vacas, ovejas y cabras infectadas. El microorganismo se transmite fácilmente a los seres humanos sensibles y han ocurrido brotes epidémicos en laboratorios donde se utilizan ovejas para investigación.²⁰⁹ Una forma crónica de infección puede dar por resultado una endocarditis bacteriana subaguda. La erupción cutánea es rara en la fiebre Q.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El cultivo de *Rickettsia* se realiza sólo en laboratorios de referencia. La sangre o los tejidos de biopsia provenientes de una lesión deben ser congelados a -70 °C. La inmunofluorescencia directa puede realizarse sobre una muestra de biopsia o autopsia congeladas o fijadas con formalina. Las infecciones por rickettsias se diagnostican casi siempre por serología, utilizando suero de la etapa aguda y de convalecencia.

ASLAMIENTO DE *RICKETTSIA* Y *COXIELLA* EN CULTIVO

Rickettsia y *Coxiella* pueden aislarse en pequeños animales de laboratorio o en huevos embrionados.⁵⁰⁴ *Coxiella burnetii* ha sido aislada en cultivos en frascos ampolla de fibroblastos de pulmón de embrión humano en la sangre del 17% de los pacientes no tratados con fiebre Q aguda y del 53% de los pacientes no tratados con enfermedad crónica.³⁶⁹ Todas estas bacterias son altamente infecciosas cuando se forman aerosoles. Han sido responsables de muchas infecciones adquiridas en el laboratorio, algunas de las cuales fueron mortales.³⁷⁹ El aislamiento de los agentes debe intentarse sólo en los laboratorios donde la contención adecuada de la infección es posible. Puede cultivarse sangre entera o tejidos biopsiados.

DETECCIÓN DIRECTA DE ANTÍGENO Y ÁCIDOS NUCLEICOS EN MUESTRAS CLÍNICAS

Los antígenos de *Rickettsia rickettsii*, el agente etiológico de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, pueden detectarse directamente por tinción de cortes de lesiones de piel infectada utilizando las técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta o enzimoinmunoanálisis.⁵⁰⁴ La sensibilidad del procedimiento se aproxima al 70% y la especificidad es cercana al 100%. Habitualmente se toman biopsias de las lesiones petequiales cutáneas. Es más probable que las rickettsias estén en los vasos sanguíneos en el centro de la lesión, de modo que es importante asegurarse de que estos vasos se incluyen en los cortes. Los antígenos también pueden demostrarse en muestras incluidas en parafina y fijadas en formalina si el corte se trata primero con tripsina para exponer los antígenos.⁵⁰⁵ Aunque la prueba de inmunofluorescencia es de valor para realizar un diagnóstico precoz de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, está disponible en muy pocos laboratorios.

Los pacientes con enfermedad mortal por lo general mueren antes de desarrollar una respuesta serológica. La identificación de antígenos de rickettsias (y potencialmente de ácidos nucleicos) en tejidos es el único método para hacer un diagnóstico etiológico específico en esta situación.³⁸¹

Se describieron pruebas de amplificación molecular para demostrar la presencia de rickettsias en muestras clínicas, pero no son muy accesibles.^{145,291}

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La mayoría de los diagnósticos de infecciones por rickettsias se realizan por serología.¹³² En los últimos años, la prueba de microinmunofluorescencia se ha convertido en la prueba de referencia.³⁹⁷ Este procedimiento parece ser el método más sensible y específico para el diagnóstico de infecciones por rickettsias.²⁷³ El grado de reacciones cruzadas entre las especies de rickettsias varía de un paciente a otro.³⁹⁷ Las reacciones cruzadas tienen su máxima intensidad dentro de los subgrupos de rickettsias. Puede ser difícil distinguir entre tifus endémico y epidémico o entre la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y la rickettsiosis pustulosa.⁵⁰⁴ Los anticuerpos aparecen a los 7 a 10 días después de la infección. Para el diagnóstico, es deseable una elevación de cuatro veces en los anticuerpos séricos, aunque un único título de más de 1:64 es muy sugestivo.

La prueba de microinmunofluorescencia requiere personal bien entrenado y un microscopio de fluorescencia. Las pruebas de aglutinación del látex, que actualmente se comercializan para la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, son de uso más general. Las pruebas del látex parecen provocar reacciones positivas sólo durante una infección aguda, de modo que una

única prueba positiva es diagnóstica.²²⁰ La sensibilidad ha oscilado entre el 70% y el 95%.^{220,273} Después de la infección por *Coxiella burnetii*, pueden producirse anticuerpos para las dos fases biológicas del microorganismo. Los anticuerpos para la fase II se producen primero. Los anticuerpos para la fase I, que aparecen semanas o meses más tarde, pueden alcanzar niveles altos en los pacientes con endocarditis por fiebre Q. Si los anticuerpos contra ambas fases de *Coxiella* son altos en un paciente con endocarditis con cultivos negativos, es probable el diagnóstico de fiebre Q.^{278,463}

Históricamente, la prueba diagnóstica más común para la enfermedad causada por rickettsias ha sido la prueba de Weil-Felix, en la que se detectan anticuerpos antirickettsia que reaccionan en forma cruzada con cepas de especies de *Proteus*. La prueba se originó de la observación casual de que los sueros provenientes de pacientes con tifus aglutinaban cepas de *Proteus vulgaris*. A medida que se acumuló experiencia con pruebas serológicas inmunológicamente específicas se ha hecho evidente que la prueba de Weil-Felix no es sensible ni específica.^{221,273,504} En algunas poblaciones, un resultado de una prueba de Weil-Felix positivo ha sido más frecuente en quienes no tenían fiebre manchada de las Montañas Rocosas que en quienes estaban infectados.⁵⁰⁴ Todos estos hechos son fuertes argumentos a favor de la relegación de esta prueba a los archivos.

Especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*

La familia *Anaplasmataceae* incluye bacterias similares a las rickettsias, que pueden infectar a seres humanos y a diversas especies animales y producir enfermedades como la pancitopenia canina tropical y la fiebre equina del Potomac (cuadro 23-28).⁴²¹ Son parásitos intracelulares estrictos y, a semejanza de las rickettsias, crecen en el citosol de las células infectadas.

Cuadro 23-28 Algunas *Ehrlichia* y microorganismos relacionados con sus enfermedades asociadas^a

MICROORGANISMO	ENFERMEDAD	HUÉSPED
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrliquiosis monocítica humana	Seres humanos
	Ehrliquiosis monocítica canina	Perros
<i>Ehrlichia ewingii</i>	"Ehrliquiosis ewingii"	Seres humanos
	Ehrliquiosis granulocítica canina	Perros
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehrliquiosis monocítica canina	Perros
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmosis granulocítica humana	Seres humanos
	Anaplasmosis granulocítica equina	Caballos
	Anaplasmosis granulocítica canina	Perros
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Fiebre sennetsu	Humanos
<i>Neorickettsia risticii</i>	Fiebre equina del Potomac	Caballos
<i>Neorickettsia helmintheca</i>	Enfermedad por envenenamiento con salmón	Salmón

^a Cortesía de J. Stephen Dumler.

La infección humana por *Ehrlichia*, un fenómeno recién reconocido, está causada por varias especies distintas, dos de las cuales son las más importantes: *Ehrlichia chaffeensis*, que infecta células monocíticas humanas^{8,117} y una segunda especie que infecta células granulocíticas (*Anaplasma phagocytophilum*, en su origen designada *Ehrlichia granulocítica humana*).⁸⁸ Ambas especies se transmiten al ser humano por garrapatas y causan una enfermedad febril con leucopenia, trombocitopenia y elevación de los niveles de aminotransferasas séricas.¹³⁴

Ehrliquiosis monocítica humana. La variedad monocítica de ehrliquiosis, causada por *Ehrlichia chaffeensis*, fue reconocida primero. Se distribuye ampliamente por el sudeste, medio oeste y lejano oeste de los Estados Unidos. En zonas donde las garrapatas vectores son prevalentes, se observaron seroconversiones para *Rickettsia rickettsii* en el 2,5% y para *E. chaffeensis* en el 1,3% del personal militar.⁵³⁰ En el sur de Georgia, la ehrliquiosis monocítica humana fue de siete a ocho veces más prevalente que la fiebre manchada de las Montañas Rocosas.¹⁵⁷ El contacto con garrapatas es un factor de riesgo para contraer ehrliquiosis monocítica y fiebre manchada de las Montañas Rocosas.⁹ Ocurrió un brote de ehrliquiosis monocítica en una comunidad de jubilados dedicados al golf (comunidad A) que lindaba con un área de vida salvaje natural.⁴⁶⁶ No se manifestaron casos en una comunidad vecina con campos de golf (comunidad B) que no estaba rodeada por un área natural. La prevalencia de anticuerpos contra *E. chaffeensis* en la comunidad A fue del 12,5%, en tanto que en la comunidad B fue del 3,3%. En la comunidad A se encontraron miles de garrapatas *A. americanum*, pero se hallaron sólo tres en la comunidad B. Los factores de riesgo para contraer ehrliquiosis son picaduras de garrapatas, contacto con formas de vida silvestre, omisión del uso de repelentes de insectos y jugar al golf. Entre los jugadores de golf, los que tenían mayor riesgo fueron los hookers y los slicers, que recogen constantemente la pelota de terrenos escabrosos. La moraleja es que si usted juega al golf en un área rural, debe utilizar repelente de insectos y simplemente pegarle a la pelota.

Los síntomas clínicos de la ehrliquiosis monocítica varían desde una enfermedad febril inespecífica hasta una infección sistémica grave con insuficiencia multiorgánica.^{134,156} En un estudio que incluyó a 237 pacientes infectados, el 60,8% fue hospitalizado.¹⁵⁶ La ehrliquiosis monocítica grave con insuficiencia de múltiples sistemas orgánicos se ha confundido con la púrpura trombótica trombocitopénica³³⁴ y con el síndrome de shock tóxico.¹⁵⁵ En los individuos infectados por el HIV la enfermedad es potencialmente mortal.³⁸⁰

Dentro del citoplasma de los monocitos infectados pueden verse masas de ehrlichias (móculas; lámina en color 23-2G), pero estas estructuras diagnósticas se observan con poca frecuencia en las infecciones causadas por *E. chaffeensis*.^{134,136} El diagnóstico es serológico, por cultivo del agente⁸⁹ o por métodos moleculares.^{10,151}

Anaplasmosis granulocítica humana (antes ehrliquiosis granulocítica humana). El segundo microorganismo patógeno principal es el agente de la anaplasmosis granulocítica humana (AGH), detectado por primera vez en Minnesota y Wisconsin por un infectólogo que reconoció la similitud de las inclusiones granulocíticas intracelulares con las descritas para la infección causada por *E. chaffeensis*.^{18,88} El agente de la anaplasmosis granulocítica humana aún se ha clasificado como *Anaplasma phagocytophilum*; se lo considera estrechamente relacionado con el agente granulocítico humano, *E. phagocytophila* y con *E. equi*.¹³⁵ Aunque se describieron variantes,³³⁷ las cepas de *A. phagocytophilum* muestran un alto grado de uniformidad genética en los Estados Unidos.¹³³

El vector más importante en los Estados Unidos es *Ixodes scapularis* (véanse caps. 20 y 22 y apéndice I), el mismo vector que transmite la enfermedad de Lyme y la babesiosis.³⁸⁴ La duración del contacto requerida para la transmisión de *A. phagocytophilum* parece ser un poco menor que la necesaria para la infección por *Borrelia burgdorferi*,^{123,276} pero la dinámica exacta de la infección no se ha aclarado todavía. Los pacientes de la parte norte del centro de los Estados Unidos parecen haber estado infectados, según los estudios serológicos, por los tres agentes patógenos.³⁴⁸ No es sorprendente que la distribución de la anaplasmosis granulocítica humana se esté expandiendo para cubrir la distribución de la garrapata huésped. En la actualidad, se han informado infecciones en varias zonas centrales del norte y el este de los Estados Unidos. La AGH también se ha demostrado en California,¹⁶⁰ así como en Europa y Asia. En algunas partes del país, deben incluirse todas las enfermedades causadas por *Rickettsia* y *Ehrlichia* en el diagnóstico diferencial de las enfermedades febriles.⁵⁷ Se describieron infecciones dobles por ehrlichias y rickettsias.⁴⁴⁵ Por lo tanto, puede ser importante incluir antígenos de todos los patógenos posibles cuando se intenta el diagnóstico serológico; la demostración de la seroconversión cobra una importancia aún mayor.¹⁰⁵

La enfermedad clínica parece ser similar a la producida por *E. chaffeensis*. La plaquetopenia es más frecuente que la leucopenia. La leucocitosis se acompaña por linfopenia absoluta y relativa.¹⁷ También ocurren casos de neumonitis intersticial⁴¹⁶ y de diplejía facial.³⁰⁶ Se ha informado la reinfección.²⁴⁰

El diagnóstico de laboratorio recién está en sus comienzos. Las inclusiones intracelulares (móculas) en los granulocitos (lámina en color 23-2H) parecen ser más frecuentes que las inclusiones en la ehrliquiosis monocítica,¹⁸ pero puede haber un sesgo en las determinaciones cuando no se dispone fácilmente de apoyo del laboratorio de diagnóstico. Se ha publicado el cultivo del microorganismo in vitro,¹⁹⁴ pero la confirmación de la mayoría de los casos se realiza por técnicas serológicas que están disponibles en laboratorios de referencia.⁵⁰² La técnica más común es la inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos alcanzan su máximo alrededor de un mes después de la infección y son detectables todavía un año más tarde en cerca de la mitad de los pacientes.⁴ La mayoría de los pacientes hacen una seroconversión y un pequeño porcentaje permanecen seropositivos durante años.¹⁹ Aunque algunos antígenos bacterianos tienen reacción cruzada con los agentes de la ehrliquiosis/anaplasmosis monocítica y granulocítica, las principales proteínas de membrana externa no comparten determinantes antígenicos.⁴⁸⁶ El análisis por Western blot puede ayudar a resolver los resultados serológicos confusos.

Se describieron pruebas de amplificación molecular para *A. phagocytophilum* y existen reactivos comerciales.³³⁸ Las pruebas, que no están ampliamente disponibles, deben considerarse en fase de desarrollo.

Otras infecciones causadas por Ehrlichia. Un tercer agente del género *Ehrlichia* se ha identificado como la causa de una enfermedad semejante a la ehrliquiosis en Missouri. El agente etiológico, *Ehrlichia ewingii*, se conocía antes como causante de ehrliquiosis canina.⁴⁹

Otras dos bacterias pueden infectar al hombre en ciertas ocasiones: *Ehrlichia canis*, que también infecta a los perros,^{156,322} y *Neorickettsia* (antes *Ehrlichia*) *senetsu*.⁴²¹

Actualización del capítulo: La preocupación en ámbitos científicos y públicos acerca de la aparición de nuevas infecciones virales y el resurgimiento de otras está en aumento. Los

virus de la gripe aviar, que han demostrado su capacidad para infectar al hombre, son la principal intranquilidad (tipos de hemaglutinina H5, H7 y H9)(<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/>). Hasta la fecha, no ha habido una transmisión eficaz entre seres humanos, pero existe el temor generalizado de que una cepa capaz de hacerlo se encuentre “a la vuelta de la esquina”. Además, los virus H2N2, que no estaban en circulación desde la década de 1960, han atraído la atención, porque no han sido incluidos en las vacunas y grandes segmentos de la población son sensibles. El uso de una cepa H2N2 (una cepa adaptada al laboratorio que parece haber sido no patógena) pone el tema en el frente de batalla. Los CDC recomiendan ahora que las cepas H2N2 y todas las cepas aviarias sean manejadas como agentes de bioseguridad de nivel 3, en lugar del nivel 2 asignado antes (<http://www.cdc.gov/flu/han050305.htm>). Una epidemia de virus Marburg (un filovirus) en Angola (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5412a5.htm>) y una de virus de la coriomeningitis linfocítica (un arnavirus) en pacientes inmunosuprimidos, que se asoció con hámsteres mantenidos como mascotas (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm54d526a1.htm>) subrayan la relevancia continua de los virus “exóticos”. Aunque el coronavirus del SARS ha disminuido como amenaza por el momento, parece que el metaneumovirus humano, que resultó *no ser* la causa del SARS, es una causa relativamente frecuente de infección respiratoria en niños y adultos, pero poco frecuente en individuos asintomáticos (Falsey y cols., J Clin Virol, mayo de 2005). En una nota positiva varios investigadores han demostrado la utilidad de la detección sistemática de la infección por el HIV (N Eng J Med, 10 de febrero de 2005).

REFERENCIAS

- Strategic Science Symposium: human papillomavirus testing—are you ready for a new era in cervical cancer screening? Arch Pathol Lab Med 2003;127:927-996.
- Abels S, et al. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. J Clin Microbiol 2001;39:3135-3139.
- Ackerman SJ. HIV-1 link prompts circumcision on circumcision. J NIH Res 1991; 3:44-46.
- Aguero-Rosenfeld ME, et al. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol 2000;38:635-638.
- Albert MR, et al. Smallpox manifestations and survival during the Boston epidemic of 1901 to 1903. Ann Intern Med 2002;137:993-100.
- Almeida JD. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. Curr Top Microbiol Immunol 1983;104:147-158.
- Alter MJ, et al. Guideline for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 2003;52(RR-03):1-15.
- Anderson BE, et al. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991;29:2838-2842.
- Anderson BE, et al. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. Am J Trop Med Hyg 1993;49:239-244.
- Anderson BE, et al. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:775-780.
- Ando T, et al. Genetic classification of “Norwalk-like viruses.” J Infect Dis 2000; 181:Suppl:48.
- Anunziato D, et al. Atypical measles syndrome: pathologic and serologic findings. Pediatrics 1982;70:203-209.
- Arvin AM. Varicella-zoster virus. In: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL, et al., eds. Virology. Ed. 2. New York: Raven Press, 1990:2731-2767.
- Arvin AM, et al. Immunologic evidence of reinfection with varicella-zoster virus. J Infect Dis 1983;148:200-205.
- Ashley RL, et al. Ability of a rapid serology test to detect seroconversion to herpes simplex virus type 2 glycoprotein G soon after infection. J Clin Microbiol 1999;37: 1632-1633.
- Ashley RL, Wald A. Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. Clin Microbiol Rev 1999;12:1-8.
- Bakken JS, et al. Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis 2001;32:862-870.
- Bakken JS, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States: a new species emerging? JAMA 1994;272:212-218.
- Bakken JS, et al. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis 2002;34:22-27.
- Barenfanger J, et al. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. J Clin Microbiol 2000;38:2824-2828.
- Barenfanger J, et al. R-Mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. J Clin Virol 2001;22:101-110.
- Battle TJ, et al. Evaluation of laboratory testing methods for *Chlamydia trachomatis* infection in the era of nucleic acid amplification. J Clin Microbiol 2001;39:2924-2927.
- Beld M, et al. Performance of the new Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor Version 2.0. assay. J Clin Microbiol 2002;40:788-793.
- Belongia EA, et al. An outbreak of herpes gladiatorum at a high-school wrestling camp. N Engl J Med 1991;325:906-910.
- Bendinelli M, Pisello M, Maggi F, Vatteroni M. Blood-borne hepatitis virus: hepatitis B, C, D and G viruses and TT virus. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. Clinical Virology Manual. Ed. 3. Washington DC: ASM Press 2000;306-337.
- Benedetti J, et al. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. Ann Intern Med 1994;121:847-854.
- Bianchi A, et al. PreservCyt transport medium used for the ThinPrep Pap test is a suitable medium for detection of *Chlamydia trachomatis* by the COBAS Amplicor CT/NG test: results of a preliminary study and future implications. J Clin Microbiol 2002;40:1749-1754.
- Binn LN, et al. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. J Clin Microbiol 1984;20:28-33.
- Black CM, et al. Antigenic variation among strains of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 1991;29:1312-1316.
- Blackard JT, et al. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. Clin Infect Dis 2002;34:1108-1114.
- Blank BS, et al. Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol 2000;38:563-569.
- Bloom ME, Young NS. Parvoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL, et al. eds. Virology. Ed. 2. New York: Raven Press, 1990:2361-2379.
- Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 1977;97:17-25.
- Boivin G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. J Infect Dis 2002;186:1330-1334.
- Boman J, et al. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1999;37:3791-3799.
- Booth CM, et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. JAMA 2003;289:2801-2809.
- Bourlet T, et al. New PCR test that recognizes all human prototypes of enterovirus: application for clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2003;41:1750-1752.
- Bouyer DH, et al. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:339-347.
- Boylston AW. Clinical investigation of smallpox in 1967. N Engl J Med 2002; 346:1326-1328.
- Bradley R, Wilesmith JW. Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Br Med Bull 1993;49:932-959.
- Bray M, Wrigth ME. Progressive vaccinia. Clin Infect Dis 2003;36:766-774.
- Breman JG, et al. Preventing the return of smallpox. N Engl J Med 2003;348:463-466.
- Brindeiro PA, et al. Testing genotypic and phenotypic resistance in human immunodeficiency virus type 1 isolates of clade B and other clades from children failing antiretroviral therapy. J Clin Microbiol 2002;40:4512-4519.
- Brinker JP, Doern GV. Comparison of MRC-5 and A-549 cells in conventional culture tubes and shell vials assays for the detection of varicella-zoster virus. Diagn Microbiol Infect Dis 1993;17:75-77.
- Brinker JP, Doern GV. Enhancement of varicella-zoster virus detection in A-549 shell vials by use of freeze-thawed specimens, extended incubation and “a centrifuged, not incubated” direct detection method. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;31:555-558.
- Bromberg K, et al. Comparison of Ortho respiratory syncytial virus enzyme-linked immunosorbent assay and HEp-2 cell culture. J Clin Microbiol 1985;22:1071-1072.
- Bru AL, Nordbo SA. Evaluation of five commercial test for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. J Clin Microbiol 1995;33:1363-1365.
- Buchmeier MJ, Bowen MD, Peters CJ. *Arenaviridae*: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Melnick JL et al. eds. Virology. Ed. 2. New York: Raven Press 1990:1635-1668.
- Buller RS, et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med 1999;341:148-155.
- Bush RM, et al. Predicting the evolution of human influenza A. Science 1999;286: 1921-1925.
- Byrom NP, et al. Fulminant psittacosis. Lancet 1979;1:353-356.
- Caldwell MB, et al. 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994;43(RR 12):1-10.
- Caliendo AM, et al. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. J Clin Microbiol 2002;40:1581-1586.
- Caliendo AM, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. J Clin Microbiol 2000;38:2122-2127.

55. Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:89-116.
56. Calisher CH, Mahy BW. Taxonomy: get it right or leave it alone. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:505-506.
57. Carpenter CF, et al. The incidence of ehrlichial and rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in central North Carolina. *J Infect Dis* 1999;180:900-903.
58. Carrat F, et al. Evaluation of clinical case definitions of influenza: detailed investigation of patients during the 1995-1996 epidemic in France. *Clin Infect Dis* 1999;28:283-290.
59. Castle PE, et al. Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin Microbiol* 2002;40:1088-1090.
60. Castle PE, et al. Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *J Clin Microbiol* 2003;41:4022-4030.
61. Castro KG, et al. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:(RR-17).
62. Centers for Disease Control and Prevention. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989;38(S7):1-7.
63. Centers for Disease Control and Prevention. Psittacosis at a turkey processing plant—North Carolina, 1989. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990;39:460-469.
64. Centers for Disease Control and Prevention. Update: measles outbreak. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990;39:317-326.
65. Centers for Disease Control and Prevention. Interpretive criteria used to report Western blot results for HIV-1 antibody testing—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40:692-695.
66. Centers for Disease Control and Prevention. Pseudo-outbreak of infectious mononucleosis—Puerto Rico 1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40:552-555.
67. Centers for Disease Control and Prevention. Arenavirus infection—Connecticut, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:635-636.
68. Centers for Disease Control and Prevention. Bolivian hemorrhagic fever—El Beni Department, Bolivia, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:943-946.
69. Centers for Disease Control and Prevention. Interstate Measles Transmission from a Ski Resort—Colorado 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:627-629.
70. Centers for Disease Control and Prevention. Mass treatment of humans exposed to rabies—New Hampshire 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44:484-486.
71. Centers for Disease Control and Prevention. Appendix: Revised surveillance case definition for HIV infection. *MMWR Recomm Rep* 1999;48(RR-13):29-31.
72. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses. *MMWR CDC Surveill Summ* 1999;48:1-22.
73. Centers for Disease Control and Prevention. Appendix A: practice recommendations for health-care facilities implementing the U.S. public health service guide-lines for management of occupational exposures to bloodborne pathogens *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-11):43-44.
74. Centers for Disease Control and Prevention. Appendix B: management of occupational blood exposures. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-11):45-46.
75. Centers for Disease Control and Prevention. Appendix C: basic and expanded HIV postexposure prophylaxis regimens. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-11):47-52.
76. Centers for Disease Control and Prevention. Revised recommendations for HIV screening of pregnant women: perinatal counseling and guidelines consultation. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-19):59-66.
77. Centers for Disease Control and Prevention. Updated U.S. public health service guideline for the management of occupational exposures to HBV, HCV, and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-11):1-42.
78. Centers for Disease Control and Prevention. Fatal degenerative neurologic illnesses in men who participated in wild game feasts—Winconsin, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:125-127.
79. Centers for Disease Control and Prevention. Global progress toward certifying polio eradication and laboratory containment of wild polioviruses—August 2002–August 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:1158-1160.
80. Centers for Disease Control and Prevention. Increases in HIV diagnoses—29 states, 1999–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:1145-1148.
81. Centers for Disease Control and Prevention. Bovine spongiform encephalopathy in a dairy cow—Washington State, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;52:1280-1285.
82. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of avian influenza A (H5N1) in Asia and interim recommendation for evaluation and reporting of suspected cases—United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:97-100.
83. Celum CL, et al. Indeterminate human immunodeficiency virus type I western blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation. *J Infect Dis* 1991;164:656-664.
84. Chan KH, et al. Evaluation of the Directigen FluA + B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:1675-1680.
85. Chan KH, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis* 2004;10:294-299.
86. Chan PK, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1058-1063.
87. Chandler FW, Gorenkin L. Immunofluorescence staining of adenovirus in fixed tissues pretreated with trypsin. *J Clin Microbiol* 1983;17:371-373.
88. Chen SM, et al. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994;32:589-595.
89. Chen SM, et al. Cultivation of *Ehrlichia chaffeensis* in mouse embryo, Vero BGM, and L929 cells and study of *Ehrlichia*-induced cytopathic effect and plaque formation. *Infect Immun* 1995;63:647-655.
90. Chernin E, Weller TH. Serial propagation of *Toxoplasma gondii* in roller tube cultures of mouse and of human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;85:68-72.
91. Chesebro B. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 2003;66:1-20.
92. Chevreton S, et al. Usefulness of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for predicting the occurrence of CMV disease and death in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1999;28:758-763.
93. Chiba S, et al. Sapporo virus: history and recent findings. *J Infect Dis* 2000;181: Suppl 8.
94. Choi KW, et al. Outcomes and prognostic factors in 267 patients with severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Ann Intern Med* 2003;139:715-723.
95. Chong S, et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. *J Clin Microbiol* 2003;41:778-782.
96. Chonmaitree T, et al. Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patient with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:1-14.
97. Chou S. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strain from individual organ donors. *J Infect Dis* 1989;160:11-15.
98. Christy C, et al. Comparison of three enzyme immunoassays to tissue culture for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1990;28:1428-1430.
99. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004;350:1023-1035.
100. Cles LD, Stamm WE. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:938-940.
101. Clyde WA, Kenny CE, Schachter J. *Diagnosis of Chlamydia Infection*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1984.
102. Cohen JJ, et al. Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (cercopithecine herpesvirus 1). *Clin Infect Dis* 2002;35:1191-1203.
103. Cohen OJ, Fauci AS. Pathogenesis and medical aspects of HIV-1 infection. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2043-2094.
104. Collinge J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999;354:317-323.
105. Comer JA, et al. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. *J Clin Microbiol* 1999;37:558-564.
106. Consensus Conference: The impact of routine HTLV-III antibody testing of blood and plasma donors on public health. *JAMA* 1986;256:1778-1783.
107. Condit RC. Principles of virology. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:19-51.
108. Cordonnier C, et al. Evaluation of three assays on alveolar lavage fluid in the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1987;155:495-500.
109. Cote S, et al. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3631-3635.
110. Couch RB. Rhinoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:777-797.
111. Dahl H, et al. Antigen detection: the method of choice in comparison with virus isolation and serology for laboratory diagnosis of herpes zoster in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:347-349.
112. Daly P, et al. High-sensitivity PCR detection of parvovirus B19 in plasma. *J Clin Microbiol* 2002;40:1958-1962.
113. Darwin LH, et al. Comparison of Digene Hybrid Capture 2 and conventional culture for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:641-644.
114. Dattel BJ, et al. Isolation of *Chlamydia trachomatis* from sexually abused female adolescents. *Obstet Gynecol* 1988;72:240-242.
115. David AS, et al. Postviral fatigue syndrome: time for a new approach. *BMJ* 1988;296:696-699.
116. Davidsohn I, Lee CL. The laboratory in the diagnosis of infectious mononucleosis with additional note on epidemiology, etiology and pathogenesis. *Med Clin North Am* 1962;46:225-244.
117. Dawson JE, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2741-2745.
118. de Baar MP, et al. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. *J Clin Microbiol* 2001;39:1378-1384.
119. De Tiege X, et al. Limits of early diagnosis of herpes simplex encephalitis in children: a retrospective study of 38 cases. *Clin Infect Dis* 2001;36:1335-1339.
120. Dean D, et al. Molecular identification of an avian strain of *Chlamydia psittaci* causing severe keratoconjunctivitis in a bird fancier. *Clin Infect Dis* 1995;20:1179-1185.
121. DeHertogh DA, Brettman LR. Hemorrhagic cystitis due to herpes simplex virus as a marker of disseminated herpes infection. *Am J Med* 1988;84:632-635.
122. del Mar MM, et al. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus b19 by using multiple PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:1111-1116.
123. des Vignes F, et al. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001;183:773-778.
124. Dhar AD, et al. Tanapox infection in a college student. *N Engl J Med* 2004;350:361-366.
125. Diaz-Mitoma F, et al. Comparison of DNA amplification, mRNA amplification, and DNA hybridization techniques for detection of cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003;41:5159-5166.

126. Doern GV, et al. Comparison of the Vidas and Bio-Whittaker enzyme immunoassays for detecting IgG reactive with varicella-zoster virus and mumps virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:31-34.
127. Dolin R, et al. Novel agents of viral enteritis in humans. *J Infect Dis* 1987;155:365-376.
128. Donnelly CA. Bovine spongiform encephalopathy in the United States—an epidemiologist's view. *N Engl J Med* 2004;350:539-542.
129. Dowell SF, et al. Standardizing assays: recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001;33:492-503.
130. Drew WL. Controversies in viral diagnosis. *Rev Infect Dis* 1986;8:814-824.
131. Drosten C, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2323-2330.
132. Dumler JS. Serodiagnosis of rickettsial infections. In: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Ed. 2. Washington, DC: ASM Press, 2004; 11.7.1.1-11.7.4.3.
133. Dumler JS, et al. Analysis of genetic identity of North American *Anaplasma phagocytophilum* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3392-3394.
134. Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis* 1995;20:1102-1110.
135. Dumler JS, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia* descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2145-2165.
136. Dumler JS, et al. Persistent infection with *Ehrlichia chaffeensis*. *Clin Infect Dis* 1993;17:903-905.
137. Dunn JJ, et al. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004;42:79-82.
138. Durant J, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:2195-2199.
139. Dybul M, et al. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents: recommendations of the panel on clinical practices for treatment of HIV. *MMWR Recomm Rep* 2002;51(RR-07).
140. Eing BR, et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of human rotaviruses in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:4532-4534.
141. Emanuel D, et al. Rapid immunodiagnosis of cytomegalovirus pneumonia by bronchoalveolar lavage using human and murine monoclonal antibodies. *Ann Intern Med* 1986;104:476-481.
142. Enders JF, et al. Isolation of measles virus at autopsy in cases of giant-cell pneumonia without rash. *N Engl J Med* 1959;261:875-881.
143. Enders JF, et al. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in culture of various human embryonic tissues. *Science* 1949;109:85-87.
144. Engblom E, et al. Fatal influenza A myocarditis with isolation of virus from the myocardium. *Acta Med Scand* 1983;213:75-78.
145. Ereemeeva ME, et al. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5466-5472.
146. Eposito JJ, Fenner F. Poxviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;2885-2921.
147. Espy MJ, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in genital and dermal specimens by LightCycler PCR after extraction using the IsoQuick, MagNA Pure, and BioRobot 9604 methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2233-2236.
148. Espy MJ, Smith TF. Detection of herpes simplex virus in conventional tube cell cultures and in shell vials with a DNA probe kit and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1988;26:22-24.
149. Espy MJ, et al. Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1986;24:677-679.
150. Essig A, et al. Diagnosis of ornithosis by cell culture and polymerase chain reaction in a patient with chronic pneumonia. *Clin Infect Dis* 1995;21:1495-1497.
151. Everett ED, et al. Human ehrlichiosis in adults after tick exposure: diagnosis using polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1994;120:730-735.
152. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:371-384.
153. Falsey AR, et al. Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J Infect Dis* 1990;162:568-569.
154. Fedorko DP, et al. Effect of age of shell vial monolayers on detection of cytomegalovirus from urine specimens. *J Clin Microbiol* 1989;27:2107-2109.
155. Fichtenbaum CJ, et al. Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome. *Am J Med* 1993;95:351-357.
156. Fishbein DB, et al. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann Intern Med* 1994;120:736-743.
157. Fishbein DB, et al. Human ehrlichiosis prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. *J Infect Dis* 1989;160:803-809.
158. Fleisher GR, et al. Limitations of available tests for diagnosis of infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1983;17:619-624.
159. Foley FD, et al. Herpesvirus infection in burned patients. *N Engl J Med* 1970;282: 652-656.
160. Foley JE, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Northern California: two case description with genetic analysis of the ehrlichiae. *Clin Infect Dis* 1999;29:388-392.
161. Fong CKY, Landry ML. An adventitious viral contaminant in commercially supplied A-549 cells: identification of infectious bovine rhinotracheitis virus and its impact on diagnosis of infection in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1992;31:1611-1613.
162. Forbes BA, Bartholoma NY. Detection of cytomegalovirus in clinical specimens using shell vial centrifugation and conventional cell culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;10:121-124.
163. Formenty P, et al. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J Infect Dis* 1999;179:S120-S126.
164. Francis DP, et al. Viral load test reports: a description of content from a sample of US laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1546-1554.
165. Freed ER, Manin MA. HIVs and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;1971-2041.
166. Freidank HM, et al. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibody to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:685-688.
167. Frenkel LM, et al. Clinical reactivation of herpes simplex virus type 2 infection in seropositive pregnant women with no history of genital herpes. *Ann Intern Med* 1993;118:414-418.
168. Frey SE, Belshe RB. Poxvirus zoonoses-putting pocks into context. *N Engl J Med* 2004;350:324-327.
169. Fulginiti VA, et al. Smallpox vaccination: a review, part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions. *Clin Infect Dis* 2003;37:241-250.
170. Fulginiti VA, et al. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. *Clin Infect Dis* 2003;37:251-271.
171. Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 1977;197:943-960.
172. Galli RA, et al. Source and magnitude of intralaboratory variability in a sequence-based genotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Clin Microbiol* 2003;41:2900-2907.
173. Gallwitz S, et al. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J Clin Microbiol* 2003;41:4068-4070.
174. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
175. Garcia-Tapia AM, et al. Spectrum of parvovirus B19 infection: analysis of an outbreak of 43 cases in Cadiz Spain. *Clin Infect Dis* 1995;21:1424-1430.
176. Garry RF, et al. Documentation of an AIDS virus infection in the United States in 1968. *JAMA* 1988;260:2085-2087.
177. Gault E, et al. Evaluation of a new serotyping assay for detection of anti-hepatitis C virus type-specific antibodies in serum samples. *J Clin Microbiol* 2003;41:2084-2087.
178. Gaydos CA, et al. Phylogenetic relationship of *Chlamydia pneumoniae* to *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* as determined by analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:610-612.
179. Gaydos CA, et al. Performance of the APTIMA Combo 2 Assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:304-309.
180. Gdoura R, et al. Culture-negative endocarditis due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002;40:718-720.
181. Gentry GA, et al. Isolation and differentiation of herpes simplex virus and *Trichomonas vaginalis* in cell culture. *J Clin Microbiol* 1985;22:199-204.
182. Gerin JL, Casey JL, Purcell RH. Hepatitis delta virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;3037-3050.
183. Giachetti C, et al. Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2002;40:2418-2419.
184. Gibbs CJ Jr, et al. Experimental transmission of scrapie to cattle. *Lancet* 1990;335: 1275.
185. Ginocchio CC, et al. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the NucliSens HIV-1 QT assay used for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:164-173.
186. Glass GE, et al. Infection with a ratborne hantavirus in US residents is consistently associated with hypertensive renal disease. *J Infect Dis* 1993;167:614-620.
187. Glatzel M, et al. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2003;349:1812-1820.
188. Gleaves CA, et al. Use of murine monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of varicella-zoster virus infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1623-1625.
189. Glezen WP, et al. Acute respiratory disease of university students with special reference to the etiologic role of herpesvirus hominis. *Am J Epidemiol* 1975;101:111-121.
190. Goff SP. *Retroviridae*: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;1871-1939.
191. Goh KJ, et al. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* 2000;342:1229-1235.
192. Goldmann DA. Epidemiology and prevention of pediatric viral respiratory infections in health-care institutions. *Emerg Infect Dis* 2001;7:249-253.
193. Goodell SE, et al. Herpes simplex virus proctitis in homosexual men. Clinical, sigmoidoscopic, and histopathological features. *N Engl J Med* 1983;308:868-871.
194. Goodman JL, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1996;334:209-215.
195. Grangeot-Keros L, Enders G. Evaluation of a new enzyme immunoassay based on recombinant rubella virus-like particles for detection of immunoglobulin M antibodies to rubella virus. *J Clin Microbiol* 1997;35:398-401.

196. Grant RM, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 2002;288:181-188.
197. Grant RM, et al. Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J Clin Microbiol* 2003;41:1586-1593.
198. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000;181:S402-S410.
199. Grayston IT, et al. Community- and hospital-acquired pneumonia associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically. *Arch Intern Med* 1989;149:169-173.
200. Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:841-874.
201. Gregg MB. Recent outbreaks of lymphocytic choriomeningitis in the United States of America. *Bull World Health Organ* 1975;52:549-554.
202. Gregory WW, Menegus MA. Practical protocol for cytomegalovirus isolation: Use of MRC-5 cell monolayers incubated for 2 weeks. *J Clin Microbiol* 1983;17:605-609.
203. Grossman MC, Silvers DN. The Tzanck smear: can dermatologists accurately interpret it? *J Am Acad Dermatol* 1992;27:403-405.
204. Gu Z, et al. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:4636-4641.
205. Guidry GG, et al. Respiratory syncytial virus infection among intubated adults in a university medical intensive care unit. *Chest* 1991;100:1377-1384.
206. Hackman RC, et al. Rapid diagnosis of cytomegaloviral pneumonia by tissue immunofluorescence with a murine monoclonal antibody. *J Infect Dis* 1985;151:325-329.
207. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344:1917-1928.
208. Hall CB, et al. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis* 2001;33:792-796.
209. Hall CJ, et al. Laboratory outbreak of Q fever acquired from sheep. *Lancet* 1982;1:1004-1006.
210. Halstead SB, Simasthien P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* 1970;42:276-292.
211. Hammerschlag MR, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992;14:178-182.
212. Hanna GI, et al. Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 2000;38:2115-2121.
213. Harder TC, et al. New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:4413-4419.
214. Harding HB. The epidemiology of sporadic urban ornithosis. *Am J Clin Pathol* 1962;3R:230-243.
215. Harrison SC. Principle of virus structure. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:53-85.
216. Hata M, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001;293:1840-1842.
217. Hattwick MAW, et al. Rocky Mountain spotted fever: Epidemiology of an increasing problem. *Ann Intern Med* 1976;84:732-739.
218. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.
219. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 2003;9:294-303.
220. Hechemy KE, et al. Detection of Rocky Mountain spotted fever antibodies by a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1980;12:144-150.
221. Hechemy KE, et al. Discrepancies in Weil-Felix and microimmunofluorescence test results for Rocky Mountain spotted fever. *J Clin Microbiol* 1979;9:292-293.
222. Heikkinen T, et al. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002;40:4337-4339.
223. Hermann C, et al. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2002;40:1603-1609.
224. Hien TT, de Jong M, Farrar J. Avian influenza-a challenge to global health care structures. *N Engl J Med* 2004;351:2363-2365.
225. Higgins JA, et al. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 1996;34:671-674.
226. Hill CE, et al. Assessment of Agreement between the AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test Versions 1.0 and 1.5. *J Clin Microbiol* 2004;42:286-289.
227. Hirata R, et al. Patients with hepatitis A with negative IgM-HA antibody at early stages. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1168-1169.
228. Hirsch MS, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113-128.
229. Hirsch MS, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2000;283:2417-2426.
230. Ho AS, et al. An outbreak of severe acute respiratory syndrome among hospital workers in a community hospital in Hong Kong. *Ann Intern Med* 2003;139:564-567.
231. Ho M, et al. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1975;293:1109-1112.
232. Ho SK, et al. Comparison of the CMV brite turbo assay and the digene hybrid capture CMV DNA (version 2.0) assay for quantitation of cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:3743-3745.
233. Hochberg FH, et al. Influenza type E-related encephalopathy. The 1971 outbreak of Reye syndrome in Chicago. *JAMA* 1975;231:817-821.
234. Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:799-840.
235. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2971-3036.
236. Holmes KV. Coronaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1187-1203.
237. Holodny M, et al. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in VACU-TAINER PPT plasma preparation tubes during overnight shipment. *J Clin Microbiol* 2000;38:323-326.
238. Holzl G, et al. Entirely Automated Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA in Plasma by Using the Ultrasensitive COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Test and RNA Purification on the MagNA Pure LC Instrument. *J Clin Microbiol* 2003;41:1248-1251.
239. Hondo R, et al. Enzymatic treatment of formalin-fixed and paraffin-embedded specimens for detection of antigens of herpes simplex, varicella-zoster and human cytomegaloviruses. *Jpn J Exp Med* 1982;52:17-25.
240. Horowitz HW, et al. Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Ann Intern Med* 1998;129:461-463.
241. Horwitz CA, et al. Clinical and laboratory evaluation of infants and children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood* 1981;57:933-938.
242. Horwitz CA, et al. Heterophil-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illnesses. Laboratory confirmation of 43 cases. *Am J Med* 1977;63:947-957.
243. Horwitz CA, et al. Spurious rapid infectious mononucleosis test results in non-infectious mononucleosis sera: the role of high-titer horse agglutinins. *Am J Clin Pathol* 1982;78:48-53.
244. Horwitz MA. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, ed. *Field Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2301-2126.
245. Houff SA, et al. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *N Engl J Med* 1979;300:603-604.
246. Howell CL, Miller MJ. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol* 1983;18:658-662.
247. Howell CL, et al. Elimination of toxicity and enhanced cytomegalovirus detection in cell cultures inoculated with semen from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1986;24:657-660.
248. Hsiung GD. *Diagnostic Virology Illustrated by Light and Electron Microscopy*. Ed. 3. New Haven, CT: Yale University Press, 1982.
249. Huang YT, et al. Application of mixed cell lines for the detection of viruses from clinical specimens. *Clin Microbiol Newslett* 2000;22:89-92.
250. Huang YT, et al. Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2002;40:366-371.
251. Huang YT, et al. Cryopreserved cell monolayers for rapid detection of herpes simplex virus and influenza virus. *J Clin Microbiol* 2002;40:4301-4303.
252. Huovinen P, et al. Pharyngitis in adults: the presence and coexistence of viruses and bacterial organisms. *Ann Intern Med* 1989;110:612-616.
253. Hyman CL, et al. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis* 1995;20:1174-1178.
254. Irani DN, Johnson RT. Diagnosis and prevention of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Annu Rev Med* 2003;54:305-319.
255. Iwarson S, et al. Hepatitis C. natural history of a unique infection. *Clin Infect Dis* 1995;20:1361-1370.
256. Jenny-Avital ER, Beatrice ST. Erroneously low or undetectable plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2001;32:1227-1230.
257. Jerome KR, et al. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2609-2611.
258. Jesionek K. Über einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines Feten. *Munch Med Wochenschr* 1904;51:1905-1907.
259. Jin L, et al. Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J Infect Dis* 1999;180:829-833.
260. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:120-131.
261. Johnson KM, et al. Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965;118:113-118.
262. Johnson RE, et al. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference test for *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men. *J Clin Microbiol* 2000;38:4382-4386.
263. Johnson RE, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections—2002. *MMWR Recomm Rep* 2002;51(RR-15):1-38.
264. Johnson RT, Gibbs CJ Jr. Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1998;339:1994-2004.
265. Johnson RT, et al. Measles encephalomyelitis—clinical and immunologic studies. *N Engl J Med* 1984;310:137-141.
266. Jones RB, Bateiger BE. *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Ed. 5. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:1989-2004.
267. Jones RB, et al. Effect of differences in specimen processing and passage technique on recovery of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1989;27:894-898.
268. Kahn J. Preventing hepatitis A and hepatitis B virus infections among men who have sex with men. *Clin Infect Dis* 2002;35:1382-1387.

269. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998;339:33-39.
270. Kalayoglu MV, et al. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 2002;288:2724-2731.
271. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1787-1833.
272. Kapikian AZ, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10:1075-1081.
273. Kaplan JE, Schonberger LB. The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:840-844.
274. Karim MR, et al. Detection of noroviruses in water-summary of an international workshop. *J Infect Dis* 2004;189:21-28.
275. Kass EM, et al. Rickettsialpox in a New York City hospital, 1980 to 1989. *N Engl J Med* 1994;331:1612-1617.
276. Katavolos P, et al. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1998;177:1422-1425.
277. Kauppinen M, Saikku P. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*. Prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;21:S244-S252.
278. Kimbrough RC, et al. Q fever endocarditis in the United States. *Ann Intern Med* 1979;91:400-402.
279. Kimura T, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV rDNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:1901-1906.
280. Kiviat NB, et al. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. II. Confirmation of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies. *JAMA* 1985;253:997-1000.
281. Klatt EC, et al. Evolving trends revealed by autopsies of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. 565 autopsies in adults with the acquired immunodeficiency syndrome, Los Angeles, Calif., 1992-1993. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:884-890.
282. Klempner MS, Shapiro DS. Crossing the species barrier-one small step to man, one giant leap to mankind. *N Engl J Med* 2004;350:1171-1172.
283. Klevjer-Anderson P, Anderson LW. Comparison of a new latex agglutination assay with indirect immunofluorescence to detect varicella-zoster antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:247-249.
284. Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
285. Koch WH, et al. Evaluation of United States-licensed human immunodeficiency virus immunoassays for detection of group M viral variants. *J Clin Microbiol* 2001;39:1017-1020.
286. Koff RS, et al. Viral hepatitis in a group of Boston hospitals. III. Importance of exposure to shellfish in a nonendemic period. *N Engl J Med* 1967;276:703-710.
287. Krajden M, et al. Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: comparison of analytical sensitivity, clinical performance, and workflow of the Cobas Amplicor HCV test version 2.0 and the HCV RNA transcription-mediated amplification qualitative assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:2903-2907.
288. Krause JR, et al. Morphological diagnosis of parvovirus B19 infection. A cytopathic effect easily recognized in air-dried, formalin-fixed bone marrow smears stained with hematoxylin-eosin or Wright-Giemsa. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:178-180.
289. Krause PJ, et al. Unreliability of Rotazyme ELISA test in neonates. *J Pediatr* 1983;103:259-262.
290. Krech T, et al. Comparison of buffalo green monkey cells and McCoy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* in a microtiter system. *J Clin Microbiol* 1989;27:2364-2365.
291. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715-2727.
292. Lafferty WE, et al. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med* 1987;316:1444-1449.
293. Lai KK, et al. Evaluation of real-time PCR versus PCR with liquid-phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2003;41:3133-3141.
294. Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1487-1531.
295. Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol* 2001;39:4506-4513.
296. Landry ML, Ferguson D. 2-Hour cytomegalovirus pp65 antigenemia assay for rapid quantitation of cytomegalovirus in blood samples. *J Clin Microbiol* 2000;38:427-428.
297. Landry ML, Ferguson D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 2000;38:708-711.
298. Landry ML, Ferguson D. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A + B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytosin immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 2003;41:3407-3409.
299. Landry ML, et al. Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by cytosin-enhanced direct immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1997;35:302-304.
300. Landry ML, et al. Use of plastic Vacutainer tubes for quantification of human immunodeficiency virus type 1 in blood specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:354-356.
301. Landry ML, et al. Comparison of the NucliSens Basic kit (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:5006-5010.
302. Landry ML, Hsiung GD. Primary isolation of viruses. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*. Ed. 3. Washington, DC: ASM Press, 2000:27-42.
303. Latorre CR, et al. Serial propagation of *Pneumocystis carinii* cell line cultures. *Appl Environ Microbiol* 1977;33:1204-1206.
304. Lazzarotto T, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:3540-3544.
305. Lazzarotto T, et al. Development of a new cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM. *J Clin Microbiol* 1998;36:3337-3341.
306. Lee FS, et al. Human granulocytic ehrlichiosis presenting as facial diplegia in a 42-year-old woman. *Clin Infect Dis* 2000;31:1288-1291.
307. Levin MJ, et al. Factors influencing quantitative isolation of varicella-zoster virus. *J Clin Microbiol* 1984;19:880-883.
308. Levine AJ. The origins of virology. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Field Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1-18.
309. Lew JF, et al. Six-year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:709-714.
310. Li H, et al. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003;41:187-191.
311. Liljeqvist JA, et al. Typing of clinical herpes simplex virus type 1 and type 2 isolates with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1999;37:2717-2718.
312. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:991-1041.
313. Livengood CH III, Wrenn JW. Evaluation of COBAS AMPLICOR (Roche): accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:2928-2932.
314. Louie JK, et al. Trends in causes of death among persons with acquired immunodeficiency syndrome in the era of highly active antiretroviral therapy, San Francisco, 1994-1998. *J Infect Dis* 2002;186:1023-1027.
315. Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2231-2264.
316. Maass M, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1793-1796.
317. Maass M, et al. Growth in serum-free medium improves isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:3050-3052.
318. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Clin Pathol* 1995;103:141-148.
319. MacDonald KL, et al. Toxic shock syndrome. A newly recognized complication of influenza and influenza like illness. *JAMA* 1987;257:1053-1058.
320. MacDonald NE, et al. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. *N Engl J Med* 1982;307:397-400.
321. Mack T. A different view of mallipox and vaccination. *N Engl J Med* 2003;348:460-463.
322. Maeda K, et al. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med* 1987;316:853-856.
323. Major EO. Human polyomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2175-2196.
324. Major ME, Rehmann B, Feinstone SM. Hepatitis C viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1127-1161.
325. Malan AK, et al. Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 2004;42:727-733.
326. Manayani DJ, et al. Comparison of molecular and conventional methods for typing of enteroviral isolates. *J Clin Microbiol* 2002;40:1069-1070.
327. Marchette NJ, et al. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis* 1973;128:23-30.
328. Marquez A, Hsiung GD. Influence of glutamine on multiplication and cytopathic effect of respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;124:95-99.
329. Marsano L, et al. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *J Infect Dis* 1990;161:454-461.
330. Marshall WF, et al. Rapid detection of polyomavirus BK by a shell vial cell culture assay. *J Clin Microbiol* 1990;28:1613-1615.
331. Martin WJ, Smith TF. Rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens by a monoclonal antibody method. *J Clin Microbiol* 1986;23:1006-1008.
332. Martinello RA, et al. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 2002;186:839-842.
333. Martino R, et al. Respiratory virus infections in adults with hematologic malignancies: a prospective study. *Clin Infect Dis* 2003;36:1-8.
334. Marty AM, et al. Ehrlichiosis mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. Case report and pathological correlation. *Hum Pathol* 1995;26:920-925.
335. Maruyama T, et al. The serology of chronic hepatitis B infection revisited. *J Clin Invest* 1993;91:2586-2595.
336. Massung RF, et al. Epidemic typhus meningitis in the southwestern United States. *Clin Infect Dis* 2001;32:979-982.

337. Massung RF, et al. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*. Rhode Island and Connecticut. Emerg Infect Dis 2002;8:467-472.
338. Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol 2003;41:717-722.
339. Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:875-893.
340. Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999;12:518-553.
341. Mazulli T, et al. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. J Clin Microbiol 1999;37:958-963.
342. McCarter Y S, Ratkiewicz IN. Comparison of virus culture and direct immunofluorescent staining of cytocentrifuged virus transport medium for detection of varicella-zoster virus in skin lesions. Am J Clin Pathol 1998;109:631-633.
343. McConnell CT Jr, et al. Radiographic appearance of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR strain) respiratory infections. CBPIS Study Group. Community-based Pneumonia Incidence Study. Radiology 1994;192:819-824.
344. McGarrity GJ, et al. Cell culture techniques. ASM 1985;51:170-183.
345. McIntosh K, McAdam AJ. Human metapneumovirus-an important new respiratory virus. N Engl J Med 2004;350:431-433.
346. Meyer H, et al. Outbreaks of disease suspected of being due to human monkeypox virus infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. J Clin Microbiol 2002;40:2919-2921.
347. Michalak TI, et al. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. J Clin Invest 1994;93:230-239.
348. Mitchell PD, et al. Immunologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. J Clin Microbiol 1996;34:724-727.
349. Mitchell PS, et al. Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1997;35:2873-2877.
350. Mitsuyasu R. Oncological complications of human immunodeficiency virus disease and hematologic consequences of their treatment. Clin Infect Dis 1999;29:35-43.
351. Mocarski ES Jr, Courcol R. Cytomegaloviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2629-2673.
352. Moncada J, et al. Volume effect on sensitivity of nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from females. J Clin Microbiol 2003;41:4842-4843.
353. Montalban GS, et al. Performance of three commercially available monoclonal reagents for confirmation of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. J Clin Microbiol 1994;32:1406-1407.
354. Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2803-2833.
355. Morishima C, et al. Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. J Clin Microbiol 2004;42:421-425.
356. Moriuchi H, et al. Community-acquired influenza C virus infection in children. J Pediatr 1991;118:235-238.
357. Moroney JF, et al. Detection of chlamydiosis in a shipment of pet birds, leading to recognition of an outbreak of clinically mild psittacosis in humans. Clin Infect Dis 1998;26:1425-1429.
358. Morrison RE, et al. Adult meningoencephalitis caused by herpesvirus hominis type 2. Am J Med 1974;56:540-544.
359. Morrow RA, Fredrich D. Inaccuracy of certain commercial enzyme immunoassays in diagnosing genital infections with herpes simplex virus types 1 or 2. Am J Clin Pathol 2003;120:839-844.
360. Morrow RA, et al. Performance of the Focus and Kalon enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to herpes simplex virus type 2 glycoprotein G in culture-documented cases of genital herpes. J Clin Microbiol 2003;41:5212-5214.
361. Morton HJ. A survey of commercially available tissue culture media. In Vitro 1970;6:89-108.
362. Moss B. *Poxviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2849-2883.
363. Motyl MR, et al. Diagnosis of herpesvirus infections: correlation of Tzanck preparation with viral isolation. Diagn Microbiol Infect Dis 1984;2:157-160.
364. Mufson MA, et al. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. J Infect Dis 1988;157:143-148.
365. Murphy DG, et al. Reproducibility and performance of the second-generation branched-DNA assay in routine quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol 1999;37:812-814.
366. Murphy FA. Virus taxonomy. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology. Ed. 3. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:15-57.
367. Murphy FA, et al. Morphologic comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: Basis for a new taxonomic group. J Virol 1969;4:535-541.
368. Mushahwar IK, et al. Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody: results of clinical evaluation. Am J Clin Pathol 1981;76:692-697.
369. Musso D, Raoult D. *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q-fever patients. J Clin Microbiol 1995;33:3129-3132.
370. Nahmias AJ, et al. Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. J Infect Dis 1982;145:829-836.
371. Naib ZM, et al. Cytological features of viral respiratory tract infections. Acta Cytol 1968;12:162-171.
372. Nash G. Necrotizing tracheobronchitis and bronchopneumonia consistent with herpetic infection. Hum Pathol 1972;3:283-291.
373. Nelson-Rees WA, et al. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. Science 1974;184:1093-1096.
374. Nichol ST. Bunyaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1603-1633.
375. Noah DL, et al. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. Ann Intern Med 1998;128:922-930.
376. Nolte FS, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. J Clin Microbiol 2003;41:1558-1564.
377. O'Connell RJ, et al. Performance of the OraQuick rapid antibody test for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in patients with various levels of exposure to highly active antiretroviral therapy. J Clin Microbiol 2003;41:2153-2155.
378. Oldach DW, et al. Rapid diagnosis of *Chlamydia psittaci* pneumonia. Clin Infect Dis 1993;17:338-343.
379. Oster CN, et al. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. N Engl J Med 1977;297:859-863.
380. Paddock CD, et al. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2001;33:1586-1594.
381. Paddock CD, et al. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. J Infect Dis 1999;179:1469-1476.
382. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:723-775.
383. Palmer S, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol 2003;41:4531-4536.
384. Pancholi P, et al. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis 1995;172:1007-1012.
385. Parida M, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. J Clin Microbiol 2004;42:257-263.
386. Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2675-2705.
387. Patel N, et al. Confirmation of low-titer, herpes simplex virus-positive specimen results by the enzyme-linked virus-inducible system (ELVIS) using PCR and repeat testing. J Clin Microbiol 1999;37:3986-3989.
388. Paya CV, et al. Rapid shell vial culture and tissue histology compared with serology for the rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in liver transplantation. Mayo Clin Proc 1989;64:670-675.
389. Paya CV, et al. Evaluation of number of shell vial cell culture per clinical specimen for rapid diagnosis of cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol 1988;26:198-200.
390. Payne FE, et al. Isolation of measles virus from cell culture of brain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. N Engl J Med 1969;281:585-589.
391. Peeling RW, et al. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. J Infect Dis 2000;181:Suppl 9.
392. Pellett PE, Dominguez G. Human herpesviruses 6A, 6B, and 7. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2769-2801.
393. Peltola V, et al. Influenza A and B virus infection in children. Clin Infect Dis 2003;36:299-305.
394. Peters CJ. Ebola virus. J Infect Dis 1999;179:S1-S288.
395. Peter CJ, Khan AS. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever. Clin Infect Dis 2002;34:1224-1231.
396. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. Ann Intern Med 2002;137:173-179.
397. Philip RN, et al. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. J Clin Microbiol 1976;3:51-61.
398. Podzorski RP. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. Arch Pathol Lab Med 2002;126:285-290.
399. Poggio GP, et al. Nested PCR for rapid detection of mumps virus in cerebrospinal fluid from patient with neurological diseases. J Clin Microbiol 2000;38:274-278.
400. Pomerantz RJ, Nunnari G. HIV and GB virus C-can two viruses be better than one? N Engl J Med 2004;350:963-965.
401. Prather SL, et al. The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. J Med Virol 1984;14:221-227.
402. Prince HE, et al. Utility of the focus technologies West Nile virus immunoglobulin in capture enzyme-linked immunosorbent assay for testing cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2004;42:12-15.
403. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:13363-13383.
404. Prusiner SB. Prions. In: Knipe DM, Howley PM, ed. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:3063-3087.
405. Prusiner SB. Neurodegenerative diseases and prions. N Engl J Med 2001;344:1516-1526.
406. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In: Knipe DM, Howley PM, ed. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:3051-3061.
407. Rabinowitz M, et al. A modified, solid phase radioimmunoassay for the differential diagnosis of acute and convalescent phases of hepatitis A infection. Am J Clin Pathol 1987;88:738-742.
408. Ramsey PC, et al. Herpes simplex virus pneumonia: clinical, virologic, and pathologic features in 20 patients. Ann Intern Med 1982;97:813-820.
409. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1997;10:694-719.

410. Raoult D, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine* (Baltimore) 2000;79:109-123.
411. Rea TD, et al. A systematic study of Epstein-Barr virus serologic assays following acute infection. *Am J Clin Pathol* 2002;117:156-161.
412. Reed KD, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med* 2004;350:342-350.
413. Reid AH, et al. 1918 influenza pandemic caused by highly conserved viruses with two receptor-binding variants. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1249-1253.
414. Reina J, et al. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A + B) for simultaneous and differential detection of influenza A and B virus antigens from respiratory sample. *J Clin Microbiol* 2002;40:3515-3517.
415. Reina J, et al. Evaluation of a direct immunofluorescence cytospin assay for the detection of herpes simplex virus in clinical sample. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:851-854.
416. Remy V, et al. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *Clin Infect Dis* 2003;37:846-848.
417. Rich JD, et al. Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series. *Ann Intern Med* 1999;130:37-39.
418. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clinical Virology*. Ed. 2. Washington, DC: ASM Press, 2002.
419. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2575-2627.
420. Riganon AS, et al. Use of monoclonal antibodies to identify serotypes of enterovirus isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:1877-1881.
421. Rikihisa Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:286-308.
422. Rose JW, et al. Atypical herpes simplex encephalitis: clinical, virologic, and neuropathologic evaluation. *Neurology* 1992;42:1809-1812.
423. Rota PA, et al. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* 2002;8:902-908.
424. Roy P. Orbiviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1835-1869.
425. Ruutu P, et al. Cytomegalovirus is frequently isolated in bronchoalveolar lavage fluid of bone marrow transplant recipients without pneumonia. *Ann Intern Med* 1990;112:913-916.
426. Sabet SF, et al. Enhancement of *Chlamydia trachomatis* infectious progeny by cultivation in HeLa 229 cells treated with DEAE-Dextran and cycloheximide. *J Clin Microbiol* 1984;20:217-222.
427. Sabin AB. Studies of B virus. I. the immunological identity of a virus isolated from a human case of ascending myelitis associated with visceral necrosis. *Br J Exp Pathol* 1934;15:248-268.
428. Sabin AB. The significance of viruses recovered from the intestinal tract of healthy infants and children. *Ann NY Acad Sci* 1956;66:226-230.
429. Sanchez A, Khan AS, Zaki SR, et al. *Filoviridae*: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1279-1304.
430. Sanders C, et al. Cytospin-enhanced direct immunofluorescence assay versus cell culture for detection of herpes simplex virus in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:111-113.
431. Sankar-Mistry P, et al. Effect of polybrene on isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;22:671-673.
432. Schachter J. Chlamydial infections. *N Engl J Med* 1978;298:428-434.
433. Schachter J, et al. Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis*. *JAMA* 1986;255:3374-3377.
434. Schafer P, et al. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. *J Clin Microbiol* 2000;38:3249-3253.
435. Schaffner W, et al. The clinical spectrum of endemic psittacosis. *Arch Intern Med* 1967;119:433-443.
436. Schirm J, et al. Rapid detection of varicella-zoster virus in clinical specimens using monoclonal antibodies on shell vials and smears. *J Med Virol* 1989;28:1-6.
437. Schlesinger S, Schlesinger MJ. *Togaviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:895-916.
438. Schlesinger Y, et al. Expanded spectrum of herpes simplex encephalitis in childhood. *J Pediatr* 1995;126:234-241.
439. Schmaljohn CS, Hooper JW. *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin, 2001:1581-1602.
440. Schmidt NJ, et al. Application of immunoperoxidase staining to more rapid detection and identification of rubella virus isolates. *J Clin Microbiol* 1981;13:627-630.
441. Schmidt NJ, et al. *Clostridium difficile* toxin as a confounding factor in enterovirus isolation. *J Clin Microbiol* 1980;12:796-798.
442. Schriefer ME, et al. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol* 1994;32:949-954.
443. Sejvar JJ, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* 2003;290:511-515.
444. Serwadda D, et al. Human immunodeficiency virus acquisition associated with genital ulcer disease and herpes simplex virus type 2 infection: a nested case-control study in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 2003;188:1492-1497.
445. Sexton DJ, et al. Dual infection with *Ehrlichia chaffeensis* and a spotted fever group rickettsia: a case report. *Emerg Infect Dis* 1998;4:311-316.
446. Shafer MA, et al. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol* 2003;41:4395-4399.
447. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:247-277.
448. Shah KV. Papovaviruses. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*. Ed. 3. Washington, DC: ASM Press, 2000:374-383.
449. Shahrabadi MS, Lee PW. Calcium requirement for syncytium formation in HEp-2 cells by respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 1988;26:139-141.
450. Shenk TE. *Adenoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2265-2300.
451. Simko JP, et al. Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex virus (HSV) documented by detection of HSV DNA. *Clin Infect Dis* 2002;35:414-419.
452. Smalling TW, et al. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002;40:2317-2322.
453. Smith TF. Clinical uses of the diagnostic virology laboratory. *Med Clin North Am* 1983;67:935-951.
454. Smith TF. Diagnostic virology in the community hospital. Extent and options. *Postgrad Med* 1984;75:215-223.
455. Smith TF. Specimen requirement: selection, collection, transport, and processing. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*. Ed. 3. Washington, DC: ASM Press, 2000:11-26.
456. Smith TF, et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by cell cultures and serology. *Lab Med* 1982;13:92-100.
457. Snyderman DR, et al. Use of IgM-hepatitis A antibody testing. Investigating a common-source, food borne outbreak. *JAMA* 1981;245:827-830.
458. Sofi IM, et al. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3835-3839.
459. Solomon AR, et al. A comparison of the Tzanck smear and viral isolation in varicella and herpes zoster. *Arch Dermatol* 1986;122:282-285.
460. Solomon D, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-2119.
461. Sorvillo FJ, et al. A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:269-273.
462. Specter S, Lancz GJ. *Clinical Virology Manual*. Ed. 3. Washington, DC: ASM Press, 2000.
463. Spelman DW. Q fever: a study of 111 consecutive cases. *Med J Aust* 1982;1:547-553.
464. St George K, et al. A multisite trial comparing two cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia test kits, biotest CMV brite and Bartels/Argene CMV antigenemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:1430-1433.
465. Stamm WE, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983;17:666-668.
466. Standaert SM, et al. Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. *N Engl J Med* 1995;333:420-425.
467. Steinberg SP, Gershon AA. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus by using a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1991;29:1527-1529.
468. Steininger C, et al. Acute encephalopathy associated with influenza A virus infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:567-574.
469. Stephensen CB, et al. Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *J Med Virol* 1992;3:27-31.
470. Strano AJ. Light microscopy of selected viral diseases (morphology of viral inclusion bodies). *Pathol Annu* 1976;11:53-75.
471. Strickler JG, et al. Comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for detection of cytomegalovirus and herpes simplex virus. *Hum Pathol* 1990;21:443-448.
472. Supran EM, et al. Report of a joint DMRQC/Organon field trial to detect hepatitis A IgM by ELISA. *J Clin Pathol* 1983;36:1111-1115.
473. Sutherland S, et al. Donated organ as a source of cytomegalovirus in orthotopic liver transplantation. *J Med Virol* 1992;37:170-173.
474. Swanson P, et al. Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O. LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA Version 3.0. *J Clin Microbiol* 2001;39:862-870.
475. Swierkosz EM. Antiviral drug susceptibility testing. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*. Ed. 3. Washington, DC: ASM Press, 2000:154-168.
476. Tam MR, et al. Culture-independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1984;310:1146-1150.
477. Tedder DG, et al. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocytic meningitis. *Ann Intern Med* 1994;121:334-338.
478. Thin RNT, et al. Value of Papanicolaou-stained smears in the diagnosis of trichomoniasis, candidiasis, and cervical herpes simplex virus infection in women. *Br J Vener Dis* 1975;51:116-118.
479. Thomas DL, et al. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. The seroprevalence of and risk factors for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-1712.
480. Thomas EE, et al. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. *Am J Clin Pathol* 1994;101:742-746.
481. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004;350:1328-1337.
482. Tracy S, et al. Molecular approaches to enteroviral diagnosis in idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1688-1694.

483. Treuhaft MW, et al. Practical recommendations for the detection of pediatric respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol* 1985;22:270-273.
484. Tyrrell DAJ, et al. Clones of cells from a human embryonic lung: their growth and susceptibility to respiratory viruses. *Arch Virol* 1979;61:69-85.
485. Uhnöo I, Svensson L. Clinical and epidemiological features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus subgroups 1 and 2. *J Clin Microbiol* 1986;23:551-555.
486. Unver A, et al. Western blot analysis of sera reactive to human monocytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents. *J Clin Microbiol* 2001;39:3982-3986.
487. Valentine-Thon E, et al. European proficiency testing program for molecular detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2001;39:4407-4412.
488. Van Der PB, et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2001;39:1008-1016.
489. Van Der PB, et al. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG Test for *Neisseria gonorrhoeae* by retesting specimens with equivocal results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3092-3098.
490. van Elden LJ, et al. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:196-200.
491. van Regenmortel MHV, Mahy BMJ. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg Infect Dis* 2004;10:8-13.
492. Versalovic J. Diagnostic molecular microbiology: nucleic acid probes and microbes. *Pathol Case Rev* 2003;8:137-144.
493. Vogel J, Shelokov A. Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Science* 1957;126:358-359.
494. Wadowsky RM, et al. Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:5245-5249.
495. Wadsworth JD, et al. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 2003;60:241-254.
496. Waid A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis* 2002;35:2-82.
497. Wald A, et al. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis* 2003;188:1345-1351.
498. Wald A, et al. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *N Engl J Med* 1995;333:770-775.
499. Wald A, et al. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 2000;342:844-850.
500. Walker DH. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:227-240.
501. Walker DH. Rocky Mountain Spotted Fever: A Seasonal Alert. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1111-1117.
502. Walker DH. Diagnosing human ehrlichioses: current status and recommendations. Despite shortcomings, immunofluorescence testing remains the best choice, with PCR and culture methods being valuable adjuncts. Task Force on Consensus Approach for Ehrlichiosis. *ASM* 2001;66:287-291.
503. Walker DH. Ricketts creates rickettsiology, the study of vector-borne obligately intracellular bacteria. *J Infect Dis* 2004;189:938-955.
504. Walker DH, et al. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *South Med J* 1980;73:1443-1447.
505. Walker DH, Cain BG. A maltod for specific diagnosis of Rocky Mountain spotted fever on fixed, paraffin-embedded tissue by immunofluorescence. *J Infect Dis* 1978; 137:206-209.
506. Ward C. Acquired valvular heart-disease in patients who keep pet birds. *Lancet* 1974;2:734-736.
507. Washburne JF, et al. Summertime respiratory syncytial virus infection: epidemiology and clinical manifestations. *South Med J* 1992;85:579-583.
508. Weinberg A, et al. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38:768-772.
509. Weingarten S, et al. Influenza surveillance in an acute-care hospital. *Arch Intern Med* 1988;148:1113-1116.
510. Weller TH. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis* 1970;122:532-539.
511. Weller TH. Varicella and herpes zoster. In: Lennette EH, Schmidt NJ, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. Ed. 5. Washington, DC: American Public Health Association, 1979:375-398.
512. Wells DL, et al. Swine influenza virus infections: transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission. *JAMA* 1991;265:478-481.
513. Wells DL, et al. Herpesvirus simiae contamination of primary rhesus monkey kidney cell cultures. CDC recommendations to minimize risks to laboratory personnel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:333-336.
514. Westenfeld FW, Winn WC Jr. Recovery of varicella-zoster virus in diploid fibroblast and monkey kidney cell cultures. *Am J Clin Pathol* 1994;102:733-735.
515. Whitley DM, et al. Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:4357-4361.
516. Whitley DM, et al. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by LightCycler reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4418-4422.
517. Whitley R, et al. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* 1991;324:450-454.
518. Whitley RJ. Herpes simplex viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2461-2509.
519. Whitley RJ, et al. Diseases that mimic herpes simplex encephalitis: diagnosis, presentation, and outcome. NIAD Collaborative Antiviral Study Group. *JAMA* 1989; 262:234-239.
520. Whitley RJ, Hilliard JK. Cercopithecine herpesvirus (B virus). In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Ed. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2835-2848.
521. Williams CF, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med* 2004;350:981-990.
522. Williams SG, et al. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 1992;30:1758-1762.
523. Wong KH, et al. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* 1992;30:1625-1630.
524. Wong KH, et al. Utility of complement fixation and microimmunofluorescence assays for detecting serologic responses in patients with clinically diagnosed psittacosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2417-2421.
525. Woodman DR, et al. Biological properties of *Rickettsia prowazekii* strains isolated from flying squirrels. *Infect Immun* 1977;16:853-860.
526. Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:382-404.
527. Wright TC Jr, et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002;287:2120-2129.
528. Wylie JL, et al. Comparative evaluation of Chlamydiazyme, PACE 2, and AMP-CT assays for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:3488-3491.
529. Yao JD, et al. Multicenter Evaluation of the VERSANT Hepatitis B Virus DNA 3.0 Assay. *J Clin Microbiol* 2004;42:800-806.
530. Yevich SJ, et al. Seroepidemiology of infections due to spotted fever group rickettsiae and *Ehrlichia* species in military personnel exposed in areas of the United States where such infections are endemic. *J Infect Dis* 1995;171:1266-1273.
531. Yoder BL, et al. Microtest procedure for isolation of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1981;13:1036-1039.
532. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004;350:586-597.
533. Zaki SR, et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995;146:552-579.
534. Zaki SR, et al. Retrospective diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. 1978-1993: implications for emerging infectious diseases. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:134-139.
535. Zanghellini F, et al. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999;180:702-707.
536. Zerbini M, et al. Comparative evaluation of virological and serological methods in prenatal diagnosis of parvovirus B19 fetal hydrops. *J Clin Microbiol* 1996;34:603-608.
537. Zhai J, et al. Real-time polymerase chain reaction for detecting SARS coronavirus, Beijing, 2003. *Emerg Infect Dis* 2004;10:300-303.
538. Zolopa AR, et al. HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 1999;131:813-821.
539. zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 1986;2:489-491.

Ectoparásitos y otros invertebrados en el laboratorio clínico: una guía breve

Con contribuciones de Fred Westenfeld y Fred Patterson

Envío de especímenes al laboratorio

Arachnida: garrapatas, ácaros y arañas

Ixodidae

Biología de las garrapatas duras
Relación con las enfermedades
Distribución geográfica
Identificación
Resumen de identificación

Especies de *Ornithodoros*

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Ácaros

Sarcoptes scabiei (sarna)

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Demodex folliculorum (foliculos pilosos) y *Demodex brevis* (glándulas sebáceas)

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Arañas

Loxosceles reclusa

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Latrodectus mactans

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Tegenaria agrestis

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Insecta: moscas, chinches, pulgas y piojos

Larvas de moscas productoras de miasis

Dermatobia hominis (larva de la mosca humana)

Relación con las enfermedades
Identificación
Distribución geográfica

Cordylobia anthropophaga (mosca Tumbu)

Relación con las enfermedades
Identificación

Distribución geográfica
 Otras moscas
 Mosquitos
 Relación con las enfermedades
 Identificación
 Distribución geográfica
 Chinchés
Cimex lectularius
 Vinchucas: especies de *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*

Pulgas
 Relación con las enfermedades
 Identificación
 Distribución geográfica
 Piojos
Pediculus humanus
Pediculus capitis
Phthirus pubis

Los **ectoparásitos** son organismos que viven dentro o sobre la piel de un huésped, del que obtienen su alimento. Por consiguiente, la relación es parasitaria o posiblemente simbiótica. La intimidad del contacto varía desde el tiempo requerido para alimentarse una vez con sangre hasta días, semanas o incluso meses de asociación. Los organismos que entran en contacto con un huésped en forma casual (p. ej. moscas comunes) o sin obtener beneficios (p. ej., escorpiones, abejas y arañas) no son, en sentido estricto, ectoparásitos.⁶⁴

Los **artrópodos** son invertebrados con patas articuladas (de ahí proviene su nombre) y un dermoesqueleto quitinoso. Han sido reconocidos desde hace mucho como causantes directos o indirectos de enfermedades humanas y pueden provocar daño al huésped humano por sí mismos. En forma alternativa, pueden actuar como vectores para la transmisión de agentes infecciosos y la entrada del agente en el huésped humano. En algunos casos, el artrópodo actúa sólo como portador y deposita el agente infeccioso en el ambiente inmediato, desde donde puede entrar en contacto con la posible víctima. Un ejemplo de ello es la transmisión de patógenos bacterianos de un sitio a otro sobre el cuerpo de moscas o cucarachas.^{2,45} Una relación mucho más íntima tiene lugar cuando el artrópodo es el mediador directo de daño celular o cuando un insecto picador transmite un agente infeccioso a los tejidos de la víctima. La mayoría de los insectos picadores ingieren el agente infeccioso cuando se alimentan de sangre de un ser humano infectado o de otro mamífero infectado, denominado **reservorio de infección**. Cuando un insecto pica a un animal o a un ser humano, a menudo inyecta secreciones salivales que contienen enzimas y anticoagulantes diseñados para permitir la ingestión de sangre. Si el agente infeccioso ha pasado del intestino del insecto a la hemolinfa y después a las glándulas salivales, la infección se transmite en las secreciones salivales en el momento de la picadura.⁴³ Si está en el intestino, con presencia de material infeccioso en la saliva o no, puede excretarse con las heces cuando el artrópodo defeca después de la ingestión de sangre. La entrada del agente desde las heces en el sitio de la picadura se facilita cuando el huésped se rasca el sitio irritado.

La lista de artrópodos importantes desde el punto de vista médico continúa aumentando, así como la de enfermedades que pueden causar. Al mismo tiempo, los laboratorios clínicos están recibiendo cada vez más muestras para su identificación. Muchos artrópodos que son muy importantes en las enfermedades infecciosas humanas se ven rara vez o nunca en los laboratorios de microbiología clínicos, porque no se encontraron

los insectos, se exterminaron o no fueron capturados para su examen. Se ven otros insectos importantes, como los escorpiones, en distribuciones geográficas localizadas. Por otro lado, los microbiólogos clínicos pueden ser llamados para identificar insectos que causaron alarma por su presencia, aunque no hayan hecho daño.

Esta sección está destinada a ayudar al lector a conocer la importancia médica y la identificación de laboratorio de algunos artrópodos que pueden encontrarse en el laboratorio clínico. En el cuadro A-1 se presenta un esquema de clasificación abreviado y en el recuadro A-1 se enumeran definiciones seleccionadas y la taxonomía relacionada de ectoparásitos de importancia para los seres humanos. El lector puede consultar varios excelentes libros de texto de referencia para obtener información más detallada.^{17-20, 40,49,54,56}

Envío de especímenes al laboratorio

Debido a la diversidad de especímenes que pueden encontrarse en entomología médica, es difícil recomendar un solo método para su envío. En general, el etanol al 70% funcionará bien como conservante para la mayoría de ellos y al mismo tiempo impide el escape o la autoinfección. Debe agregarse a la muestra en un recipiente limpio, de modo que el artrópodo quede sumergido por completo. Los especímenes pueden oscurecerse después de un tiempo prolongado de preservación, lo que anula la utilidad de las diferencias de color para la identificación después de lapsos largos de fijación. No hemos observado ninguna degradación del color en muestras conservadas en etanol al 70% durante períodos de días, que es el tiempo habitual que transcurre entre la obtención y el procesamiento.

La formalina y la solución fisiológica estéril pueden ser satisfactorias, pero suelen tener desventajas respecto del etanol. Los insectos voladores deben matarse usando gases, como el cloroformo y después conservarse como preparado seco.¹⁸ García ha presentado una receta para el medio de Berelese, que esta autora señala como buena solución para usar con la mayoría de las muestras.¹⁸ Para el examen de larvas de mosca, se ha sugerido matarlas con agua caliente.¹⁷ Si existen dudas, se debe consultar con la institución que examinará la muestra para obtener recomendaciones específicas.

El método preferido para la extracción de garrapatas es asirlas con pinzas finas tan cerca del sitio de penetración como sea posible, sin pellizcar la piel. La presión externa continua, mien-

Cuadro A-1 Clasificación de los artrópodos de importancia médica

CLASE	ORDEN O SUBCLASE	EJEMPLOS	LESIÓN DIRECTA O INFECCIONES QUE TRANSMITEN
Diplopoda		Milpiés	Directa
Chilopoda		Chinches	Directa
Hexapoda (Insecta)	Hemiptera	Ciempíes Chinches reduvídeas	Directa
Hexapoda (Insecta)	Siphonaptera	Pulgas	Directa
Hexapoda (Insecta)	Anoplura	Piojos	Directa; tifus; fiebre de las trincheras; fiebre recurrente
Hexapoda (Insecta)	Dictyoptera	Cucarachas	Problemas sanitarios; reacciones alérgicas
Hexapoda (Insecta)	Hymenoptera	Hormigas, avispas, abejas	Directa
Hexapoda (Insecta)	Coleoptera	Escarabajos	Directa
Hexapoda (Insecta)	Diptera	Moscas, mosquitos, moscas enanas	Directa; arbovirus; infecciones parasitarias; <i>Bartonella</i> ; <i>Francisella</i>
Hexapoda (Insecta)	Lepidoptera	Polillas, mariposas, orugas	Directa
Pentastomida		Gusanos lengua	Directa
Arachnida	Subclase: Scorpiones	Escorpiones	Directa
Arachnida	Subclase: Araneae	Arañas	Directa
Arachnida	Subclase: Acari	Garrapatas, ácaros, niguas	Directo; <i>Borrelia</i> ; arbovirus; <i>Ehrlichia</i> ; <i>Anaplasma</i> , <i>Rickettsia</i> ; <i>Francisella</i>

tras se eleva la garrapata hacia arriba y adelante, casi siempre extrae la garrapata intacta.³⁶ El capitulum de las garrapatas duras es un rasgo identificador importante. Las muestras deterioradas debido a un desprendimiento inadecuado son más difíciles de identificar.

Los materiales y las técnicas requeridas para el examen de artrópodos son simples. Pueden obtenerse mediante aumento con una lupa o con un estereomicroscopio, que es lo óptimo. Los aumentos bajos a moderados también pueden lograrse con un objetivo de bajo aumento (p. ej. 2× o 4×) y un microscopio compuesto. Una buena fuente de luz es esencial para la observación. Las luces de fibra óptica proporcionan una iluminación excelente sin calentar ni secar en exceso la muestra. Las lámparas con brazos flexibles permiten un control máximo del ángulo de iluminación. La muestra puede manipularse mejor con un par de agujas de disección.

En el caso excepcional que se considere cultivar el posible agente patógeno a partir del vector, el insecto no debe estar fijado. Si la muestra se ha fijado antes de enviarla al laboratorio, los métodos moleculares modernos permiten la identificación específica de agentes infecciosos por amplificación de ácidos nucleicos.

Arachnida: garrapatas, ácaros y arañas

Las garrapatas son artrópodos del suborden Ixodida, que se divide en tres familias, dos de las cuales, Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas), son vectores de enfermedades humanas.^{36,51} En la familia Ixodidae la porción anterior del cuerpo está esclerosada e incluye un escudo ("escudo dorsal") y un capitulum orientado hacia delante ("cabeza"), de donde proviene el término, "garrapata dura".⁵¹ Los géneros que se envían con mayor frecuencia a los laboratorios de microbiología son *Ixodes*, *Dermacentor* y *Amblyomma*. Los miembros de la familia *Argasidae* tienen una superficie externa coriácea, sin escudo y el aparato bucal se ubica ventralmente.⁵¹ Durante

las últimas décadas se han reconocido cada vez más garrapatas duras como vectores importantes de una amplia variedad de enfermedades humanas, cuya diversidad es mayor que para cualquier otro grupo de artrópodos.⁵¹ En los Estados Unidos las garrapatas duras son más prevalentes que las blandas y son vectores más importantes de patógenos humanos. La identificación de una garrapata enviada al laboratorio debe incluir la descripción de la especie, el estadio del ciclo vital, el sexo en el caso de los adultos, el grado de distensión del cuerpo (por ingurgitación de sangre) y el estado del aparato bucal.

Ixodidae

BIOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS DURAS

Las garrapatas duras tienen un ciclo evolutivo que consta de cuatro estadios (instares): huevo, larva, ninfa y el adulto sexualmente dimórfico. Las larvas de garrapata tienen seis patas, lo que constituye un rasgo de identificación importante (lámina en color A-1A), en tanto que las ninfas y los adultos tienen ocho. Los estadios inmaduros carecen de poro genital, pero por lo demás parecen hembras adultas. Los dos tienen un escudo que cubre de un tercio a la mitad del dorso y permite la succión abundante de sangre y líquidos tisulares (lámina en color A-1B). La alimentación es necesaria para la fecundidad de las hembras y su peso corporal puede aumentar hasta 100 veces mientras se alimentan.^{36,51} Los machos tienen un escudo que cubre casi todo el dorso (lámina en color A-1B), así como placas ventrales esclerosadas que limitan la ingurgitación en la mayoría de las especies, si es que la garrapata macho se alimenta.

Los vectores importantes de enfermedades humanas en los Estados Unidos son las garrapatas de tres huéspedes, lo que significa que cada instar se alimenta una vez en el huésped, después de lo cual la garrapata abandona al huésped para hacer su muda al siguiente instar en un microclima conveniente, como hojas en descomposición o un nido.⁵¹ El proceso continúa hasta que tiene lugar el apareamiento de los adultos. Éste puede ocurrir en el huésped o fuera de él, según la especie.

Recuadro A-1 Ectoparásitos: definiciones y taxonomía

Arthropoda: Los organismos de este filo tienen un exoesqueleto duro, articulado y pares de patas simétricas, articuladas. De las cinco clases de artrópodos, sólo *Arachnida* e *Insecta* actúan como vectores de enfermedades humanas.

Clase *Arachnida* (garrapatas, ácaros y arañas): clase de artrópodos caracterizados por la ausencia de alas, la presencia de cuatro pares de patas y la fusión de la cabeza y el tórax en un cefalotórax.

Las garrapatas son más grandes que los ácaros, tienen un cuerpo coriáceo que carece de pelos o está cubierto de vellos cortos, un hipostoma expuesto y un par de espiráculos cerca del coxal del cuarto par de patas. Se dividen en argásidos o garrapatas blandas (las especies de *Ornithodoros* son de importancia humana), y los ixodídeos, o garrapatas duras, que incluyen los géneros *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Ixodes*, que son responsables de la transmisión de los agentes de varias enfermedades causadas por rickettsias, virus, bacterias y espiroquetas.

Los ácaros son de menor tamaño que las garrapatas, carecen de cubierta coriácea y tienen un hipostoma que puede estar desarmado. Para los seres humanos son importantes los ácaros trombicúlidos, como las niguas, que causan ronchas dolorosas y los ácaros de la sarna, de la familia *Sarcoptidae*, que incluye *S. scabiei*, el agente de la sarna, y *Demodex folliculorum*, que infesta los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.

Las arañas son no segmentadas, tienen un abdomen vellosa y cuatro pares de patas unidas al cefalotórax. También tienen un par de mandíbulas venenosas a través de las que fluye el veneno proveniente de un par de glándulas ubicadas en el cefalotórax. Las arañas parda, viuda negra y vagabunda son las que causan con mayor frecuencia picaduras dolorosas y tóxicas en los seres humanos.

Clase *Insecta* (moscas, mosquitos, chinches, pulgas y piojos): clase de artrópodos que incluye organismos con cuerpo dividido en tres segmentos –cabeza, tórax y abdomen– y que tienen tres pares de patas. El orden *Hemiptera* incluye chinches aladas o sin alas y el orden *Phthiraptera* incluye a los piojos, que tienen un aparato bucal adaptado para perforar y chupar; el orden *Diptera* (dos alas) incluye moscas, jejenes y mosquitos, y el orden *Siphonaptera* incluye las pulgas, que carecen de alas y tienen un aparato bucal adaptado para chupar sangre.

Las moscas son insectos con dos alas que actúan como vectores para la transmisión de diversos agentes de enfermedades humanas. Comprende *Simulium* o mosca negra (oncocercosis), *Chrysops* o mosca del ciervo (*Loa loa*), y *Glossina* o mosca tsetse (tripanosomiasis). Los mosquitos transmiten una variedad de enfermedades producidas por virus, protozoos y helmintos, las más notables de las cuales son el paludismo y la filariasis. Los seres humanos también pueden infestarse con las formas larvales de moscas, enfermedad conocida como miasis. Los flebótomos (*Phlebotomus*) transmiten la leishmaniasis.

Las chinches picadoras y succionadoras de sangre de importancia en las enfermedades humanas son *Cimex lectularius*, la chinche común, y las chinches reduvídeas o vinchucas, de la familia *Reduviidae*, que transmiten el agente causal de la tripanosomiasis de América del Sur (enfermedad de Chagas).

Las pulgas son insectos pequeños, de color castaño, sin alas, lateralmente comprimidos, que succionan sangre, cuya característica más notable es que actúan como vectores para la transmisión de los agentes de la peste bubónica y el tifus murino. También están involucradas en la transmisión de enfermedades parasitarias, como la tenia del perro, *Dipylidium caninum*, y la tenia de la rata, *Hymenolepis diminuta*.

Los piojos son insectos aplanados dorsoventralmente, sin alas, que incluyen tres especies de importancia para los seres humanos: *Pediculus humanus* var. *capitis* (piojo de la cabeza), *Pediculus humanus* var. *corporis* (piojo del cuerpo) y *Phthirus pubis* (piojo cangrejo). El orden incluye piojos masticadores y chupadores; sin embargo, sólo los últimos, la suborden *Anoplura*, son ectoparásitos para los seres humanos. Los piojos son vectores importantes del tifus epidémico y de la fiebre recurrente.

Después del apareamiento, las hembras buscan un ambiente conveniente, ponen cientos a miles de huevos según la especie^{36,51} y luego mueren. La duración de un ciclo vital, en promedio 1 a 2 años, varía con la presencia o la ausencia de condiciones medioambientales convenientes y la disponibilidad de un huésped adecuado.⁵¹ En condiciones adversas, las garrapatas pueden entrar en períodos largos de diapausa, una fase latente en la que secretan una saliva higroscópica que les permite absorber la humedad, lo que aumenta la supervivencia hasta que mejoran las condiciones de búsqueda de huéspedes.

La mayoría de las garrapatas duras viven en madrigueras o nidos, y su vida transcurre en un ambiente cerrado, alimentándose sobre un huésped fácilmente disponible. El contacto de los seres humanos con estas especies es raro o inexistente.⁵¹ *Ixodes spinipalpus* y las ratas de la madera perpetúan un ciclo enzoótico de infección por *B. burgdorferi* en Colorado.³¹ La ausencia de infección humana puede atribuirse a la falta de contacto entre *I. spinipalpus* y los seres humanos.

Sólo en algunos pocos casos la especificidad de huésped coloca las garrapatas infectadas en un ambiente propicio para el contacto con seres humanos, lo que las hace más competentes como vectores de la enfermedad. El huésped preferido de *I. scapularis* en los estadios de vida tempranos es *Peromyscus leucopus*, el ratón de patas blancas, conocido como reservorio de *Babesia microti*, así como de *Borrelia burgdorferi* en esas localidades. Aunque el reservorio de *Anaplasma (Ehrlichia)*

phagocytophila no se conoce con certeza, *I. scapularis* es su vector demostrado. El huésped preferido de las garrapatas adultas es el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), un animal de amplia distribución que se está extendiendo para incluir zonas densamente pobladas. Debido a su capacidad de albergar y transmitir patógenos múltiples y a su predisposición a alimentarse en los seres humanos, la capacidad de actuar como vector que tiene *I. scapularis* es muy grande. En cambio, *I. scapularis* en el sudeste e *I. pacificus* en el noroeste de los Estados Unidos son menos idóneos como vectores de la borreliosis de Lyme. La selectividad de huésped parece ser la razón de ello. Los huéspedes preferidos en ambos casos son lagartos, en los que las espiroquetas se multiplican mal. Este fenómeno biológico podría ser responsable de que haya pocos casos informados en el oeste y la ausencia virtual de casos informados en el sudeste.^{31,55}

Las garrapatas procuran su huésped al acecho, en una suerte de emboscada pasiva en la cual la garrapata trepa al césped y a las hierbas a la espera de aferrarse a un huésped de paso.⁵¹ Por otro lado, unas pocas especies buscan su presa en forma activa. *Amblyomma americanum* es la única especie del grupo de garrapatas que se trata aquí que utiliza esa forma de búsqueda.³⁶ Las especies que suelen buscar huéspedes humanos parecen tener preferencias anatómicas para su unión.¹⁴ *Dermacentor variabilis* prefiere la cabeza y el cuello, en tanto que es más probable que *Amblyomma americanum* se prenda a las nal-

gas, la ingle o las patas. *Ixodes scapularis* es ubicua y se prende a todas las partes del cuerpo sin ninguna preferencia por un sitio particular.

La distribución geográfica de las garrapatas parece estar en expansión. La explosión de la población del ciervo de cola blanca en las zonas de población humana densa puede ser una razón. Otra explicación podría ser que los estilos de vida actuales en los Estados Unidos promueven las actividades al aire libre y ponen a las personas en el camino de las garrapatas, que siempre han estado allí.

Dentro del ciclo vital, una garrapata puede adquirir un agente patógeno de una de dos maneras: 1) entre estadios (horizontal; es decir, de la larva a la ninfa, de la ninfa al adulto) o 2) transovárica (vertical; de la madre al huevo).⁵¹ Las larvas de *Ixodes scapularis* son incapaces de transmitir la enfermedad de Lyme porque *B. burgdorferi* no se transmite verticalmente, sino que se adquiere de un huésped reservorio.^{36,51,54} El huésped preferido para las larvas y las ninfas de *I. scapularis* es el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucosis*), uno de los reservorios principales de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti* y *A. phagocytophilum* en las zonas endémicas. Se ha demostrado un ciclo paralelo para *A. phagocytophilum* en los conejos del desierto e *Ixodes dentatus*,²¹ aunque esta especie se alimenta en seres humanos con mucha menor frecuencia que *I. scapularis*. Las garrapatas adquieren *B. burgdorferi* o *A. phagocytophilum* mientras se alimentan. En cambio, *Rickettsia rickettsii*, el agente de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, se transmite verticalmente de las hembras de *Dermacentor variabilis* infectadas a su progenie,^{36,51} lo que hace que las larvas sean vectores potenciales.

El grado de ingurgitación representa una estimación aproximada del tiempo de alimentación. *B. burgdorferi* vive en el intestino medio de *I. scapularis* infectadas. Cuando la garrapata se alimenta, las espiroquetas se multiplican y empiezan a migrar a la hemolinfa. La espiroqueta necesita de 2 a 3 días para alcanzar las glándulas salivales de la garrapata.^{13,41,52} donde, en el proceso de eliminar el exceso de agua para hacer lugar a la sangre ingerida, la garrapata “escupe” sobre el sitio donde picó, inoculando así las espiroquetas.⁵⁰ En estudios experimentales, se dejó que ninfas y hembras de *I. scapularis* picaran roedores durante períodos definidos. En vista de que la longitud del cuerpo aumenta mientras el tamaño del escudo rígido permanece constante, se desarrollaron ecuaciones de regresión basadas en la relación de la longitud corporal con el ancho del escudo, denominadas “índice del escudo”. El índice del escudo se considera un medio más exacto para calcular el tiempo de alimentación que los cálculos visuales subjetivos.^{13,52} En el caso de la borreliosis de Lyme, la identificación de un ejemplar no ingurgitado de *I. scapularis* con el aparato bucal intacto sugeriría un contacto breve con el huésped y haría dudosa la transmisión, aun cuando el paciente haya viajado a una zona endémica. *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* parece ser transmitido algo más rápidamente que *B. burgdorferi*, por lo que el grado de congestión y el índice del escudo pueden ser menos útiles para evaluar la probabilidad de que el agente patógeno haya sido inoculado al paciente.^{10,26} Se necesitan más estudios para dilucidar este problema.

Las ninfas se consideran el instar más probable para transmitir la enfermedad, porque su tamaño pequeño les permite a menudo completar su alimentación sin ser detectadas (lámina en color A-1B). Un alto porcentaje de las enfermedades relacionadas con garrapatas se presenta a fines de la primavera y en los meses de verano, debido al aumento de actividad de las ninfas.

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Los antecedentes de *Ixodidae* en medicina veterinaria y, más recientemente, en las enfermedades humanas, son abundantes. *Ixodidae* (las garrapatas duras) son los vectores de una amplia variedad de agentes patógenos asociados con enfermedades humanas,⁵¹ que incluyen espiroquetas, rickettsias, bacilos gramnegativos, virus, protozoos y neurotoxinas. Las especies descritas aquí se asocian con uno solo o con una combinación de estos agentes (cuadro A-2).

Las infecciones transmitidas por garrapatas pueden presentarse con síntomas tempranos, similares y vagos, de fiebre, fatiga y otros síntomas gripales que dificultan el diagnóstico exacto rápido,^{11,32,36,54} teniendo en cuenta que el tratamiento antibiótico difiere de acuerdo con el agente involucrado. En la mayoría de los casos, las enfermedades transmitidas por garrapatas son leves y se resuelven con un diagnóstico exacto temprano, seguido del tratamiento correcto. Los diagnósticos erróneos pueden conducir a un aumento de la morbilidad, a la infección crónica y, en raros casos, a la muerte.

Las infecciones simultáneas después de las picaduras de garrapata parecen probables.^{32,39} Aunque no son prueba de coinfección, en lugar de infección secuencial, los estudios serológicos han demostrado que, en las zonas endémicas superpuestas, los pacientes con enfermedad de Lyme clínica tienen además anticuerpos contra *Babesia* o *Ehrlichia*.³² En un tiempo, *Babesia* fue considerada el agente de la enfermedad de Lyme porque los pacientes con diagnóstico de babesiosis presentaban eritema migrans, una característica de la infección por *B. burgdorferi*.

Ciertas especies son vectores de patógenos específicos. Por ejemplo, para la borreliosis de Lyme esto está bien demostrado en todo el mundo. *Ixodes scapularis* está definido como el vector de *Borrelia burgdorferi*, la espiroqueta de la enfermedad de Lyme, en las zonas del noreste y superiores del oeste medio de los Estados Unidos. En otras partes, los vectores son *I. ricinus* (Europa), *I. persulcatus* (Asia) e *I. pacificus* (noroeste estadounidense). En la actualidad, otras especies de *Ixodes* no se consideran vectores competentes. En el este de los Estados Unidos, la identificación de una especie de *Ixodes* diferente de *I. scapularis* descartaría por completo la enfermedad de Lyme, aunque si la presentación clínica fuera clásica (con eritema migrans)^{35,50,54} sería necesario considerar la existencia de una segunda garrapata desconocida. Hace poco, en el sur de los Estados Unidos, una borreliosis similar a la enfermedad de Lyme, causada por *Borrelia lonestari*, similar a *B. theileri* (el agente de la borreliosis bovina), se ha atribuido a la exposición a *Amblyomma americanum* (garrapata Lonestar).²⁴

La parálisis por garrapatas es una curiosa enfermedad de patogenia desconocida.^{12,15,46} La parálisis flácida aguda puede simular un botulismo y síndrome de Guillain-Barré; la extracción de la garrapata causa una regresión rápida y notable de la parálisis. No queda ninguna secuela. Aunque más de 60 especies de garrapatas pueden provocar parálisis en los animales, sólo *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes holocyclus* (la garrapata de marsupiales australianos) pican a los seres humanos. En América del Norte la enfermedad se ve con mayor frecuencia en los estados del sudeste y noroeste de los Estados Unidos y en la Columbia Británica.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La distribución geográfica de las garrapatas duras se resume en el cuadro A-2.

***Ixodes scapularis*.** Antes llamada *Ixodes dammini* en el noreste e *Ixodes scapularis* en otras partes, las dos son consideradas ahora por la mayoría de las autoridades variedades del norte y

Cuadro A-2 Garrapatas duras y enfermedades asociadas con la distribución geográfica

ESPECIES DE GARRAPATAS	ENFERMEDAD	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Ixodes scapularis</i>	Enfermedad de Lyme Anaplasmosis granulocítica humana Babesiosis	Este y medioeste superior de los EE.UU.
<i>Ixodes pacificus</i>	Enfermedad de Lyme	Noroeste de los EE.UU.
<i>Dermacentor variabilis</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas Tularemia Parálisis por garrapatas	Dos tercios orientales de los EE.UU., costa oeste de los EE.UU.
<i>Dermacentor andersoni</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, fiebre por garrapatas de Colorado Parálisis por garrapatas	Estados de las Montañas Rocosas
<i>Amblyomma americanum</i>	Ehrliquiosis monocítica humana	Centro-sur de los EE.UU., sudeste de los EE.UU., estados mesoatlánticos; alcanza hacia el norte hasta el sur del estado de Nueva York
<i>Ixodes cookei</i>	Tularemia Virus de Powassan	Noreste de los EE.UU. y sudeste de Canadá
<i>Ixodes marxi</i>	Virus de Powassan	Noreste de los EE.UU. y sudeste de Canadá

del sur de la misma especie, debido a la capacidad de aparearse con éxito entre sí.^{34,54} El nombre *Ixodes scapularis* tiene la prioridad. *I. scapularis* ocupa una amplia zona al este de las Montañas Rocosas, aunque las poblaciones infecciosas parecen estar centralizadas en el centro-noroeste y en el noreste, desde Maryland al sur de Nueva Inglaterra.

***Ixodes cookei*.** La distribución de *Ixodes cookei* (la garrapata de la marmota) se superpone con la de *I. scapularis*; se encuentra principalmente en el noreste de los Estados Unidos y en el sudeste de Canadá.

***Ixodes marxi*.** *Ixodes marxi* (la garrapata de la ardilla) también tiene una distribución que se superpone a *I. scapularis* en el noreste de los Estados Unidos y en el sudeste de Canadá.

Especies de *Dermacentor*. *Dermacentor variabilis* (la garrapata del perro) se distribuye extensamente en todos los Estados Unidos al este de las Montañas Rocosas. Su amplia distribución y sus hábitos de búsqueda de huéspedes aumentan la incidencia de contacto con los seres humanos en comparación con otras especies de *Dermacentor*.

Dermacentor andersoni se encuentra en los estados de las Montañas Rocosas y es la garrapata que describió Ricketts como el vector de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en el Bitter Root Valley de Idaho.⁶⁰

***Amblyomma americanum*.** *Amblyomma americanum* (la garrapata Lonestar) está extensamente distribuida en el sur (al este de las Montañas Rocosas) y en el este, hasta el sur del Estado de Nueva York. Hay indicios de que puede estar extendiéndose a Nueva Inglaterra. *A. americanum* tiene la peculiaridad, entre las especies de garrapatas descritas aquí, de ser la única que busca activamente un huésped.^{36,51}

IDENTIFICACIÓN

Los integrantes de la familia *Acari* (garrapatas y ácaros) se diferencian de otros arácnidos por la ausencia de segmentación evidente. El prosoma anterior (apéndices) está fusionado con el opistosoma (abdomen). El gnatosoma (capitulum) donde se encuentran las piezas bucales, es peculiar de esa familia.⁵¹ Las figuras A-1 y A-2 representan la vista dorsal y ventral, respectivamente, de una garrapata dura. Los dibujos fueron hechos para señalar la mayoría de los rasgos importantes. A continuación se presenta un glosario de las características de identificación representadas en estas figuras; todas ellas son útiles para la identificación de las garrapatas; el tamaño, la ubicación, el color y la presencia o la ausencia de cada característica pueden ser importantes.

- Capitulum: porción anterior del cuerpo, que comprende la base del capitulum, el hipostoma, los quelíceros y los palpos.
- Base del capitulum: base del capitulum a la que se asocian las piezas bucales. (La longitud del capitulum en relación con su base es útil para la identificación).

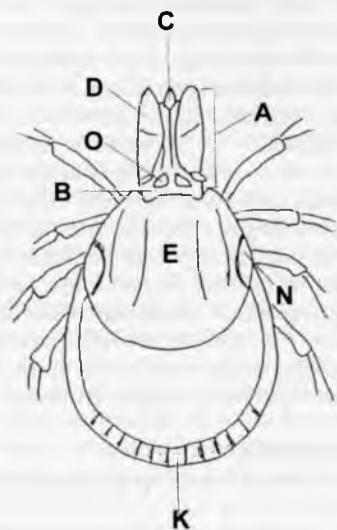


Figura A-1 Esquema genérico del dorso de una garrapata dura.

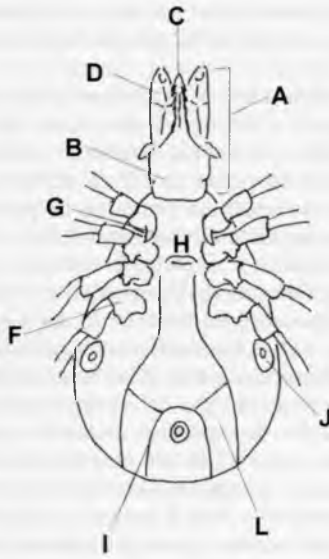


Figura A-2 Esquema genérico de la superficie ventral de una garrapata dura.

- C. Hipostoma: estructura media de las piezas bucales, paralelas y entre los palpos. El hipostoma tiene estructuras similares a dientes, llamadas denticulos. Estos se encuentran en el hipostoma en una disposición específica, llamada “fórmula de dentición” (la proporción de denticulos izquierdos con relación a los denticulos derechos). *Ixodes scapularis*, por ejemplo, tiene una fórmula de dentición 3/3, que cambia a 2/2 a medida que evoluciona.
- D. Palpos: par de apéndices móviles, paralelos al hipostoma.
- E. Escudo: placa dorsal esclerosada posterior al capitulum.
- F. Coxales: segmentos basales de las patas. Los coxales se numeran del I al IV; el coxal I es el más cercano al capitulum.
- G. Espolones coxales: proyección que se encuentra en el borde posterior del coxal. Los espolones del lado medial se llaman internos y los del lado lateral, externos. Hay pocas variaciones, o ninguna, en el tamaño de los espolones y su configuración entre ejemplares de la misma especie.
- H. Poro genital: orificio externo de los órganos genitales, ubicado ventralmente en el eje medio, entre los coxales.
- I. Surco anal: ranura semicircular que rodea el ano de algunas especies. En las especies de *Ixodes*, la curva es anterior al ano. En otros géneros la curva es posterior o falta.
- J. Placas de los espiráculos: orificios externos del sistema respiratorio, ubicados ventralmente, por detrás del coxal IV en los bordes laterales (son útiles para diferenciar el macho de *I. scapularis* de los machos de *I. cookei* y de *I. marxi*).
- K. Festones: zonas rectangulares separadas por ranuras bien definidas, ubicadas en el borde posterior de algunas garrapatas duras. Las especies de *Ixodes* no tienen festones.
- L. Placas ventrales: grupo de placas de forma y tamaño definidos en la superficie ventral de los machos adultos. Nos referiremos específicamente a la placa anal cuando se describan las especies de *Ixodes*.
- M. Ornamentación: algunas garrapatas se llaman garrapatas ornadas por la presencia de marcas coloreadas distintivas de ciertas especies. *D. variabilis* y *A. americanum* son garrapatas ornadas.

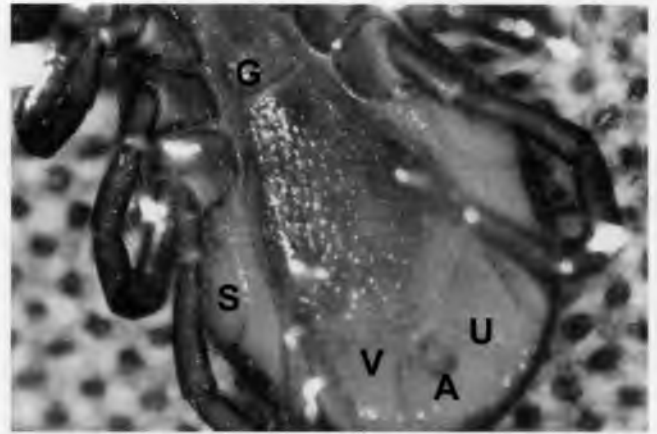


Figura A-3 Superficie ventral de un macho adulto de *Ixodes scapularis*, que muestra el ano (A), el surco anal en forma de U (U), el poro genital (G), las placas ventrales (V) y las placas de los espiráculos (S).

- N. Ojos: marcas ovoides ornadas en los bordes laterales del escudo de algunas garrapatas.
- O. Zonas porosas: zonas que parecen “ojos”, que se encuentran en la base dorsal del capitulum de las garrapatas adultas.

***Ixodes scapularis*.** Una característica importante de todas las especies de *Ixodes* es una ranura en forma de U que mira hacia adelante, rodea el ano y termina en el borde posterior de la superficie ventral (fig. A-3 y lámina en color A-1C). Otros géneros de garrapatas duras carecen de esta característica.⁵¹ Las ninfas y las hembras adultas de *I. scapularis* tienen un escudo ovalado (lámina en color A-1B) de un tamaño aproximado a la mitad del dorso en los ejemplares no ingurgitados. El escudo de los machos adultos cubre casi todo el dorso (lámina en color A-1B), característica de todas las garrapatas duras que no se mencionará en las descripciones posteriores. La presencia de pelos gruesos sobre el escudo es una de las características que distinguen a los machos de *I. scapularis* de los ejemplares de *I. cookei* y de *I. marxi*, en los que son delgados o faltan. Visto desde abajo (lámina en color A-1C) el aparato bucal tiene el doble de longitud que la base del capitulum. El hipostoma de ninfas y hembras adultas tiene una fórmula de dentición 3/3, que progresa a 2/2 de adelante hacia atrás. Los machos adultos tienen un hipostoma más “práctico” que la mayoría de las otras especies de *Ixodes*, con denticulos laterales que se hacen romos a crenados a medida que se acercan a la línea media.

El color puede ayudar a diferenciar *I. scapularis* de otras especies de *Ixodes*. La porción anterior esclerosada de ninfas y hembras adultas (que incluye el capitulum, las patas y el escudo) es de color castaño oscuro, en marcado contraste con el abdomen, que se ve de color castaño rojizo a gris bronceado en los ejemplares no ingurgitados (lámina en color A-1B), de donde surge el nombre de *garrapata de patas negras*. Los machos adultos tienen un color castaño oscuro uniforme (lámina en color A-1B). Hay espolones coxales (lámina en color A-1D y fig. A-4), y el coxal I tiene un espolón interno que se superpone al coxal II. Los coxales I a IV tienen espolones externos romos. El espolón interno del coxal I parece menos agudo en las ninfas. Las placas de los espiráculos de ninfas y hembras son redondas (lámina en color A-1C); en los machos son elon-

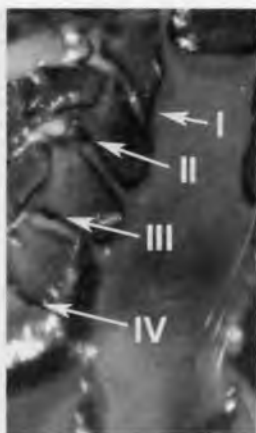


Figura A-4 Detalle de la lámina en color A-1D. Espolones coxales de *Ixodes scapularis* adulto. El espolón en el coxal I es largo, puntiagudo y orientado hacia adentro. Los espolones de los coxales II a IV son cortos, romos y orientados hacia afuera.

gadas de adelante hacia atrás (fig. A-3). Las placas de los espiráculos en los machos de *I. cookei* e *I. marxi* parecen redondas. La placa anal de los machos es corta en sentido anteroposterior, en comparación con las de *I. cookei* e *I. marxi* (fig. A-3).

***Ixodes cookei*.** El escudo de las ninfas y las hembras adultas es angulado, desde el extremo posterior hasta la porción media de los bordes laterales (lámina en color A-1E). En las hembras adultas, el ancho del escudo se ve de aproximadamente el mismo tamaño que la longitud anteroposterior, en tanto que en las ninfas parece más ancho que largo. Las piezas bucales de todos los estadios evolutivos parecen proporcionadas a la longitud de la base del capitulum (lámina en color A-1E). En comparación con el de *I. scapularis*, el hipostoma de las hembras y de las ninfas es similar, con una fórmula de dentición 3/3, que progresa a 2/2, aunque en las hembras de *I. cookei* la punta es más redondeada. El hipostoma de las ninfas es aún más redondeado y el de los machos es corto, redondo y crenado. Una característica interesante, más pronunciada en las ninfas de esta especie, es la proyección lateral del primer segmento de los palpos a partir de borde posterior. Estas proyecciones tienen el aspecto de espolones y a menudo se denominan espolones de los palpos. En todos los estadios, el color es castaño, como café con leche claro y es uniforme en toda la garrapata. La disposición de los espolones coxales es similar a la de *I. scapularis*, con un espolón interno pronunciado en el coxal I y espolones externos romos en los coxales I a IV. Las placas de los espiráculos de ninfas y hembras son similares a las de *I. scapularis*. En los machos parecen más redondas, no alargadas, como es el caso en los machos de *I. scapularis*. La placa anal de los machos de esta especie se ve dos veces más larga que ancha, lo que ayuda a diferenciarla de *I. scapularis*.

***Ixodes marxi*.** El escudo de las ninfas y las hembras de esta especie es similar al de *I. cookei*, en el sentido de que es angulado desde la porción media del borde externo hasta el extremo posterior (lámina en color A-1F). Esto puede confundir la identificación de estas especies. En las hembras hay diferencias en la longitud y el ancho. El escudo de las hembras de *I. marxi* es mucho más largo que ancho. En *I. cookei*, el largo y el ancho son proporcionales. En las ninfas de *I. marxi* el largo y el ancho son básicamente iguales, en tanto que en *I. cookei*, el escudo es más ancho que largo. Dada la similitud de las proporciones del escudo entre una ninfa de *I. marxi* y una hembra adulta de *I.*

cookei, la identificación debe hacerse observando la presencia o la ausencia de poro genital. El escudo masculino parece carecer de pelo.

Visto desde el lado ventral, el aparato bucal de los tres estadios es proporcional a la longitud de la base del capitulum. El hipostoma de ninfas y hembras es similar al de *I. scapularis*, con una fórmula de dentición de 3/3 en la punta y 2/2 a medida que se aproxima el extremo posterior. La punta, en las hembras, es muy puntiaguda. El hipostoma masculino es corto, redondeado en la punta y crenado. El color de esta especie es similar al de *I. cookei*; todo el cuerpo de los tres estadios es de color castaño, como café con leche claro. La disposición de los espolones coxales es una característica importante para la identificación de *I. marxi*. Las ninfas y las hembras tienen un espolón interno romo y un vestigio de espolón externo en el coxal I. La ausencia notable de espolones en los coxales II a IV diferencia las hembras y las ninfas de esta especie de las de otras *Ixodes* descritas aquí. La disposición de los espolones coxales de los machos es similar a la de *I. cookei*, con las excepciones de que hay un espolón interno menos pronunciado en el coxal I y ausencia notable de espolones en el coxal IV. Las placas de los espiráculos redondas en todos los estadios ayudan a diferenciar a los machos de esta especie de *I. scapularis*, en los que son alargados. La placa anal en el macho de *I. marxi* es más largo que ancho en comparación con *I. scapularis*, en la que las medidas parecen iguales.

***Dermacentor variabilis*.** *D. variabilis* es una garrapata ornada, lo que significa que es bastante coloreada, con marcas contrastantes. El color de las garrapatas ornadas se describe como el color básico (el color global predominante de la garrapata) y el patrón de colores (marcas contrastantes) (lámina en color A-1G y lámina en color A-1H).⁸ El patrón de colores se observa en el escudo, así como en las patas de *D. variabilis*. Se encuentran once festones dispuestos en semicírculo alrededor del borde posterior (lámina en color A-1G). Estos festones pueden verse tanto en el dorso como en el vientre de todos los estadios. El escudo de las hembras es angulado y es tan largo como ancho. El patrón de color es perlado a gris y contrasta con el resto de la garrapata, en el que el color básico es castaño marrón. Se encuentran líneas y manchas de color castaño distribuidas al azar, diferentes entre ejemplares. Puede observarse la presencia de “ojos” en la porción media de los bordes laterales (lámina en color A-1H). El color y el contraste son similares en los machos y las hembras. Las marcas ornamentales cubren todo el dorso debido a la naturaleza del escudo masculino. Las zonas de color básico parecen más grandes a medida que se acercan a la porción media del borde lateral y al borde posterior. Las marcas a cada lado del eje medio son aproximadamente especulares. El escudo de las ninfas es largo y no parece tan angulado como en la hembra; se redondea desde la porción media de los bordes laterales hasta la línea media posterior. El patrón de color parece ser más prominente. Hay “ojos” en los ángulos de los bordes laterales, a medida que se acercan al extremo posterior. (Nota: no se han visto ninfas en nuestro laboratorio y se sabe que el contacto con seres humanos es poco frecuente).⁸

La base del capitulum de todos los estadios parece más ancha que larga (lámina en color A-1H). En las ninfas, en la vista dorsal, esta base tiene proyecciones pronunciadas similares a espolones posteroexternos, que hacen que la base parezca triangular. El hipostoma de todos los estadios es corto y redondeado. Los palpos son cortos y gruesos en los adultos, pero delgados en las ninfas. Los espolones coxales son similares en los adultos. El coxal I tiene espolones internos y externos grandes que conver-

gen en la línea media, lo que le confiere un aspecto de muesca. Los coxales II a IV tienen espolones externos más pequeños. Las ninfas tienen un espolón externo predominante y un espolón interno menos dominante en el coxal I, con espolones externos muy pequeños en los coxales II y III y ninguno en el coxal IV. En el noreste, no debe confundirse *D. variabilis* con *Dermacentor albipictus* (la garrapata del alce, también llamada garrapata de invierno). Así como un alce es más grande que un perro o un ciervo, *D. albipictus* es mucho más grande que *D. variabilis* o *I. scapularis* (fig. A-5). Los ejemplares de estas especies ingurgitados de sangre tienen una diferencia media de tamaño de 2 mm.⁸ Una *D. variabilis* ingurgitada puede alcanzar dimensiones impresionantes (lámina en color A-1G), pero una hembra de *D. albipictus* totalmente ingurgitada puede tener el tamaño de la uña del cuarto dedo de un adulto. En condiciones medioambientales óptimas, se sabe que *D. albipictus* puede desangrar un alce debido al número de garrapatas que se alimentan en forma simultánea. Por fortuna, el contacto de seres humanos con *D. albipictus* es mínimo a inexistente.

Amblyomma americanum. *A. americanum* es otra garrapata ornada (lámina en color A-2A). Tiene once festones. El color básico es más predominante que en *D. variabilis* y los patrones de color son más constantes. El escudo de las hembras es angular y casi igual de largo que de ancho. En las cercanías de los bordes laterales se hace más oscuro que el color básico, que es bronce rojizo. Se ven "ojos" en los extremos laterales (lámina en color A-2B). El patrón destacable del escudo de las hembras es un parche iridiscente en el extremo posterior (lámina en color A-2A). Según el ángulo de la fuente de iluminación esta marca aparece de color azul verdoso a rosa perlado y recuerda a la gasolina en agua. Este aspecto caracteriza a todos los patrones de marcas de color de *A. americanum* en todos los estadios. El escudo de las ninfas es más ancho que largo, con "ojos" en los extremos laterales. Falta el parche iridiscente que se encuentra en el extremo posterior de las hembras. El escudo masculino es muy notable por la presencia de dos "herraduras" invertidas, coloreadas, en el borde posterior (lámina en color A-2C). Se ven "ojos" en los bordes laterales. El patrón de marcas de color se extiende desde debajo de los "ojos" hacia la línea media y confiere el aspecto de un seudoescudo parecido al de la hembra. Los ejemplares macho y hembra pueden ser confundidos por un observador inexperto. También se observan patrones de marcas de color distribuidas al azar a lo largo de la parte posterior de los bordes laterales.

El aparato bucal en todos los estadios son largos en comparación con la base del capitulum. El hipostoma parece bulboso, porque es estrecho en su parte posterior y ancho y redondeado en su porción anterior. La disposición de los espolones coxales es similar en todos los estadios. Hay un espolón interno marcado y un espolón corto externo redondeado en el coxal I. Un espolón corto, puntiagudo en los coxales II a IV parece más cerca de la línea media, aunque lo más probable es que sea un espolón interno. Los machos tienen un espolón interno marcado y largo en el coxal IV (lámina en color A-2D). Todos los estadios tienen una ranura anal. La ranura se ve como un semicírculo posterior al ano. De la porción media del semicírculo descendiende una ranura única hacia el margen posterior. El aspecto global es el de una copa de vino o el de un cáliz (lámina en color A-2D).

RESUMEN DE IDENTIFICACIÓN

Las descripciones previas siguen la secuencia de observación usada en nuestro laboratorio. Cuando se encuentra un



Figura A-5 Comparación del tamaño de garrapatas ingurgitadas. Una garrapata de alce ingurgitada, *Dermacentor albipictus* (A), supera mucho en tamaño a una garrapata americana del perro ingurgitada, *Dermacentor variabilis* (V), que a su vez es más grande que la garrapata del ciervo ingurgitada, *Ixodes scapularis* (S). Todas son hembras adultas.

ejemplar con un surco en forma de U dirigido hacia adelante, debe identificarse o descartarse como *Ixodes scapularis*. Para distinguir *I. cookei* de *I. marxi*, la disposición de los espolones coxales y la configuración del escudo son elementos claves. Cuando la garrapata es ornada, las diferencias se establecen sobre la base de la configuración del escudo, el patrón de marcas de color comparado con el color básico, la configuración del patrón de marcas de color, la longitud del aparato bucal respecto de la base del capitulum y la disposición de los espolones coxales. Las características diagnósticas se resumen en el cuadro A-3.

Los buenos libros de referencia hacen descripciones más exhaustivas.^{8,9,27,37} El tema de las enfermedades transmitidas por garrapatas no se ha agotado. Las enfermedades emergentes, así como las ya establecidas, que se asocian actualmente con la transmisión por garrapatas es objeto de extensos estudios. La identificación exacta de una garrapata en un paciente que presenta síntomas gripales vagos puede y debe influir en el tratamiento inicial.

Especies de *Ornithodoros*

Relación con las enfermedades

Las especies de *Ornithodoros* transmiten las especies de *Borrelia* que causan fiebre recurrente endémica.

Identificación

Las especies de *Ornithodoros* son garrapatas blandas. Por definición, su aparato bucal no es visible de frente y carecen de escudo. Tienen un hipostoma prominente, cubierto con dientes (véase lámina en color A-2E).

Distribución geográfica

Es difícil distinguir las diversas especies que pueden transmitir fiebre recurrente. En el noroeste de los Estados Unidos y

Cuadro A-3 Características diagnósticas de las garrapatas duras

ESPECIE	ESTADIO	ESCUDO	SURCO ANAL	ESPOLONES COXALES	APARATO BUCAL/BASE DEL CAPITULUM	OJOS	FES-TONES	COLOR
<i>Ixodes scapularis</i>	Ninfa	Ovalado; cubre un tercio del dorso y es oscuro en contraste con el abdomen	En forma de U mirando hacia adelante, rodeando el ano	Espolón interno prominente en el coxal I; espolones externos romos de I a IV	Aparato bucal el doble de largo que la base del capitulum cuando se mira desde la cara ventral	No	Ausentes	Capitulum, patas y escudo de color café negro con el abdomen rojo bronceado contrastante
	Hembra adulta	Cubre medio dorso, por lo demás se parece a la ninfa	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	No	Ausentes	Igual a la ninfa
	Macho adulto	Cubre todo el dorso; veloso	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa; hipostoma más "práctico" que otras especies de <i>Ixodes</i> .	No	Ausentes	Color café negro global
<i>Dermacentor variabilis</i>	Ninfa	Cubre medio dorso; patrón de color predominante	Ausente	Espolón externo prominente en el coxal I; espolones externos menos romos en II y III	La base del capitulum dorsal parece triangular; los palpos son estrechos	Sí	Presentes	Patrones de color más predominantes
	Hembra adulta	Angular; igual de largo que de ancho; patrón de color con marcas de color base distribuidas al azar	Ausente	Espolones internos y externos prominentes en el coxal I, con aspecto de muescas	Palpos gruesos; base del capitulum más ancha que el largo del aparato bucal	Sí	Presentes	El color base es castaño; el patrón de color es blanco grisáceo
	Macho adulto	Color base y patrón de color aproximadamente iguales	En forma de cáliz	Igual a la hembra	Igual a la hembra	Sí	Presentes	Igual a la hembra
<i>Amblyomma americanum</i>	Ninfa	Angular; más ancho que largo; color base predominante; "ojos" en los extremos laterales	En forma de cáliz	Los espolones aparecen en la porción media posterior de los cuatro coxales; el espolón en el coxal I es más pronunciado	El aparato bucal parece mucho más largo que la base del capitulum; el hipostoma es bulboso	Sí	Presentes	Color base predominante caramelo; el patrón de color es iridiscente azul verdoso a amarillo
	Hembra adulta	Angular; tan ancho como largo; color base predominante con "ojos"; parche de patrón de color en el extremo posterior	En forma de cáliz	El coxal I tiene un espolón medial prominente; los espolones parecen ausentes de II a IV	Igual a la ninfa	Sí	Presentes	Igual a la ninfa

(Continúa)

Cuadro A-3 Características diagnósticas de las garrapatas duras (cont.)

ESPECIE	ESTADIO	ESCUDO	SURCO ANAL	ESPOLONES COXALES	APARATO BUCAL/BASE DEL CAPITULUM	OJOS	FESTONES	COLOR
	Macho adulto	Color base predominante: "herraduras" con patrón de color invertido en el borde posterior	En forma de cáliz	Similar a la hembra con un espolón interno marcado en el coxal IV	Igual a la ninfa	Sí	Presentes	Igual a la ninfa
<i>Ixodes cookei</i>	Ninfa	Angular; más ancho que largo	En forma de U mirando hacia adelante, rodeando el ano	Similar a <i>I. scapularis</i>	Aparato bucal de igual longitud que la base del capitulum; hipostoma similar a <i>I. scapularis</i> , aunque más redondeado en la punta; espolones palpaes presentes	No	Ausentes	Castaño café con leche claro
	Hembra adulta	Angular; tan ancho como largo	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	No	Ausentes	Igual a la ninfa
	Macho adulto	Menos veloso en comparación con <i>I. scapularis</i>	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	Proporcional a la ninfa; hipostoma redondeado y crenado	No	Ausentes	Igual a la ninfa
<i>Ixodes marxi</i>	Ninfa	Angular; tan ancho como largo	En forma de U mirando hacia adelante, rodeando el ano	Espolón interno romo y presencia de espolón externo en el coxal I; ausencia de espolones en II a IV	Aparato bucal de igual longitud a la base del capitulum	No	Ausentes	Castaño café con leche claro
	Hembra adulta	Angular; más largo que ancho	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa	Igual a la ninfa; el hipostoma es muy puntiagudo	No	Ausentes	Igual a la ninfa
	Macho adulto	No se observa vello	Igual a la ninfa	El coxal I tiene un espolón interno prominente y un espolón externo romo; de II a IV tienen espolones externos romos; espolones ausentes en el coxal IV	Proporcional a la ninfa; hipostoma redondeado y crenulado	No	Ausentes	Igual a la ninfa

el oeste de Canadá, *O. hermsi* es el principal vector. Esta especie se alimenta sobre roedores pequeños, así como en seres humanos, y habita en agujeros y hendiduras de chozas y cabañas. Un brote famoso en un contingente de escultistas se concentró en los exploradores mayores y guías que pernoctaron en una cabaña abandonada y dejaron a los más jóvenes pasar la noche bajo las estrellas, sin ser picados.⁵⁸

En el sudoeste y el sur centrooccidental, el vector común es *O. turicata*, que se encuentra en diversos mamíferos pequeños y grandes, roedores, aves y reptiles. Esta especie habita a menudo en madrigueras de animales.

Ácaros

Existen numerosas especies de ácaros en la naturaleza. Las especies de la familia *Trombiculidae* (bicho colorado o ninguas) producen prurito intenso o dermatitis cuando se alimentan temporalmente. Los miembros del género *Leptotrombidium* transmiten la fiebre fluvial japonesa en el sudeste asiático y Australia.⁶⁵ Los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* son alergénicos para ciertas personas. El ácaro del ratón, *Liponyssoides (Allodermanyssus) sanguineus*, transmite *Rickettsia akari*, el agente causal del tifo pustuloso (*rickettsialpox*). Esta enfermedad se describió por primera vez en la ciudad de Nueva York y continúa siendo allí un problema.²⁵

El ácaro de la sarna, *Sarcoptes scabiei*, y el ácaro de los folículos, *Demodex folliculorum*, son los dos ácaros que tienen una asociación parasitaria estrecha y prolongada con los seres humanos.

Sarcoptes scabiei (sarna)

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Sarcoptes scabiei se conoce como el "ácaro de la comezón". El ácaro causa la sarna al excavar la piel y depositar sus huevos en las madrigueras. Los estadios de larva y ninfa resultantes del ácaro viven en las madrigueras y los folículos pilosos adyacentes. Las deposiciones de los ácaros provocan prurito intenso, que conduce a una irritación importante y pérdida del pelo. La recidiva de la enfermedad suele ocurrir por la reinfestación de ácaros presentes en contactos tratados de manera inadecuada, pero las recaídas también pueden suceder después de un tratamiento adecuado.⁶¹

IDENTIFICACIÓN

El examen microscópico de raspados de piel revela el ácaro característico (que mide 0,2 a 0,4 mm de longitud), sus huevos o pelotillas fecales (escibalos) (véase lámina en color A-2F). Los ejemplares se obtienen colocando una gota de vaselina líquida sobre una hoja de bisturí estéril y dejando que parte de la vaselina cubra la pápula. Se raspa la pápula vigorosamente seis o siete veces para quitar el techo y luego se transfiere el material raspado, que debe contener algunas manchas de sangre en la vaselina, a un portaobjetos de vidrio, usando un palillo de madera si es necesario. Después de agregar un par de gotas de vaselina líquida al preparado y mezclar, se coloca un cubreobjetos de vidrio.¹⁸

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los ácaros de la sarna tienen distribución mundial.

Demodex folliculorum (folículos pilosos) y *Demodex brevis* (glándulas sebáceas)

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Las infecciones suelen comprometer la cara. Los microorganismos pueden causar prurito y reacción tisular local cuando excavan la piel. Sin embargo, también se encuentran en individuos asintomáticos.

IDENTIFICACIÓN

El examen microscópico de muestras de piel revela el ácaro característico, que mide 0,1 a 0,4 mm de longitud.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los ácaros de los folículos tienen distribución mundial.

Arañas

Existen miles de especies de arañas en la naturaleza. La mayoría de ellas tienen toxinas potentes, pero sólo algunas pueden atravesar la piel humana cuando pican.¹⁷

Loxosceles reclusa

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Loxosceles reclusa, conocida como araña parda, prefiere vivir en ropa guardada y sacos de dormir, sótanos, armarios y otros sitios con actividad humana reducida.^{17,18} Su veneno se inyecta a través de la picadura y puede causar descamación intensa y necrosis de la piel. Las dosis grandes de veneno se asocian con diseminación y mortalidad importante. La picadura de la araña parda no produce una lesión diagnóstica; varios informes sugieren que muchas veces se atribuyen incorrectamente lesiones dermonecroticas a las arañas.⁵⁹

IDENTIFICACIÓN

La araña parda se caracteriza por su color amarillo a bronceado, un tamaño de 1 a 2 cm y una marca en forma de violín en la cabeza (véase lámina en color A-2G).^{17,18} Existen varias especies relacionadas, que pueden requerir la ayuda de un especialista para su identificación correcta.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La araña parda se encuentra en la mayor parte de los Estados Unidos continentales, salvo en las secciones occidentales extremas.

Latrodectus mactans

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Existen varias especies de arañas viudas. *Latrodectus mactans*, la araña viuda negra más común, puede causar una reacción sistémica seria, incluso la muerte, después de la inyección de su veneno. Por fortuna, la mayoría de los pacientes no se enferman con gravedad y se recuperan con rapidez.¹⁷⁻¹⁸ Las picaduras ocurren casi siempre en las manos.⁵⁶ La picadura de las arañas macho provocan pocos síntomas o ninguno.²⁰

IDENTIFICACIÓN

La hembra de la viuda negra mide 3 cm de largo (incluidas las patas), es de color negro brillante y muestra una marca roja en forma de reloj de arena característica en el abdomen (véase lámina en color A-2H).^{17,18,56} La diferenciación entre especies relacionadas es difícil y es mejor dejarla en manos de expertos.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Existen diferentes especies de arañas viudas en todos los Estados Unidos continentales. *Latrodectus mactans* se encuentra desde el sur de Nueva Inglaterra hasta el sur de Florida y al oeste hasta California y Oregón; es más frecuente en la parte sur de esta zona. La araña viuda negra del norte, *L. variolus*, se encuentra en Nueva Inglaterra y sur del Canadá hasta Florida y hacia el oeste hasta el este de Texas, Oklahoma y Kansas; es más frecuente en la parte norte de su zona de dispersión.

Tegenaria agrestis

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

En los últimos años, ha habido cada vez más informes de reacciones tóxicas a la picadura de la araña vagabunda, *T. agrestis*. Muchas picaduras no tienen consecuencias graves, pero algunas pueden causar una lesión dermonecrótica similar a la ocasionada por la araña parda. Al eritema sigue la formación de ampollas y después la ulceración. Se forma una escara que luego se desprende, con formación de una cicatriz o no. Los efectos sistémicos son casi siempre leves, pero pueden ser graves. La araña macho es más venenosa que la hembra.⁷

IDENTIFICACIÓN

La araña vagabunda es castaña con manchas grises. Es moderadamente grande: su cuerpo mide de 7 a 14 mm de longitud y alcanza 27 a 45 mm con las patas estiradas.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Tegenaria agrestis se encuentra en todo el noroeste del Pacífico, sudoeste de Canadá y la faja territorial de Alaska. La distribución de esta araña no se superpone con la de *Loxosceles reclusa*. Las arañas vagabundas tejen telas en forma de embudo en lugares húmedos, como pilas de madera y espacios entre pisos para tuberías y cables. Rara vez se la encuentra más arriba de los cimientos o el nivel del piso.

Insecta: moscas, chinches, pulgas y piojos

Larvas de moscas productoras de miasis

La miasis se produce cuando larvas de mosca infectan accidentalmente a seres humanos o penetran la piel para formar lesiones subcutáneas, con el propósito de alimentarse en los tejidos. Los casos importados de miasis están aumentando debido a la mayor frecuencia de viajes a zonas endémicas.^{4,62} Los dos géneros que parasitan más a menudo a los seres humanos son *Dermatobia* y *Cordylobia*. Las moscas de los géneros *Wohlfahrtia*, *Cochliomyia*, *Hypoderma* y *Oestrus* suelen afectar mucho menos a los seres humanos y no se describirán aquí.^{17,20,49}

Dermatobia hominis (larva de la mosca humana)

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Para entender cómo se desarrolla la infección es preciso describir algunas características del fascinante ciclo evolutivo de este organismo. La hembra deposita sus huevos a otro insecto vector, a menudo un mosquito. Cuando el insecto pica a un huésped, los huevos liberan larvas que penetran de inmediato la piel. Las larvas maduran en la piel durante unas 6 a 12 semanas, después de las cuales abandonan el tejido subcutáneo para caer a la tierra, donde requieren otras 3 semanas de maduración antes de que emerja una mosca adulta.^{4,49,62}

Mientras están en la piel, las larvas producen una lesión similar a una magulladura, a menudo muy pruriginosa y, en ocasiones, dolorosa. La extirpación completa de las larvas elimina la enfermedad y permite confirmar el diagnóstico. A veces ocurren infecciones bacterianas secundarias de las lesiones.

IDENTIFICACIÓN

Las larvas varían de tamaño desde pocos milímetros hasta 18 a 25 mm, según su madurez en el momento de la extracción. Están rodeadas de filas de espinas fácilmente visibles con un microscopio de disección (véase lámina en color A-3A). Los estadios larvales pueden tener una forma de "frasco" bien definida, con un cuello largo que se adelgaza progresivamente. El examen microscópico de los espiráculos (placa de los estigmas) es útil para la identificación.^{17,18}

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Dermatobia hominis es común en América Central y del Sur.^{4,17,47}

Cordylobia anthropophaga (mosca Tumbu)

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Las larvas surgen de huevos que han contaminado ropa de cama, prendas de vestir u otros materiales y penetran en la piel del huésped poco después del contacto.^{4,28} El desarrollo en la capa subdérmica ocurre mucho más rápido que el de *Dermatobia hominis*, habitualmente en 2 semanas,⁴ lo que reduce el número relativo de casos importados.²⁸ Los pacientes suelen exponerse a una cantidad más grande de huevos, de manera que es más probable observar numerosas lesiones en la infección por *Cordylobia* que por *Dermatobia*.⁴

IDENTIFICACIÓN

Las larvas alcanzan 7 a 12 mm en el momento de la maduración. Su forma más cónica las distingue con facilidad de *Dermatobia*.²⁸ En el extremo más ancho se encuentran espiráculos.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Cordylobia se encuentra principalmente en África subsahariana.

Otras moscas

Existen varias moscas importantes desde el punto de vista médico que justifican una descripción breve, aunque rara vez se envían ejemplares a los laboratorios clínicos.

Las especies de *Chrysops*, conocidas como moscas ciervo, están involucradas en la transmisión de *Loa loa*, la filaria ocu-

lar africana. Las moscas negras (especies de *Simulium*) son los vectores de las microfilarias que causa la oncocercosis. Existen diferentes especies de *Simulium* en distintas regiones geográficas, pero todas se reproducen en los canales de agua de flujo rápido, cerca de los cuales se registra el número más grande de picaduras. La mosca tsetsé (especies de *Glossina*) sólo existe en África tropical y transmite la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). Estas moscas alargadas tienen una probóscide poderosa, capaz de infligir picaduras dolorosas.⁵⁶

Mosquitos

Los mosquitos son responsables de la transmisión de enfermedades que causan mayor morbilidad que cualquier otro artrópodo.^{17,18,20,56}

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Los mosquitos causan lesiones cutáneas pruriginosas que aparecen poco después de que se alimentaron con sangre. También son capaces de transmitir infecciones graves. Las especies de *Anopheles* son los artrópodos vectores responsables de la transmisión del paludismo. La filariasis es diseminada por algunas especies de *Aedes*, de *Mansonia* y de *Anopheles*. Una variedad de virus transmitidos por artrópodos (los arbovirus) usan especies de *Aedes*, de *Culex*, de *Culiseta*, de *Haemagogus* y de *Sabethes* como vectores de infecciones graves, como la encefalitis equina, la fiebre del Nilo Occidental, la fiebre amarilla y el dengue.^{5,42,56} Tanto los mosquitos machos como las hembras se alimentan de néctar y polinizan las flores. El mosquito hembra debe ingerir sangre para completar el desarrollo de los huevos.²⁰

Los mosquitos flebótomos que pertenecen a los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* son responsables de la transmisión de la leishmaniasis. Son insectos velludos, pequeños y tienden a mantener las alas en forma de V erecta.

Los mosquitos usan indicios olfativos para encontrar sus huéspedes humanos. Un componente específico del sudor humano ha sido identificado como uno de los principales compuestos para *Anopheles gambiae*, un vector importante de *Plasmodium falciparum*.²² Para quienes no pueden dejar de sudar, existen diversos repelentes de insectos para evitar la picadura de los mosquitos. Los productos basados en sustancias vegetales son opciones atractivas para las personas que desean evitar los disuasivos químicos; lamentablemente, las opciones actuales no son tan eficaces como los productos que contienen *N,N*-dietil-3-metilbenzamida (DEET).¹⁶ Quizás en el futuro los compuestos que bloquean los componentes relevantes del sudor serán disuasivos eficaces.

IDENTIFICACIÓN

Los mosquitos son insectos voladores de aspecto delicado, fácilmente reconocidos por la mayoría de las personas. La identificación de género y especie requiere bastante experiencia y debe recurrirse a los especialistas. Las picaduras de mosquito son tan comunes que los pacientes rara vez llevan ejemplares al laboratorio clínico para su identificación.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los mosquitos habitan en todo el mundo, pero algunas especies tienen nichos medioambientales bien definidos. Por ejemplo, la fiebre amarilla clásica era una enfermedad urbana por-

que el vector primario, *Aedes aegypti*, estaba confinado a los depósitos de agua estancada en la vecindad de las moradas humanas. Se pensó que la enfermedad podía ser eliminada por completo con el control del mosquito vector. Lamentablemente, el control de la fiebre amarilla urbana reveló la existencia de un ciclo selvático entre los monos y varias especies de mosquitos selváticos, y pronto se hizo evidente que el virus podía controlarse pero nunca eliminarse (a menos que tengamos éxito en destruir todas las selvas tropicales).⁵⁶

Los mosquitos son uno de los beneficiarios del comercio globalizado. *Aedes albopictus*, también conocido como “mosquito tigre”, reside en el Sudeste asiático, pero logró pasar a los Estados Unidos poniendo huevos en el agua acumulada en neumáticos de automóvil.³³ Esta agresiva especie de mosquito es un vector competente para patógenos humanos importantes, aunque sólo se han aislado los virus de la encefalitis equina del este y de Cache Valley de mosquitos naturalmente infectados.

Chinches

Las chinches de cama (especies de *Cimex*) y los reduvídeos (familia *Reduviidae*) succionan la sangre de vertebrados, incluso seres humanos, y pueden actuar como vectores importantes en la transmisión de enfermedades.^{17,56} Son de hábitos nocturnos, se alimentan por la noche y se esconden y descansan durante el día. A veces se envían ejemplares de la chinche de cama común (*C. lectularius*) a los laboratorios de microbiología para su identificación.

CIMEX LECTULARIUS

Relación con enfermedades. La chinche de cama común puede causar numerosas lesiones pequeñas en la piel donde succiona sangre. La gravedad de las lesiones se relaciona con la sensibilidad del individuo. Las chinches se alimentan principalmente por la noche; el resto del tiempo se esconden en la ropa de cama, el papel de las paredes desprendido y los colchones.¹⁷ No actúan como vectores de agentes infecciosos.

Identificación. Tienen un color naranja claro a bronceado y 5 mm de largo por 3 mm de ancho.^{17,18,20} Los adultos tienen unos pequeños apéndice alares no funcionantes (lámina en color A-3B).

Distribución geográfica. *Cimex lectularius* tiene distribución mundial, aunque es más común en las zonas templadas, en tanto que *C. hemipterus* es más habitual en climas tropicales.⁵⁶

VINCHUCAS: ESPECIES DE PANSTRONGYLUS, RHODNIUS Y TRIATOMA

Relación con las enfermedades. La familia *Reduviidae* tiene algunos nombres populares. Estas chinches a veces se llaman “chinches de nariz cónica” debido a la forma alargada de la cabeza. La mayoría de los integrantes del grupo se conocen como chinches asesinas por su agresividad letal contra otros insectos. Las chinches asesinas también pueden picar a los seres humanos y causar lesiones dolorosas.²⁰

Desde el punto de vista médico, el grupo más importante son las “chinches besadoras” (vinchucas), así llamadas porque pueden succionar sangre de la piel de alrededor de los labios. Las vinchucas transmiten el agente causal de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. No pueden picar a través de la ropa, por lo que las lesiones son más comunes en las partes expuestas del cuerpo.²⁰ Los excrementos que contienen *T. cruzi* se depositan sobre el huésped mientras la chinche se alimenta. El rascado de la piel pruriginosa en el sitio de la picadura introduce los microorganismos en la herida. La transmisión también

ocurre cuando los dedos contaminados con heces se frotan en los ojos, la nariz o la boca.⁵⁶

Identificación. A diferencia de las chinches de cama, los reduvídeos (triatómidos) tienen alas funcionales. Varían en tamaño de 1 a 4 cm, son más alargadas que las chinches comunes y tienen cabezas relativamente largas y delgadas (véase lámina en color A-3C).^{17,18,20,56}

Distribución geográfica. Las vinchucas se encuentran en partes del sur de los Estados Unidos y en América Central y del Sur.

Pulgas

RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES

Las pulgas pueden causar picaduras irritantes, pruriginosas al extraer sangre de un huésped. Las especies más comunes que normalmente transmiten las infecciones más serias al ser humano se expondrán aquí. La pulga de la rata oriental, *Xenopsylla cheopis*, es el vector clásico de la peste³⁰ y del tifus murino.²⁰ *Tunga penetrans*, la pulga *jigger* que se encuentra en África y América Central y del Sur, penetra la piel y pone huevos dentro del huésped (lámina en color A-3D).

La pulga del gato, *Ctenocephalides felis*, y la pulga del perro, *Ctenocephalides canis*, pueden infectar cualquier especie de animal doméstico (lámina en color A-3E). En América del Norte, la pulga del perro es rara y la mayoría de las enfermedades humanas son causadas por la pulga del gato.²⁰ Cualquier especie puede picar a los seres humanos. La tenia del perro, *Dipylidium caninum*, puede infectar a los seres humanos cuando una pulga que contiene el cisticercoide de la tenia se ingiere accidentalmente.^{17,18} Varias especies de pulgas, además de otros insectos, pueden transmitir las larvas de la tenia de la rata, *Hymenolepis diminuta*, a los seres humanos. Se ha reconocido hace poco que la peste endémica puede asociarse con la exposición a los gatos, y el tifus endémico, causado por *Rickettsia typhi*, puede ser transmitido por la pulga de esos animales.⁵³ Una rickettsia recién descrita, conocida como agente ELB,^{48,63} también infecta la pulga del gato y causa una enfermedad parecida al tifus murino. Este nuevo microorganismo del tipo de las rickettsias puede mantenerse por transmisión transovárica en las pulgas del gato.¹ El agente ELB ha sido clasificado como *Rickettsia felis*.²³ En los países desarrollados los gatos pueden ser más importantes que las ratas en la transmisión de estas infecciones.

IDENTIFICACIÓN

El reconocimiento de las pulgas es relativamente fácil. Carecen de alas y tienen patas largas^{17,18,56} musculosas, que cuelgan de un cuerpo "encorvado hacia arriba" (lámina en color A-3D y E). La determinación de las especies de pulgas es muy difícil y suele requerir una experiencia considerable.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las pulgas se encuentran en todo el mundo, coincidiendo con la distribución del huésped mamífero. *Xenopsylla cheopis* se asocia fundamentalmente con las ratas pardas (*Rattus norvegicus*, también conocidas como ratas de cloaca noruegas) y las ratas negras (*Rattus rattus*, también conocidas como ratas domésticas o de tejado). Las especies de *Ctenocephalides* se encuentran en gatos y perros.

Piojos

Los piojos son un problema de salud pública considerable y causan enfermedades que varían de relativamente benignas a

potencialmente mortales. Como agentes de lesión directa provocan infestaciones menores, aunque irritantes de la piel y el pelo. Como artrópodos vectores son capaces de transmitir patógenos bacterianos importantes. Aunque algunas especies se asocian con diferentes partes del cuerpo, hay algunas superposiciones.

PEDICULUS HUMANUS

Relación con las enfermedades. *Pediculus humanus* (el piojo del cuerpo humano) parasita la mayoría de las partes del cuerpo, salvo la cabeza. Los piojos del cuerpo se encuentran principalmente en las regiones más vellosas, desde donde viajan ida y vuelta de la ropa hasta la piel para alimentarse.¹⁷ La succión de sangre causa heridas irritantes, pruriginosas, en el lugar de la picadura, una característica general de las infestaciones por piojos. La mayoría de los huevos, llamados liendres, se depositan en la ropa.

Los piojos del cuerpo transmiten *Borrelia recurrentis*, el agente causal de la fiebre recurrente,^{3,57} y *Rickettsia prowazekii* y *Bartonella (Rochalimaea) quintana*²⁹ que causan el tifus epidémico y la fiebre de las trincheras, respectivamente.^{17,56} En la fiebre recurrente, los piojos aplastados liberan los microorganismos sobre la piel, desde donde luego penetran a través de las abrasiones. Los agentes del tifus y de la fiebre de las trincheras, que están presentes en los excrementos del piojo, penetran cuando el huésped se rasca la piel.⁵⁶ La mortalidad del tifus epidémico no tratado puede ser quizá de hasta un 60%⁵⁶ debido a la presencia de otros factores de complicación, pero el tratamiento antimicrobiano controla con eficacia la infección.³⁸

Los piojos del cuerpo se diseminan por el contacto bastante íntimo con individuos infectados. La vestimenta y la ropa de cama compartidas y las habitaciones comunales cerradas se asocian con la transmisión.¹⁷ No es sorprendente que las infecciones transmitidas por piojos tengan lugar en condiciones de extrema privación, como las guerras y las hambrunas.

Identificación. Los piojos del cuerpo alcanzan 2 a 4 mm de longitud, con un abdomen relativamente largo y delgado. Tienen tres pares de patas, con ganchos similares a tenazas en las puntas, que los ayudan a fijarse a su huésped (lámina en color A-3F).

Distribución geográfica. Los piojos del cuerpo se encuentran en todo el mundo.

PEDICULUS CAPITIS

Relación con las enfermedades. Los piojos de la cabeza causan infecciones irritantes de la cabeza, el pelo y el cuello.⁴⁴ Infectan sólo al hombre; los animales domésticos y otros animales no son sensibles. A diferencia del piojo del cuerpo, los de la cabeza no funcionan como vectores para la transmisión de bacterias, aunque puede ocurrir la infección bacteriana secundaria de las heridas de picaduras.⁶ Las liendres (huevos) de 1 mm de tamaño se pegan al tallo de un pelo cerca del cuero cabelludo (lámina en color A-3G).

Las infestaciones son muy comunes en los niños.⁶ Ocurren a través del contacto estrecho y por compartir fómites como peines, gorras y bufandas.¹⁷

Identificación. Los piojos de la cabeza se parecen mucho a los piojos del cuerpo. Aunque hay superposición de tamaños, pueden ser ligeramente más cortos, en promedio 1 a 3 mm.^{17,18,20} El abdomen largo y los tres pares de patas con ganchos son casi idénticos a los del piojo del cuerpo. Las liendres se confunden con facilidad con la caspa, la descamación seborreica, rocíos para pelo o una infección micótica (lámina en color A-3G).⁶

Los ejemplares deben ser enviados a los expertos para la confirmación.

Distribución geográfica. El piojo de la cabeza se distribuye en todo el mundo.

PHTHIRUS PUBIS

Relación con las enfermedades. *Phthirus pubis*, también conocido como piojo cangrejo o pubiano, causa una infección irritante de la zona pubiana. Puede encontrarse con menor frecuencia en las axilas, el pecho, los muslos y el vello facial de bigotes, cejas y pestañas.^{17,18,20} Los piojos dejan una herida de picadura pruriginosa en la piel después de alimentarse. Puede ocurrir la infección secundaria de la herida de la picadura, pero es rara. Las liendres se adhieren en la porción inferior del tallo del pelo, como ocurre con los piojos de la cabeza. Los piojos pubianos no transmiten agentes infecciosos. La transmisión ocurre principalmente a través del contacto sexual.

Identificación. Los piojos pubianos tienen 1 a 2 mm de largo y un abdomen corto y redondeado. Su forma se describió como "similar a una tortuga". Tienen tres pares de patas, con garras que parecen más grandes y más gruesas que las de los piojos del cuerpo o de la cabeza (lámina en color A-3H).

Distribución geográfica. Los piojos pubianos pueden encontrarse en todo el mundo.

REFERENCIAS

- Azad AF, et al. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:43-46.
- Bennett G. Cockroaches as carriers of bacteria. *Lancet* 1993;341:732.
- Borgnolo G, et al. Louse-borne relapsing fever: a clinical and an epidemiological study of 389 patients in Asella Hospital, Ethiopia. *Trop Geogr Med* 1993;45:66-69.
- Brewer TF, et al. Bacon therapy and furuncular myiasis. *JAMA* 1993;270:2087-2088.
- Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:89-116.
- Carson DS. Detection and treatment of pediculosis capitis. *IM* 1990;11:74-86.
- Centers for Disease Control and Prevention. Necrotic arachnidism—Pacific northwest, 1988-1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45:433-436.
- Cooley RA. The genus *Dermacentor* and *Otocenter* (*Ixodidae*) in the United States, with studies in variation. National Institutes of Health Bulletin No. 171, United States Government Printing Office, Washington, DC, 1938.
- Cooley RA, Kohls GM. The genus *Ixodes* in North America. National Institutes of Health Bulletin No. 184, United States Government Printing Office, Washington, DC, 1945.
- des Vignes F, et al. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001;183:773-778.
- Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis* 1995;20:1102-1110.
- Dworkin MS, et al. Tick paralysis: 33 human cases in Washington State, 1946-1996. *Clin Infect Dis* 1999;29:1435-1439.
- Falco RC, et al. Duration of tick bites in a Lyme disease-endemic area. *Am J Epidemiol* 1996;143:187-192.
- Felz MW, Durden LA. Attachment sites of four tick species (*Acari: Ixodidae*) parasitizing humans in Georgia and South Carolina. *J Med Entomol* 1999;36:361-364.
- Felz MW, et al. A six-year-old girl with tick paralysis. *N Engl J Med* 2000;342:90-94.
- Fradin MS, Day JF. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* 2002;347:13-18.
- Fritzsche TR. Anthropods of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2003:2061-2078.
- Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th Ed. Washington, DC: ASM Press, 2001.
- Goddard J. Arthropods, tongue worms, leeches, and arthropod-borne diseases. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens, & Practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999:1325-1342.
- Goddard J. *Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance*. 4th Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.
- Goethert HK, Telford SR III. Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:633-637.
- Hallem EA, et al. Olfaction: mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature* 2004;427:212-213.
- Higgins JA, et al. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 1996;34:671-674.
- James AM, et al. *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. *J Infect Dis* 2001;183:1810-1814.
- Kass EM, et al. Rickettsialpox in a New York City hospital, 1980 to 1989. *N Engl J Med* 1994;331:1612-1617.
- Katavolos P, et al. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1998;177:1422-1425.
- Keirans JE, Litwak TR. Pictorial key to the adults of hard ticks, Family *Ixodidae* (*Ixodida: Ixodoidea*), east of the Mississippi river. *J Med Entomol* 1989;26:435-448.
- Lane RP, et al. Human cutaneous myiasis: a review and report of three cases due to *Dermatobia hominis*. *Clin Exp Dermatol* 1987;12:40-45.
- Logan JS. Trench fever in Belfast, and the nature of the "relapsing fevers" in the United Kingdom in the nineteenth century. *Ulster Med J* 1989;58:83-88.
- Mann JM, et al. Endemic human plague in New Mexico: risk factors associated with infection. *J Infect Dis* 1979;140:397-401.
- Maupin GO, et al. Discovery of an enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi* in *Neotoma mexicana* and *Ixodes spinipalpus* from northern Colorado, an area where Lyme disease is nonendemic. *J Infect Dis* 1994;170:636-643.
- Mitchell PD, et al. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol* 1996;34:724-727.
- Moore CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis* 1997;3:329-334.
- Oliver JH Jr, et al. Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (*Acari: Ixodidae*). *J Med Entomol* 1993;30:54-63.
- Orloski KA, et al. Surveillance for Lyme disease—United States, 1992-1998. *MMWR CDC Surveill Summ* 2000;49:1-11.
- Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001;32:897-928.
- Patterson FC, Winn WC Jr. Practical identification of hard ticks in the parasitology laboratory. *Pathol Case Rev* 2003;8:187-198.
- Perine PL, et al. A clinico-epidemiological study of epidemic typhus in Africa. *Clin Infect Dis* 1992;14:1149-1158.
- Persing DH. The cold zone: a curious convergence of tick-transmitted diseases. *Clin Infect Dis* 1997;25:Suppl 42.
- Peters W, A Colour Atlas of Arthropods in Clinical Medicine. London: Wolfe, 1992.
- Piesman J, et al. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 1987;25:557-558.
- Ramirez-Ronda CH, Garcia CD. Dengue in the Western Hemisphere. *Infect Dis Clin North Am* 1994;8:107-128.
- Ribeiro JM, et al. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (*Acari: Ixodidae*). *J Med Entomol* 1987;24:201-205.
- Roberts RJ. Head lice. *N Engl J Med* 2002;346:1645-1650.
- Rose O, Kapperud G. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:381-383.
- Schaumburg HH, Herskovitz S. The weak child: a cautionary tale. *N Engl J Med* 2000;342:127-129.
- Schembre DB, et al. *Dermatobia hominis* myiasis masquerading as an infected sebaceous cyst. *CJS* 1990;33:145-146.
- Schriefer ME, et al. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol* 1994;32:949-954.
- Service MW. *A Guide to Medical Entomology*. London: Macmillan, 1980.
- Shapiro ED, Gerber MA. Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2000;31:533-542.
- Sonenshine DE, Azad AF. Ticks and mites in disease transmission. In: Strickland GT, ed. *Hunter's Tropical Medicine*. 8th Ed. Philadelphia: Saunders, 2000:992-999.
- Sood SK, et al. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. *J Infect Dis* 1997;175:996-999.
- Sorvillo FJ, et al. A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48: 269-273.
- Spach DH, et al. Tick-borne diseases in the United States. *N Engl J Med* 1993;329: 936-947.
- Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001;345:115-125.
- Strickland GT. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Diseases*. 8th Ed. Philadelphia: Saunders, 2000.
- Sundnes KO, Haimanot AT. Epidemic of louse-borne relapsing fever in Ethiopia. *Lancet* 1993;342:1213-1215.
- Thompson RS, et al. Outbreak of tick-borne relapsing fever in Spokane County, Washington. *JAMA* 1969;210:1045-1050.
- Vetter RS, Bush SP. Reports of presumptive brown recluse spider bites reinforce improbable diagnosis in region of North America where the spider is not endemic. *Clin Infect Dis* 2002;35:442-445.
- Walker DH. Ricketts creates rickettsiology, the study of vector-borne obligately intracellular bacteria. *J Infect Dis* 2004;189:938-955.
- Walton SF, et al. Crusted scabies: a molecular analysis of *Sarcoptes scabiei* variety *hominis* populations from patients with repeated infestations. *Clin Infect Dis* 1999;29: 1226-1230.
- Westenfeld F. Cutaneous myiasis caused by *Dermatobia hominis*. *Clin Microbiol Newslett* 1993;15:3.
- Williams SG, et al. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 1992;30:1758-1762.
- Wilson BB. Ectoparasites: introduction. In: Mandell CL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2258.
- Yamashita T, et al. Transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* strains among humans, wild rodents, and trombiculid mites in an area of Japan in which tsutsugamushi disease is newly endemic. *J Clin Microbiol* 1994;32:2780-2785.

Amebas de vida libre

Ecología, epidemiología, patogenia y enfermedades

Meningoencefalitis amebiana primaria
Queratitis por *Acanthamoeba*

Diagnóstico de laboratorio

Obtención y transporte de las muestras
Examen microscópico directo

Cultivo de amebas de vida libre

Cultivo de tejidos

Características morfológicas

Interpretación de la importancia de las amebas de vida libre aisladas en cultivo

Tratamiento

Las amebas pequeñas de vida libre presentes en agua y suelos de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* pueden causar infecciones oportunistas en los seres humanos. Las principales enfermedades producidas por este grupo son formas de meningoencefalitis devastantes, casi siempre mortales, y la queratitis por *Acanthamoeba*, una infección ulcerada, que puede provocar la pérdida de la vista, que afecta la córnea y el ojo, causada por ciertas especies de *Acanthamoeba*, pero no de *Naegleria*.²⁸ Las amebas de vida libre no están relacionadas con las amebas intestinales analizadas antes y no habitan el intestino del hombre ni de otros mamíferos.

Ecología, epidemiología, patogenia y enfermedades

Naegleria y *Acanthamoeba*, junto con muchos otros géneros de amebas de vida libre, tienen distribución mundial en diversos hábitats de agua dulce, como ríos, lagos, estanques, fuentes de agua termal y de agua mineral, sistemas de agua domésticos, sistemas de aire acondicionado, humidificadores y torres de refrigeración.^{18,19} Se cree que tienen relación con la neumonitis por hipersensibilidad conocida como fiebre de los humidificadores.³⁹ Son ubicuos en suelos, polvo, aire y residuos orgánicos en descomposición; se han encontrado en la superficie de verduras y se han aislado en el sedimento de aguas servidas y en agua potable contaminada con desechos domésticos o industriales. Se han aislado especies de *Acanthamoeba* en agua de mar, especialmente asociadas con la descarga de aguas servidas inadecuadamente tratadas de hoteles y vertederos municipales (D.A.

Munson: comunicación personal, 1991).¹⁹ *Naegleria* y *Acanthamoeba* también se han relacionado con vertederos con contaminación térmica en estanques y lagos conectados con plantas térmicas eléctricas, nucleares o fábricas que producen contaminación térmica.^{18,19}

En la naturaleza, las amebas de vida libre se alimentan de bacterias, como especies de *Legionella*,^{3,35,39,42} y las amebas forman quistes que son más resistentes a las condiciones adversas del medioambiente (como la desecación en suelos) que las formas vegetativas ameboides. De Jonckheere y Van de Voorde informaron que los quistes de algunas cepas de *Acanthamoeba* son muy resistentes al cloro y no mueren con las concentraciones de cloro usadas en los suministros de agua municipales o domésticos o en las piscinas de natación.²⁰ En cambio, los quistes de *Naegleria fowleri* son más sensibles al cloro; estos autores concluyeron que no es probable encontrar *N. fowleri* viable en agua limpia en la que se mantienen concentraciones bajas de cloro (p. ej., 0,5 µg de cloro libre disponible por mililitro).²⁰ Rowbotham fue el primero en señalar que *L. pneumophila* puede desarrollarse dentro de especies de *Acanthamoeba*, lo que proporciona una explicación de por qué las legionelas con requerimientos nutricionales especiales pueden mantener la viabilidad en aguas limpias, con bajo contenido de cloro.³⁹ Las especies de *Legionella* proliferan también dentro de varias otras amebas de vida libre.⁴² Se ha especulado que las legionelas pueden ser transmitidas por aerosoles a través del aire a los seres humanos en gotículas de agua mientras se encuentran dentro de amebas.³⁹ Esto tiene sentido, sobre todo si los quistes amebianos pueden proteger a las legionelas del cloro presente en los suministros domésticos de agua (véase cap. 10).

Además, las amebas de vida libre, como *Naegleria fowleri*, especies de *Hartmannella* y diversas especies de *Acanthamoeba*, se han aislado en las fauces y las vías nasales humanas,^{1,6,26,38,42,43} probablemente como quistes inhalados con el polvo suspendido en el aire, en aerosoles o que han estado presentes en los alimentos o agua ingeridos.¹⁶ No se ha demostrado la presencia de trofozoítos de *Naegleria* ni *Acanthamoeba* en la nasofaringe humana en ausencia de enfermedad del SNC.¹⁶

Meningoencefalitis amebiana primaria

Antes de 1958, ninguna ameba de vida libre del agua y la tierra se había reconocido como patógena. Más tarde, Culbertson y cols. observaron una ameba contaminante de células de cultivos de tejidos.¹⁷ Esta cepa, llamada ahora *Acanthamoeba culbertsoni* cepa A-1, cuando se instala por vía intranasal en ratones jóvenes y otros animales, causa una infección de la mucosa y la submucosa nasales que se disemina desde allí a lo largo del nervio olfatorio y a través de la lámina cribiforme del cráneo, para causar la invasión del cerebro y una meningoencefalitis rápidamente mortal.^{12,13,17} Sobre la base de su trabajo experimental con animales, Culbertson predijo que una enfermedad similar podría ocurrir en los seres humanos.^{12,15,17} En 1965, Fowler y Carter informaron el primer caso en un niño de Australia.²² El año siguiente, Butt, de Florida, informó tres casos más y denominó a la enfermedad "meningoencefalitis amebiana primaria".⁹ Así, conceptualmente, la meningoencefalitis amebiana primaria difiere de las enfermedades amebianas del SNC causadas por *Entamoeba histolytica* porque la meningoencefalitis amebiana primaria no era "secundaria" a la enfermedad amebiana del colon.

Se sabe ahora que la puerta de entrada de *Naegleria* es la nariz, y el verdadero sitio "primario" de la infección son las vías respiratorias altas.^{10,13,16} La mayoría de los pacientes con

infecciones del SNC causadas por *Naegleria* han sido niños o adultos jóvenes que estaban nadando en lagos o ríos o habían tenido la oportunidad de que les entrara agua (con *Naegleria*) en la nariz.^{3,4,29,31} Después de infectar la mucosa nasal, *N. fowleri* se disemina a lo largo del nervio olfatorio, a través de la lámina cribiforme, hasta el cerebro siguiendo la ruta original observada en los animales por Culbertson y cols.^{12,17} Los hallazgos anatomopatológicos en seres humanos con meningoencefalitis aguda causada por *N. fowleri* han sido notablemente similares a los observados en modelos experimentales en animales por Culbertson y cols. con *Acanthamoeba culbertsoni* cepa A-1 (la más virulenta de las especies de *Acanthamoeba*).^{9,10,13-16,23,28,30} Otras especies de *Acanthamoeba* no son tan virulentas y tienden a causar abscesos cerebrales subagudos o crónicos, con granulomas o sin ellos.

En los seres humanos, las enfermedades del SNC asociadas con especies de *Acanthamoeba* no han sido tan frecuentes como las producidas por *N. fowleri*. Se calcula que han ocurrido más de 140 casos de meningoencefalitis amebiana primaria en todo el mundo, en tanto que sólo se han informado 40 o más casos de infecciones del SNC por *Acanthamoeba*.²⁸ La mayoría de los pacientes con enfermedad del SNC por *Acanthamoeba* eran personas inmunodeprimidas y no tenían antecedentes de exposición al agua.^{16,28,30,31} Sin embargo, dado que los quistes de *Acanthamoeba* pueden estar en la tierra o en el polvo doméstico, es posible que los microorganismos hayan sido inhalados para alcanzar la cavidad nasal o incluso las vías respiratorias bajas.¹⁶ Es posible que, en los seres humanos, las especies de *Acanthamoeba* puedan diseminarse desde la cavidad nasal hasta el cerebro a lo largo del nervio olfatorio o por vía intravascular desde los pulmones, o tal vez desde lesiones cutáneas (informadas rara vez).^{16,31}

N. fowleri causa una meningoencefalitis difusa y fulminante, caracterizada por zonas grandes de necrosis hemorrágica, que afecta sobre todo los bulbos olfatorios, los lóbulos frontales, la base del cerebro, la médula espinal proximal y los lóbulos temporales del cerebro. También pueden estar afectados los lóbulos parietales y la corteza occipital. En las leptomeninges y dentro de la corteza se encuentra un exudado purulento agudo. Los trofozoítos amebianos pueden verse diseminados o en racimos localizados dentro de la corteza necrótica. Tienen predilección especial por los vasos sanguíneos; las arterias pequeñas, arteriolas, venas, vénulas y capilares pueden estar rodeados por trofozoítos de *Naegleria* de 10 a 15 µm, que contienen grandes nucléolos prominentes.^{13,15,31}

Dentro del cerebro, las especies de *Acanthamoeba* provocan una inflamación aguda en las etapas tempranas de la enfermedad en los animales. Sin embargo, las especies menos virulentas que *A. culbertsoni* cepa A-1 tienden a producir abscesos crónicos focalizados o multifocales, con granulomas o sin ellos (incluso con la presencia de células gigantes de cuerpo extraño). Los trofozoítos y los quistes pueden estar focalizados o esparcidos en número pequeño en todas las zonas afectadas, pero pueden encontrarse en el espacio perivascular y dentro de las paredes de los vasos pequeños, en asociación con hemorragias perivasculares y trombosis intravascular. Los quistes amebianos se ven dentro del tejido en las infecciones por *Acanthamoeba*, pero no han sido observados en tejidos infectados por *Naegleria*.^{13,15,31}

Queratitis por *Acanthamoeba*

La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección grave, a menudo devastadora, de la córnea, causada por ciertas especies

de *Acanthamoeba* (p. ej., *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhysodes*, *A. culbertsoni* y *A. hatchetti*)^{5,28,33} Desde que se describió el primer caso en 1975,²⁴ se han informado más de 200 casos en todo el mundo.²⁸ Hasta alrededor de 1984, la mayoría de las infecciones se asociaban con traumatismos de la córnea y exposición a agua contaminada; más recientemente, muchos casos se han relacionado con el uso de lentes de contacto, sobre todo lentes blandas de uso diario o continuo.^{5,11,33,41} Otros factores involucrados en la queratitis por *Acanthamoeba* son los traumatismos de la córnea y el uso de solución fisiológica casera contaminada o el uso de agua corriente para limpiar las lentes, la omisión de desinfectar las lentes adecuadamente o con la frecuencia recomendada por los fabricantes y el uso de lentes mientras se practica natación.^{8,28,41} Las acantamebas pueden encontrarse en los estuches de lentes de contacto y en las soluciones para lavarlos, y son capaces de adherirse a la superficie de las lentes.^{8,27,33,41,44} La queratitis por *Acanthamoeba* se presenta como una urgencia oftalmológica. Normalmente ocurre en los niños, sobre todo de 12 años de edad y más, pero también es común en los adultos jóvenes y menos frecuente en las personas mayores.⁴¹ La infección progresa implacablemente, con ulceración corneal y puede causar ceguera. Es difícil de diagnosticar y de tratar. La enfermedad ha sido a menudo diagnosticada erróneamente como una queratitis por herpes simple, una queratitis fúngica o bacteriana (o por micobacterias), lo que a veces produce demoras de semanas o meses antes de que se establezca el diagnóstico y se empiece el tratamiento adecuado. Se han publicado los hallazgos clínicos detallados en varias revisiones excelentes.^{27,33,37,41,44}

Diagnóstico de laboratorio

Obtención y transporte de las muestras

Cuando se sospecha una enfermedad amebiana, debe obtenerse líquido cefalorraquídeo o tejido (p. ej., biopsia de córnea, raspados de córnea, tejido del SNC) en forma aséptica y examinarlo de inmediato. Nunca deben congelarse ni refrigerarse las muestras destinadas a cultivo y deben mantenerse a 20 °C a 30 °C durante el transporte o antes de procesarlas en el laboratorio.^{3,14} Cuando el examen debió proponerse, se vio que las amebas sobrevivieron en el líquido estéril o en otros tejidos estériles durante varios días a temperatura ambiente antes de ser procesadas en el laboratorio. Si se necesita un medio de transporte para biopsias de tejido o raspados corneales, el medio esencial mínimo que se usa en los laboratorios de virología es mejor (véase cap. 23) que la solución fisiológica para amebas de Page (D. Place, F. Curtis, E. Powell y A. Newsome: comunicación personal, 1991).

Examen microscópico directo

Deben examinarse gotas pequeñas de líquido cefalorraquídeo, otros líquidos corporales o suspensiones de tejidos como preparados en fresco (en portaobjetos bajo cubreobjetos) con microscopia óptica bajo luz reducida o por microscopia de contraste de fase para ver los trofozoítos móviles (con un objetivo 40 ×). Si se mantiene la platina del microscopio calentada a 30 °C a 37 °C se puede aumentar la motilidad, sobre todo de las especies de *Acanthamoeba*.¹⁴ *Naegleria* puede ser activamente móvil a 22 °C a 25 °C, pero la motilidad de las especies de *Acanthamoeba* a temperatura ambiente es muy lenta. Estas amebas tienden a ser más activamente móviles que los leucoci-

tos, y los núcleos y nucléolos de *Naegleria* y de las especies de *Acanthamoeba* difieren de los de los granulocitos o macrófagos.

El material para teñir sobre portaobjetos debe fijarse primero en formalina al 10% en buffer neutro. Después de secar el portaobjetos al aire, pueden teñirse con una coloración tricrómica, Papanicolaou o hematoxilina y eosina.^{3,14} Los cortes de tejidos deben teñirse con hematoxilina y eosina. Otras coloraciones preferidas por algunos autores para los preparados para examen directo son el azul de algodón de lactofenol, Giemsa, naranja de acridina y blanco de calcoflúor.²⁸ Ciertos laboratorios de referencia y de investigación, como los de las CDC y del Departamento de Anatomía Patológica del Indiana University Medical Center, han creado procedimientos de inmunofluorescencia indirecta específicos o procedimientos del inmunocoaglutinación indirectos, que proporcionan una identificación inmunológica directa rápida de amebas en las muestras.^{3,28}

Cultivo de amebas de vida libre

El método de Culbertson para cultivar amebas con *Escherichia coli* en agua con agar sin sales,¹⁴ una ligera modificación del procedimiento original de Singh, ha resultado útil para cultivar líquidos corporales, suspensiones de tejidos del ojo y otras muestras. Se preparan placas de agar con 20 a 25 mL de agar al 1,5% en agua destilada (sin nutrientes ni sales agregados). Se dispersa el contenido de un ansa o una gota de una suspensión densa de *E. coli*, proveniente de un cultivo de 24 a 48 horas en placas de agar sangre, en el centro de la placa, cubriendo una superficie de 1 cm de diámetro.

Como alternativa, *E. coli* puede extenderse en forma de cruz (dos estrías de suspensión de *E. coli* que se cruzan en el medio de la placa) (C. G. Culbertson: comunicación personal, 1989). El inóculo (una gota de suspensión celular, sedimento o fragmentos de tejido) se coloca encima del centro del extendido bacteriano y la placa se sella con cinta adhesiva. Placas duplicadas se incuban a 30 °C y 37 °C o se incuba una sola placa a 34 °C a 35 °C. Después de 18 a 24 horas de incubación, la placa se mantiene sellada y se examina, con el agar hacia arriba, con un objetivo 10 ×. También puede usarse un microscopio invertido. Si no se ve ninguna ameba, la placa se incuba nuevamente y se examina a diario durante 10 días. Las amebas pueden encontrarse en racimos o aparecer como cuerpos refringentes pequeños que migran desde el inóculo, dejando a menudo senderos irregulares o huellas tortuosas detrás de ellos, donde se han desplazado a través de las bacterias.¹⁴ Pueden transferirse amebas aisladas del agar a un portaobjetos para observarlas en fresco o teñidas. Pueden hacerse subcultivos extrayendo un cilindro de agar del "frente" que contiene amebas (con un bisturí estéril), fuera de la zona que contiene bacterias, donde es más probable que las amebas no estén mezcladas con bacterias; luego se transfieren las amebas a otra placa de agar con *E. coli* (el agregado de anfotericina B a una concentración final de 2,5 mg/mL en el agar ayuda a reducir la contaminación fúngica) (E. Powell: comunicación personal, 1991). De allí, las amebas se transfieren a un medio líquido (p. ej., caldo de tripticasa soja) con antibióticos (p. ej., penicilina 1 000 µg/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL, concentración final).

Después de que las amebas están libre de bacterias (axénicas), pueden transferirse al caldo tripticasa soja sin antibióticos, que se usa como medio de desarrollo.^{3,14} *Naegleria* no se desarrolla en caldo tripticasa soja, a menos que contenga 10% de suero fetal bovino estéril. El desarrollo de las amebas en ese caldo se mejora usando tubos para cultivo de tejido de plástico,

para que las amebas se adhieran al tubo.^{3,14} Los cultivos se incuban en posición casi horizontal a 35 °C en un ángulo de 15° a 20°, en forma similar a lo que se hace a menudo con los cultivos celulares en los laboratorios de virología. No todas las amebas se desarrollan en caldo tripticosa soja. Los medios de cultivo alternativos son el Plate Count Broth® (Difco Laboratories, Detroit, MI) y los cados recomendados en el catálogo de la American Type Culture Collection (www.atcc.org), que son el medio para *Acanthamoeba*, el medio PYNFH® y el medio Fresh Water Amoeba® (E. Powell: comunicación personal, 1991). Neroad y cols.³⁴ también describieron un medio químicamente definido por cultivar especies de *Naegleria* patógenas y tolerantes a temperaturas altas.

Cultivo de tejidos

Las amebas de vida libre más virulentas (p ej., *A. culbertsoni* cepa A-1) se desarrollan en cultivos celulares de mamíferos, como riñón de mono, células de McCoy y otros, y pueden causar un efecto citopatogénico (ECP) similar al que se ve con los virus.^{17,43} Las amebas menos virulentas se desarrollan poco en cultivo de tejidos (celulares), sin producir ACP. Las amebas pueden ser extremadamente difíciles de visualizar cuando se desarrollan con las células de cultivo de tejidos; debe extraerse el líquido de un tubo o frasco de cultivo, centrifugarse a 500 a 800 g (durante 5 minutos) o puede hacerse un preparado con un Cytospin® y usar el sedimento para hacer un preparado en fresco, que se examina con microscopio óptico o de contraste de fase, con poca iluminación. Como alternativa, el preparado puede secarse, fijarse en formalina y teñirse con H-E para observar las características amebianas.³ Una vez aisladas en cultivo de tejidos, las cepas pueden transferirse a caldo o a agua con agar y *E. coli* (como se describe en la sección anterior).

Características morfológicas

Cuando adoptan forma redondeada, los trofozoítos de *Naegleria* miden de 8 a 15 µm y son casi siempre más pequeños que los de las especies de *Acanthamoeba*, que por lo general tienen 10 a 25 µm de diámetro.^{2,4} Los núcleos de ambos géneros son similares y contienen grandes nucléolos muy prominentes. *Naegleria* tiene uno o más pseudópodos lisos lobulados y es activamente móvil a temperatura ambiente o a 35 °C a 37 °C. Las especies de *Acanthamoeba* son muy lentas a 22 °C a 25 °C, pero pueden ponerse más activas a 35 °C y 37 °C. *Acanthamoebae* tiene numerosos pseudópodos espinosos en la superficie, llamados acantópodos. Las especies de *Naegleria* se caracterizan por tener una fase temporal de formas amebioflageladas cuando se colocan los trofozoítos de *Naegleria* en agua destilada, pueden volverse piriformes y activamente móviles, con dos o más flagelos (en el lapso de 1 a 3 horas). Los quistes de *Acanthamoeba* tienen paredes más gruesas que los de *Naegleria* y un aspecto peculiar que ayuda a la identificación de las especies.³⁶ Además, las especies de *Naegleria* producen una forma distintiva de mitosis (promitosis) en la que la membrana nuclear permanece intacta.³⁶ En cambio, *Acanthamoeba* produce un tipo más clásico de mitosis (metamitosis) en la que el nucléolo y la membrana nuclear desaparecen y el huso mitótico aparece con los cromosomas en metafase.^{14,36,54,194} Para obtener una información descriptiva más detallada, los lectores pueden consultar las referencias^{3,14,16,25,28,36}.

La identificación de *Naegleria* y *Acanthamoeba* más allá del género no sólo requiere un estudio morfológico detallado, sino también el uso de otros procedimientos, como pruebas con

reactivos inmunológicos específicos de especie (p. ej., inmunofluorescencia, coaglutinación) y pruebas de patogenicidad (en ratones). Esa identificación puede ser útil en una investigación epidemiológica o para proyectos de investigación, pero su valor práctico en el laboratorio clínico como ayuda a los médicos para el tratamiento de pacientes no se ha demostrado. Mirando hacia el futuro, Flores y cols. describieron el uso de anticuerpos monoclonales específicos y aplicaciones de la citometría de flujo como apoyo para diferenciar *Naegleria fowleri* de las especies de *Acanthamoeba*; también se cuenta con sondas experimentales de ácidos nucleicos para efectuar esta diferenciación (véase cap. 1).²¹

Interpretación de la importancia de las amebas de vida libre aisladas en cultivo

Como las amebas de vida libre son ubicuas en el agua, la tierra, el polvo y el aire, es posible que los quistes, transportados por el aire, puedan contaminar la superficie de un raspado de córnea, una biopsia de tejidos o muestras líquidas mientras se obtiene la muestra, cuando se procesa, durante la inspección de placas primarias para ver si hay desarrollo o después de la incubación prolongada. Las amebas también podrían estar en la piel, en el borde de los párpados o en el saco conjuntival sin causar queratitis, aunque esto no se ha demostrado. Por eso, como lo han subrayado Allen y Culbertson, el personal no debe aceptar los cultivos positivos de amebas por sí mismos como prueba clínicamente significativa con respecto a la causa de la enfermedad, a menos que puedan demostrarse trofozoítos en el examen microscópico directo de la muestra o puedan verse por microscopía dentro del tejido en el examen histopatológico.³

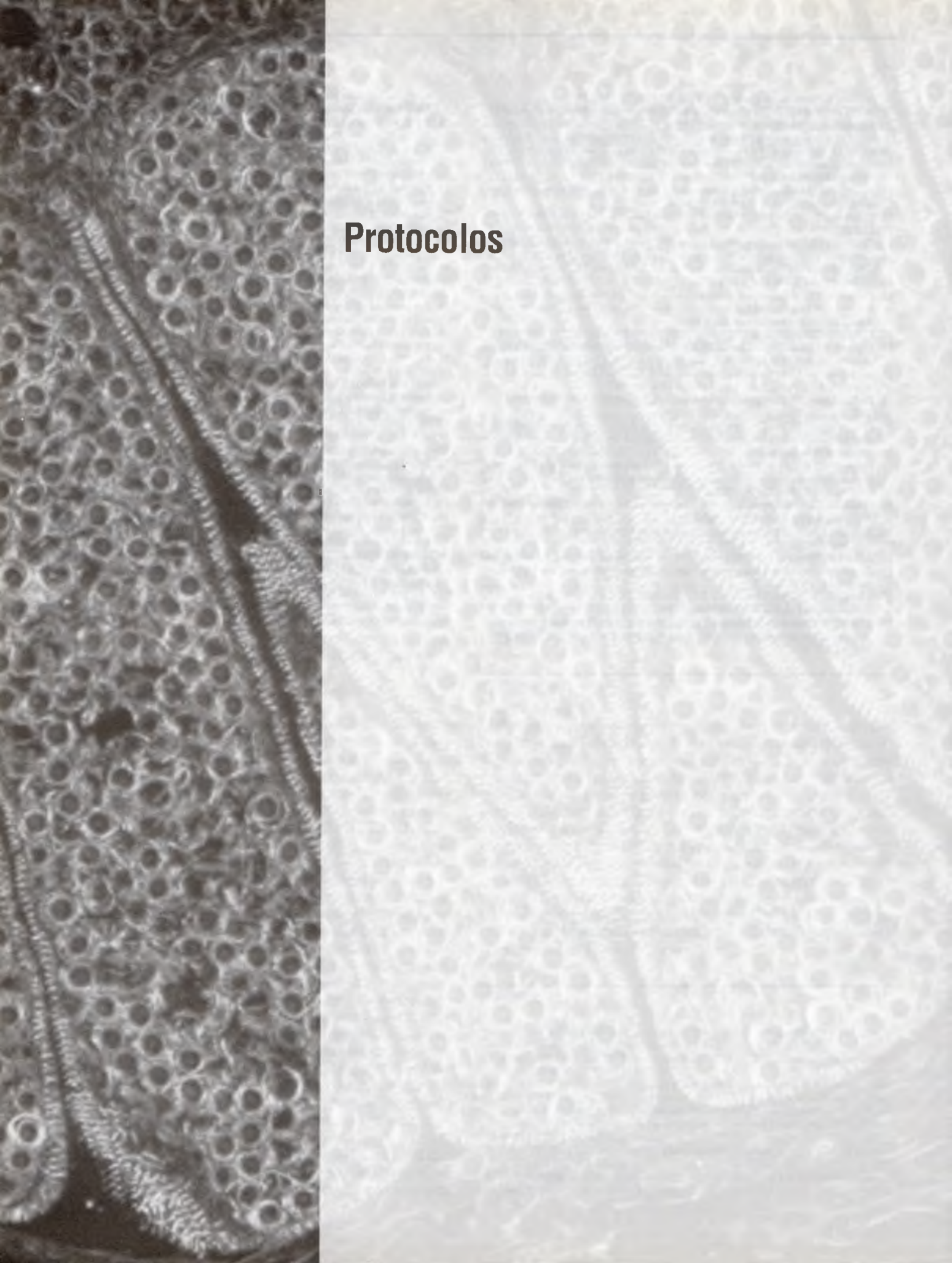
Tratamiento

Por lo menos dos pacientes con meningoencefalitis por *Naegleria* han sobrevivido. Ambos recibieron anfotericina B. Uno de los pacientes, además de anfotericina B, recibió miconazol, rifampicina y sulfasoxazol.^{3,7,37,40} No se ha establecido el tratamiento de elección para la enfermedad del SNC causada por *Acanthamoeba*, ya que la mayoría de los casos se han diagnosticado en la autopsia. Sin embargo, Culbertson y cols. observaron que la sulfadiazina era muy activa in vivo contra algunas cepas de *Acanthamoeba* en modelos animales.^{3,16} El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* ha tenido éxito en varios pacientes usando un protocolo intensivo que consiste en isetionato de propamida tópico (gotas Brolene®) y gotas de sulfato de neomicina-sulfato de polimixina B-gramicidina (Neosporin Ophthalmic Solution®).^{32,33,37,45}

REFERENCIAS

1. Ahrilham SN, Lawande RV. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population of Zaria, Nigeria. *J Trop Med Hyg* 1982;85:217-222.
2. Adams EB, MacLaud IN. Invasive amebiasis: II. Amebic liver abscess and its complication. *Medicine* 1977;56:325-334.
3. Allen SD, Culbertson CG. *Naegleria* and *Acanthamoeba*. In: Feigin R, Cherry J (eds) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992.
4. Arrowood MJ, Sterling CR. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J Clin Microbiol* 1989;27:1490-1495.
5. Auran JD, Starr MB, Jakobić FA. *Acanthamoeba* keratitis: A review of the literature. *Cornea* 1987;6:2-26.
6. Badenoch PR, Grimmond TR, Cadwgan J, et al. Nasal carriage of free-living amoebae. *Microb Ecol Health Dis* 1988;1:209-211.

7. Blackett K. Amoebic pericarditis. *Int J Cardiol* 1988;21:183-187.
8. Brandt FH, Ware DA, Visvesvara GS. Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:1144-1146.
9. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* 1966;274:1473-1476.
10. Carter RF. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 1970;100:217-244.
11. Centers for Disease Control: *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses—United States. *MMWR* 1986;35:405-408.
12. Culbertson CG. Pathogenic *Acanthamoeba* (*Hartmannella*). *Am J Clin Pathol* 1961;35:195-202.
13. Culbertson CG. The pathogenicity of soil amebas. *Ann Rev Microbiol* 1971;25:231-254.
14. Culbertson CG. Soil amoeba infection. In: Lennette EH, Spaulding EH, Truant JP (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd Ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1974.
15. Culbertson CG. Amebic meningoencephalitis. In: Binford CH, Connoe DH (eds.). *Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases, An Atlas*, Vol. 1. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1976.
16. Culbertson CG. Amebic meningoencephalitis. *Antibiot Chemother* 1981;30:28-53.
17. Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science* 1958;127:1506.
18. De Jonckheere JF. Epidemiology. In: Rondanelli EG (ed.). *Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Padua, Italy: Piccin Nuova Libreria, 1987.
19. De Jonckheere JF. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991;13(suppl 5):S385-S387.
20. De Jonckheere JF, Van De Vorde H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1976;31:294-297.
21. Flores BM, Garcia CA, Stamm WE, Torian BE. Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1990;28:1999-2005.
22. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: A preliminary report. *Br Med J* 1965;2:740-742.
23. John DT. Primary amoebic meningoencephalitis and the histology of *Naegleria fowleri*. *Ann Rev Microbiol* 1982;36:101-123.
24. Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975;95:221-232.
25. Kilvington S, Larkin DFP, White DG, Beeching JR. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2722-2725.
26. Lawande RV, Abraham SN, John I, Egler LJ. Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria. *Am J Clin Pathol* 1979;71:201-203.
27. Lindquist TD, Sher NA, Doughman DJ. Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* keratitis. *Arch Ophthalmol* 1988;106:73-77.
28. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, et al. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infection: Review. *Rev Infect Dis* 1990;12:490-513.
29. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 1988;52:114-133.
30. Martinez AJ. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection? *Neurology* 1980;30:567-574.
31. Martinez AJ. Free-Living Ameba: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985.
32. Moore MB. Parasitic infections. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, et al. (eds.). *The Cornea*. New York: Churchill Livingstone, 1988.
33. Moore MB, McCulley JP. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses: Six consecutive cases of successful management. *Br J Ophthalmol* 1989;73:271-275.
34. Neroad TA, Visvesvara GS, Daggett PM. Chemically defined media for the cultivation of *Naegleria*: Pathogenic and high temperature tolerant species. *J Protozool* 1983;30:383-387.
35. Newsome AL, Baker RL, Miller RD, et al. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1985;50:449-452.
36. Page FC. A New Key to Freshwater and Soil *Gymnamoebae*. Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, The Ferry House, 1988.
37. Petri WA Jr., Rardin JJ. Free-living amebae. In: Mandell GL, Douglas RG Jr., Bennett JE (eds.). *Principles and Practices of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990.
38. Rivera F, Rosas I, Castillo M, et al. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environmental Research* 1986;39:364-371.
39. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for fresh water and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980;33:1179-1183.
40. Seidel JS, Harmatz P, Visvesvara GS, et al. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* 1982;306:346-348.
41. Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989;107:221-336.
42. Wadowsky RM, Butler LJ, Cook MK, et al. Growth-suppressing activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of Hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2677-2682.
43. Wang SS, Feldman HA. Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *N Engl J Med* 1967;277:1174-1179.
44. Wilhelmus KR, Jones DB (eds.). International symposium on *Acanthamoeba* and the eye. *Rev Infect Dis* 1991;13(suppl 5):S450.
45. Wright P, Warhurst D, Jones BR. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *Br J Ophthalmol* 1985;69:778-782.



Protocolos

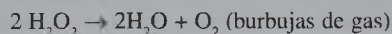
PROTOCOLO 1-1

CATALASA

I. Principio

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Químicamente, es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, salvo porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en estado oxidado (Fe^{++}) en lugar de en estado reducido (Fe^{2+}). Excepto los estreptococos, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:



La prueba de la catalasa se usa con mucha frecuencia para diferenciar los miembros de la familia *Micrococcaceae* de los miembros de la familia *Streptococcaceae*.

II. Reactivos

- A. Peróxido de hidrógeno al 3% almacenado en frascos color caramelo, en frío.
- B. Un cultivo de 18 a 24 horas del microorganismo por probar.

III. Control de calidad

El reactivo peróxido de hidrógeno se debe probar con microorganismos control negativos y positivos, todos los días o inmediatamente antes de probar bacterias desconocidas.

- A. Control positivo: *Staphylococcus aureus*.
- B. Control negativo: especies de *Streptococcus*.

IV. Procedimiento

1. Con una aguja de inoculación o con un palillo de madera, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos de vidrio.
2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

V. Resultados

A. Interpretación

La aparición rápida y sostenida de burbujas o de efervescencia constituye una reacción positiva. Como algunas bacterias tienen enzimas distintas de la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la formación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo. Además, los eritrocitos tienen catalasa, por lo cual debe tenerse cuidado de no tomarlos junto con el material de la colonia.

PROTOCOLO 1-2

PRUEBA DE LA SOLUBILIDAD EN BILIS

I. Principio

Las sales biliares, específicamente el desoxicolato de sodio y el taurocolato de sodio, tienen la propiedad de lisar selectivamente a *Streptococcus pneumoniae* cuando se agregan a las bacterias en fase de crecimiento activo agar o caldo. *S. pneumoniae* produce enzimas autolíticas (autolisinas) responsables de la depresión central o umbilicación característica de las colonias viejas de neumococos en agar. El agregado de sales biliares activa las autolisinas y acelera la reacción lítica natural observada en los cultivos de neumococos.

La prueba de solubilidad en bilis se puede realizar con un cultivo líquido del microorganismo o con colonias que se desarrollan en agar. Si el microorganismo es soluble, la turbidez de un cultivo en caldo se aclara visiblemente cuando se agregan sales biliares. En agar, las colonias solubles en bilis "desaparecen" cuando se colocan gotas del reactivo sobre ellas. Debido a que el desoxicolato de sodio puede precipitar a pH 6.5 o menor, el cultivo en caldo utilizado debe ajustarse a pH 7 para evitar las reacciones falsas negativas.

II. Medios y reactivos

1. Un cultivo puro del microorganismo por probar desarrollado a 35 °C durante 18 a 24 horas en caldo de Todd-Hewitt (o similar).
2. Placa de agar sangre de carnero.
3. Desoxicolato de sodio (al 10% para la prueba en tubo, al 2% para la prueba en placa).
4. Solución de rojo fenol (1% en agua).
5. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,10 N.

III. Control de calidad

- A. Control positivo (soluble en bilis): *Streptococcus pneumoniae*.
- B. Control negativo (insoluble en bilis): estreptococos del grupo viridans.

PROTOCOLO 1-2

PRUEBA DE LA SOLUBILIDAD EN BILIS (cont.)

IV. Procedimiento

A. Prueba en caldo

1. Transferir aproximadamente 0,5 mL de un cultivo en caldo de 18 a 24 horas a dos tubos de ensayo limpios. Alternativamente puede prepararse una suspensión del microorganismo en solución salina tamponada con fosfato (buffer fosfato) a pH 7,0, a partir del desarrollo en agar. Si se hace esto último, no es necesario corregir el pH.
2. Agregar una gota de indicador de rojo fenol a cada tubo.
3. Agregar NaOH 0,10 N para corregir el pH a 7 (el indicador vira a un color rosa pálido).
4. Agregar 0,5 mL de desoxicolato de sodio al 10% a uno de los tubos (marcado "prueba").
5. Agregar 0,5 mL de solución fisiológica estéril al otro tubo (marcado "control").
6. Agitar con suavidad ambos tubos y colocarlos en estufa de incubación o baño María a 35 °C durante 3 horas, observando cada hora.

B. Prueba en placa

1. Colocar una gota de desoxicolato de sodio al 2% sobre unas pocas colonias bien aisladas del microorganismo por probar desarrollado sobre agar sangre de carnero.
2. Sin invertir la placa, colocarla en una estufa de incubación a 35°C durante 30 minutos.

V. Resultados

A. Interpretación

1. Prueba en caldo

Soluble en bilis (reacción positiva): hay un aclaramiento visible de la suspensión del tubo que contiene desoxicolato de sodio, sin cambios en la suspensión control con solución fisiológica.

Insoluble en bilis (reacción negativa): no hay cambios en la turbidez de la suspensión del tubo que contiene desoxicolato de sodio, en comparación con la suspensión control en solución fisiológica.

2. Prueba en placa

Soluble en bilis (reacción positiva): las colonias sobre las cuales se ha colocado el reactivo desaparecen y dejan una zona parcialmente hemolizada en el lugar donde estaban.

Insoluble en bilis (reacción negativa): las colonias sobre las cuales se ha colocado el reactivo permanecen intactas y visibles.

VI. Limitaciones de la prueba

Sólo el 86% de las cepas de neumococos se lisan por completo y puede ser necesaria una prueba adicional (p. ej., pruebas de hinchazón capsular de Neufeld [Quellung]) para las cepas restantes, que se lisan en forma incompleta.

PROTOCOLO 1-3

PRUEBA DE LA COAGULASA EN PORTAOBJETOS

I. Principio

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida, que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Como resultado se forma un coágulo visible. Se piensa que in vivo la coagulasa produce una barrera de fibrina en el sitio de la infección estafilocócica. Esta enzima probablemente desempeña cierto papel en el confinamiento local de abscesos (p. ej., carbunclos y furúnculos). En el laboratorio, la prueba de la coagulasa se utiliza para identificar *Staphylococcus aureus* y diferenciarlo de la mayoría de las otras especies de estafilococos.

La coagulasa existe en dos formas: libre y unida; cada una tiene diferentes propiedades que requieren el uso de distintos procedimientos de ensayo.

Coagulasa unida (prueba en portaobjetos): la coagulasa ligada (unida), también conocida como factor de aglutinación, se encuentra unida a la pared celular bacteriana y no en los filtrados de cultivos. Entre las células bacterianas se forman bandas de fibrina cuando se suspenden en plasma (fibrinógeno), que hacen que las bacterias se agrupen formando grumos visibles.

Coagulasa libre (prueba en tubo): la coagulasa libre es una sustancia similar a la trombina presente en filtrados de cultivos. Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa, se forma un coágulo visible como resultado de la reacción de la coagulasa con una sustancia del suero (factor de reacción con la coagulasa), para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

II. Medios y reactivos

Plasma de conejo con EDTA (en el comercio se obtiene en forma liofilizada). El plasma reconstituido debe refrigerarse.

III. Control de calidad

La coagulabilidad del plasma puede comprobarse agregando una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 mL del plasma reconstituido. Debe formarse un coágulo en el término de 10 a 15 segundos. Una cepa conocida de *Staphylococcus aureus* y una de *S. epidermidis*

PROTOCOLO 1-3

PRUEBA DE LA COAGULASA EN PORTAOBJETOS (cont.)

pueden servir de control positivo y negativo, respectivamente. Cada frasco de plasma de conejo con EDTA reconstituido debe probarse con cultivos de 18 a 24 horas de las cepas control.

IV. Procedimiento

1. *Prueba en portaobjetos* (coagulasa unida): colocar dos gotas de agua o solución fisiológica estériles dentro de dos círculos dibujados con un lápiz de cera en un portaobjetos de vidrio. Emulsificar suavemente material de colonias del microorganismo por identificar en el líquido que se encuentra dentro de cada uno de los círculos. Agregar una gota de plasma para la prueba de la coagulasa a la suspensión en uno de los círculos y mezclar con un palillo de madera. Colocar otra gota de agua o solución fisiológica en el otro círculo, como control. Rotar el portaobjetos hacia adelante y atrás, buscando aglutinación en la suspensión de prueba.
2. *Prueba en tubo* (coagulasa libre): emulsificar una pequeña cantidad de la colonia del microorganismo en un tubo que contenga 0.5 mL de plasma para la prueba de la coagulasa. Incubar el tubo a 35 °C durante 4 horas y observar si se forma un coágulo inclinando suavemente el tubo. Si en ese momento no se observan coágulos, reincubar el tubo a temperatura ambiente y leer otra vez después de 18 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

1. *Prueba en portaobjetos*: una reacción positiva se detectará dentro de los 10 a 15 segundos de mezclar el plasma con la suspensión por la formación de un precipitado blanco y la aglutinación de los microorganismos de la suspensión. La prueba se considera negativa si no se observa aglutinación en el término de 2 minutos. El control con solución fisiológica debe permanecer uniforme y lechoso. Si la suspensión control también se aglutina, la prueba no puede leerse. Todas las cepas coagulasa positivas pueden informarse como *Staphylococcus coagulasa* positivo o, con menor precisión, como *Staphylococcus aureus*. Todas las cepas que producen pruebas negativas en portaobjetos deben ser probadas mediante la prueba en tubo.
2. *Prueba en tubo*: la prueba de la coagulasa en tubo se considera positiva si se detecta cualquier grado de formación de coágulos. El tubo debe inclinarse con suavidad y no agitarse, ya que la agitación puede deshacer los coágulos parcialmente formados. Las fibrinolisinias producidas por los microorganismos también pueden disolver los coágulos poco después de su formación. Los tubos que son negativos después de 4 horas deben incubarse a temperatura ambiente durante la noche y leerse después de 18 horas.

PROTOCOLO 1-4

PRUEBA DEL INDOL

I. Principio

El indol, un bencilpirrol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano, con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, de particular utilidad en la diferenciación de *Escherichia coli* (positiva) de los miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (la mayoría negativas).

La prueba del indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del *p*-dimetilaminobenzaldehído. Este es el producto químico activo de los reactivos de Kovac y de Ehrlich. Debe utilizarse un medio rico en triptófano. En la práctica se utilizan medios combinados, como el medio de sulfuro indol para motilidad (SIM), el medio para motilidad indol ornitina (MIO) o el medio indol nitrato. Las pruebas rápidas en mancha, utilizando tiras de papel de filtro impregnadas con el reactivo *p*-dimetilaminocinnamalaldehído, son útiles para la detección sistemática de bacterias que producen indol con rapidez.

II. Medios y reactivos

A. Caldo triptófano (triptófano al 1%)

Peptona o digerido pancreático de caseína (tripticasa)	2 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Agua destilada	100 mL

B. Reactivo de Kovac

Alcohol amílico o isoamílico puro	150 mL
<i>p</i>-dimetilaminobenzaldehído	10 g
HCl concentrado	50 mL

PROTOCOLO 1-4

PRUEBA DEL INDOL (cont.)

B. Reactivo de Ehrlich

p-dimetilaminobenzaldehído	2 g
Alcohol etílico absoluto	190 mL
HCl concentrado	40 mL

III. Control de calidad

Cada lote nuevo de medios o de reactivos debe ensayarse con pruebas negativas y positivas para indol. Los siguientes microorganismos son útiles como controles:

A. Control positivo: *Escherichia coli*.

B. Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*.

IV. Procedimiento

Sembrar el caldo triptófano (u otros medios apropiados para indol) con el microorganismo por probar e incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, agregar 15 gotas del reactivo haciendo que se deslicen por la pared del tubo. Si se utiliza el reactivo de Ehrlich, este paso debe ser precedido por el agregado de 1 mL de xilol. Esto no es necesario con el reactivo de Kovac.

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de un color rojo fucsia brillante en la interfaz del reactivo y del medio líquido (o de la capa de xilol) segundos después de agregar el reactivo indica la presencia de indol y constituye una prueba positiva (véanse láminas en color 6-4C y 7-2C).

VI. Bibliografía

Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:63-67.

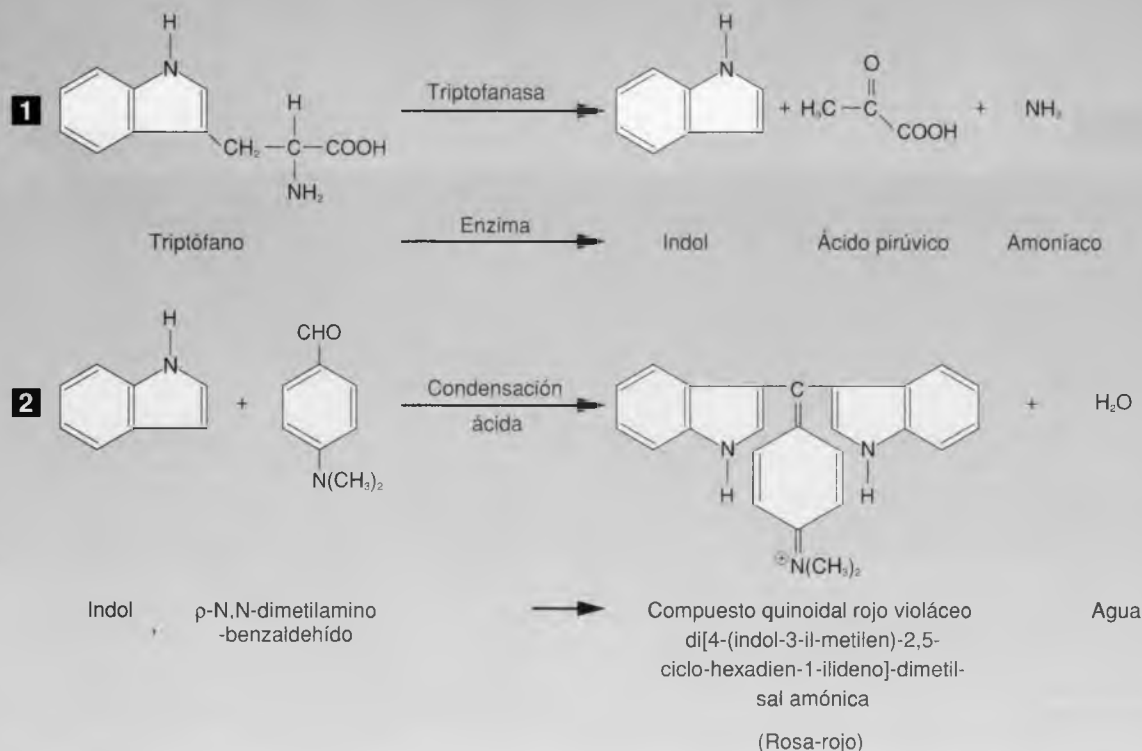
Isenberg HD, Sundheim LH. Indole reactions in bacteria. J Bacteriol 1958;75:682-690.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:173-183.

Miller JM, Wright JW. Spot indole test: Evaluation of four reagents. J Clin Microbiol 1982;15:589-592.

Vracko R, Sherries JC. Indole-spot test in bacteriology. Am J Clin Pathol 1963;39:429-432.

MECANISMO DE LA REACCIÓN DEL INDOL



PROTOCOLO 1-5

PRUEBA DE LA CITOCROMO OXIDASA

I. Principio

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como último eslabón de la cadena de respiración aerobia, transfiriendo electrones (hidrógeno) al oxígeno, con la formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios facultativos, de modo que la prueba de la oxidasa es importante para identificar a los microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba tiene su mayor utilidad para diferenciar colonias sospechosas de pertenecer a alguna de las *Enterobacteriaceae* (todas negativas) y para identificar las sospechosas de pertenecer a otros géneros como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* y *Pasteurella* (positivas).

La prueba de citocromo oxidasa utiliza ciertos colorantes reactivos, como el dihidrocloruro de *p*-fenilendiamina, que sustituye al oxígeno como aceptador artificial de electrones. En estado reducido, el colorante es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromo oxidasa y de oxígeno atmosférico la *p*-fenilendiamina se oxida y forma azul de indofenol.

II. Medios y reactivos

A. Diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (reactivo de Kovacs).

B. Diclorhidrato de dimetil-*p*-fenilendiamina al 1% (reactivo de Gordon y McLeod).

III. Control de calidad

Deben probarse especies bacterianas que muestran reacciones positivas y negativas como control a intervalos frecuentes. Se sugieren las siguientes:

A. Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Control negativo: *Escherichia coli*.

IV. Procedimiento

La prueba suele realizarse por uno de dos métodos: 1) la técnica directa en placa, en la cual se añaden dos a tres gotas de reactivo directamente sobre colonias aisladas desarrolladas en agar, y 2) el procedimiento indirecto con tiras de papel, en el cual se añaden unas gotas de reactivo a una tira de papel de filtro o se utilizan tiras o discos comerciales impregnados con reactivo desecado. Se recomienda el derivado tetrametilo de la *p*-fenilendiamina, debido a que el reactivo es más estable y más sensible para la detección de citocromo oxidasa y menos tóxico que el derivado dimetilo. Con cualquiera de los métodos, una colonia sospechosa se dispersa con el ansa sobre la zona reactiva del papel.

V. Resultados

A. Interpretación

Las colonias bacterianas que tienen actividad de citocromo oxidasa desarrollan un color azul oscuro en el sitio de inoculación en el término de 10 segundos (lámina en color 6-1G). Cualquier microorganismo que produzca color azul entre los 10 y 60 segundos debe ser probado nuevamente, ya que es probable que no pertenezca a las *Enterobacteriaceae*. Para esta prueba no deben utilizarse ansas de acero inoxidable o níquel-cromo, porque los productos de oxidación superficiales producidos, cuando se esterilizan en llama, pueden provocar reacciones falsas positivas.

VI. Bibliografía

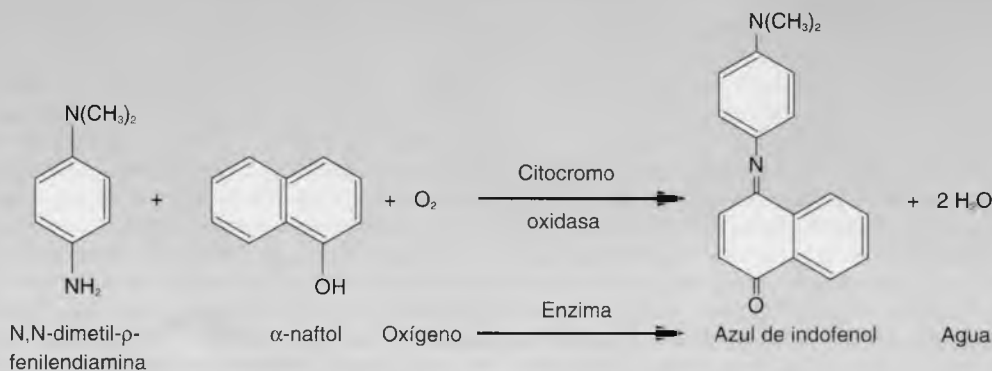
Gordon J. McLeod JW. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J Pathol Bacteriol 1928;31:185-190.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:249-260.

Steel KJ. The oxidase reaction as a taxonomic tool. J Gen Microbiol 1961;25:297-306.

Weaver DK, Lee EKH, Leahy MS. Comparison of reagent impregnated paper strips and conventional methods for identification of *Enterobacteriaceae*. Am J Clin Pathol 1968;49:494-499.

MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LA CITOCROMO OXIDASA



PROTOCOLO 1-6

PRUEBA PYR

I. Principio

La prueba PYR fue descrita por primera vez por Facklam y cols. en 1982 y desde entonces ha ganado aceptación como prueba rápida para la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A y de los enterococos. Si bien la prueba original fue descrita como una prueba en agar de 16 a 20 horas de duración, los formatos posteriores incluyeron un ensayo en caldo de 4 horas de duración y varias pruebas rápidas (de 10 a 15 minutos), en las cuales el reactivo PYR se impregna en discos o tiras de papel de filtro que se siembran con el material en estudio. La prueba PYR también es parte integrante de varios de los equipos comerciales para identificación de estreptococos y de bacterias similares a estreptococos. Este protocolo describe la prueba PYR de 4 horas en caldo. Los discos impregnados con el sustrato PYR también pueden usarse para una prueba aún más rápida.

El sustrato utilizado para la prueba PYR es la L-pirrolidonil- β -naftilamida. Este compuesto es hidrolizado por una aminopeptidasa específica bacteriana. La hidrólisis del sustrato por esta enzima libera β -naftilamida libre, que se detecta por el agregado de *N,N*-dimetilaminocinnamaldehído. Este reactivo de detección se une a la naftilamida para formar una base de Schiff roja.

II. Medios y reactivos

1. Caldo PYR (caldo Todd-Hewitt con 0,01% de L-pirrolidonil- β -naftilamida) fraccionado en tubos estériles, en volúmenes de 0,20 mL.
2. Reactivo PYR (*p*-dimetilaminocinnamaldehído al 0,01%).

III. Control de calidad

- A. Control positivo: *Enterococcus faecalis* o *Streptococcus pyogenes*.
- B. Control negativo: *Streptococcus agalactiae*.

IV. Procedimiento

1. Con un ansa bacteriológica estéril, tomar dos o tres colonias morfológicamente similares y emulsificarlas en un pequeño volumen de caldo PYR.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 4 horas.
3. Agregar una gota del reactivo PYR y observar el cambio de color. La reacción debe leerse y registrarse un minuto después del agregado del reactivo.

V. Resultados

A. Interpretación

1. Positivo: desarrollo de un color rojo cereza oscuro dentro del minuto del agregado del reactivo.
2. Negativo: color amarillo o naranja.

VI. Notas acerca del procedimiento

Antes de hacer la prueba PYR es esencial que se compruebe que el microorganismo es un estreptococo (cocos grampositivos, catalasa negativos). Otros microorganismos (p. ej., algunos aerococos, estafilococos, variantes nutricionales de estreptococos, *Arcanobacterium haemolyticum*) también pueden ser PYR positivos.

PROTOCOLO 3-1

PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC)

I. Principio

La prueba de fijación del complemento es una de las principales reacciones tradicionales utilizadas para la detección de antígenos infecciosos y anticuerpos. Requiere un verdadero zoológico de reactivos y numerosos pasos preparatorios. Existen casi tantas versiones como usuarios; la versión en placas de microtitulación desarrollada en los Centers for Disease Control and Prevention (prueba LBCF) incluye controles rigurosos y es la que se emplea habitualmente. La reacción de FC no depende de la actividad hemaglutinante de los virus, sino que los anticuerpos deben fijar complemento y los sueros deben estar libres de actividad anticomplementaria. La prueba ha sido superada, en muchos casos, por otras más modernas, como los enzoinmunoanálisis (EIA).

Los componentes terminales de la cascada del complemento, C7, C8 y C9 (el complejo de ataque a la membrana), pueden dañar las membranas celulares en presencia de anticuerpos específicos, que fijan el complemento a la superficie de las células. En la reacción de FC se utilizan eritrocitos como célula diana porque el aumento de permeabilidad de la membrana inducida por el complemento se puede visualizar o medir colorimétricamente como un aumento de la hemoglobina libre. En presencia de anticuerpos específicos contra un agente infeccioso, se fija todo el complemento presente en el sistema, sin dejar complemento libre para reaccionar con los anticuerpos dirigidos contra los eritrocitos indicadores. Así, la ausencia de hemólisis indica la presencia de anticuerpos específicos.

PROTOCOLO 3-1

PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (*cont.*)

II. Materiales y reactivos

Suspensión de eritrocitos de carnero.

Hemolisina (anticuerpos de conejo antieritrocito de carnero).

Complemento de cobayo, libre de anticuerpos contra el agente en estudio.

Diluyente buffer de barbital.

Placa plástica de microtitulación.

Adaptador para centrífuga para las placas de microtitulación.

Baño María para incubar las placas.

Estándares de color para evaluar la hemólisis (se preparan lisando diferentes concentraciones de eritrocitos).

III. Control de calidad

Anticuerpos o antígenos positivos conocidos.

Anticuerpos o antígenos negativos conocidos.

Control de suero sin antígeno (para detectar actividad anticomplementaria).

Control de antígenos sin suero (para detectar actividad anticomplementaria).

Control de tejido (el tejido o células en los que se preparó el antígeno).

Control de buffer sin antígeno ni anticuerpos.

Titulación de complemento para demostrar que se están utilizando 5 unidades CH_{50} .

Control de células para demostrar ausencia de hemólisis.

Estándares de hemólisis de referencia.

IV. Procedimiento

1. *Sensibilización de eritrocitos*

Se incuban diluciones seriadas de hemolisina con una suspensión de eritrocitos de carnero al 2,8% en buffer barbital. A medida que aumenta la concentración de hemolisina, el porcentaje de hemólisis se incrementa hasta alcanzar una meseta. Para la prueba se utiliza la concentración de hemolisina que representa el segundo punto de la meseta.

2. *Titulación del complemento*

Se incuban cantidades variables de una dilución 1:400 de complemento de cobayo reconstituido, en frío, con células sensibilizadas. El volumen de complemento que produce el 50% de hemólisis (unidad CH_{50}) se calcula a partir de la representación gráfica de los resultados de la hemólisis. El lote de complemento puede fraccionarse y conservarse a $-70^{\circ}C$, pero antes de ser utilizado en la prueba debe demostrarse que su reactividad es adecuada.

3. *Reacción de fijación del complemento*

Se realiza una titulación de diluciones seriadas de antígeno y anticuerpo en presencia de 5 CH_{50} de complemento, a $4^{\circ}C$, durante 18 horas. El suero se calienta a $56^{\circ}C$ durante 30 minutos para inactivar el complemento endógeno. Deben conocerse las características del antígeno o del anticuerpo; las diluciones seriadas del elemento conocido pueden reducirse, incluida la dilución siguiente y anterior a la concentración óptima esperada. Después se agregan eritrocitos de carnero sensibilizados con la dilución óptima de hemolisina y la reacción se incuba a $37^{\circ}C$ durante 30 minutos. Las placas se centrifugan a baja velocidad para sedimentar los eritrocitos no lisados.

V. Resultados

A. Interpretación

El punto final es la mayor dilución de antígeno o anticuerpo que produce una fijación de complemento 3+ o 4+ ($< 30\%$ de hemólisis). Todos los reactivos deben estar desprovistos de actividad anticomplementaria, se debe agregar la cantidad correcta de complemento y las muestras control deben reaccionar como corresponde.

VI. Bibliografía

Hsiung GD. Diagnostic Virology, 3ª ed. New Haven, CT: Yale University Press, 1982.

Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. Atlanta: Public Health Service, 1965. Publicación 1228 (Public Health Monograph 74).

PROTOCOLO 3-2

PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IHA)

I. Principio

Los ácidos nucleicos de muchos virus codifican proteínas de superficie que aglutinan eritrocitos de varias especies. El fenómeno se emplea con mucha frecuencia para el diagnóstico de las infecciones causadas por ortomixovirus, paramixovirus y los arbovirus-toga-virus (incluido el virus de la rubéola), flavivirus y bunyavirus. La presencia del virus en cultivos celulares infectados puede detectarse por hemaglutinación: la identidad del virus o de los anticuerpos presentes en el suero de un paciente puede determinarse por la inhibición específica de esta hemaglutinación. Aunque los virus de la gripe pueden detectarse por hemadsorción (véase protocolo 23-1), la tipificación del aislamiento más eficiente se logra por inhibición de la hemaglutinación. Los reactivos y las condiciones de la prueba varían según el virus.

La reacción de las hemaglutininas virales con los eritrocitos da como resultado un retículo de células aglutinadas que sedimentan en forma irregular en un tubo o cubeta de microtitulación. Las células no aglutinadas sedimentan en forma de botón compacto.

II. Materiales y reactivos

1. Eritrocitos de una especie adecuada (pollo, ganso, cobayo o seres humanos grupo 0 procesados con tripsina) obtenidos en solución de Alsever o heparina.
2. Diluyente de pH adecuado.
3. Soluciones para eliminar las hemaglutininas inespecíficas del suero.
4. Medio de cultivo infectado o antígeno estándar para serología.

III. Control de calidad

- A. Suero positivo conocido.
- B. Suero negativo conocido.
- C. Suero y células sin antígeno (para detectar aglutinación inespecífica).
- D. Titulación de la actividad hemaglutinante del antígeno (para asegurarse de que en la prueba se utilizan 4 unidades hemaglutinantes [UHA]).

IV. Procedimiento

A. Determinación del título hemaglutinante

1. Se incuba una suspensión diluida de eritrocitos a 4 °C o a temperatura ambiente con diluciones seriadas del antígeno hasta que los eritrocitos de los tubos sin virus sedimenten en forma de botón compacto (1 a 4 horas). La mayor dilución que produce hemaglutinación parcial o completa representa 1 UHA.

B. Tratamiento del suero

1. Para la mayoría de los virus es necesario eliminar los inhibidores inespecíficos presentes en el suero. Esta eliminación puede efectuarse por medios físicos, como el caolín; por medio de enzimas, como la neuraminidasa o la enzima destructora de los receptores de *Vibrio cholerae*, o por una combinación de estos métodos. La elección varía de acuerdo con el virus en estudio.

C. Prueba de inhibición

1. Se mezcla una dilución de antígeno que contenga 4 UHA con los glóbulos rojos adecuados y diluciones seriadas al medio del suero tratado. La suspensión se incuba de la misma forma descrita para la prueba de hemaglutinación.

V. Resultados

A. Interpretación

El punto final es la última cubeta en la que se observa aglutinación parcial o completa de los eritrocitos. Una película de bordes dentados o un botón irregular indican aglutinación. La observación de cómo se mueve el sedimento de eritrocitos cuando se inclina la placa puede ayudar a aclarar el punto final.

VI. Bibliografía

Hsiung GD. Diagnostic Virology, 3ª ed. New Haven, CT: Yale University Press, 1982.

Lennette EH, Schmidt NJ eds. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5ª ed. Washington DC: American Public Health Association, 1979.

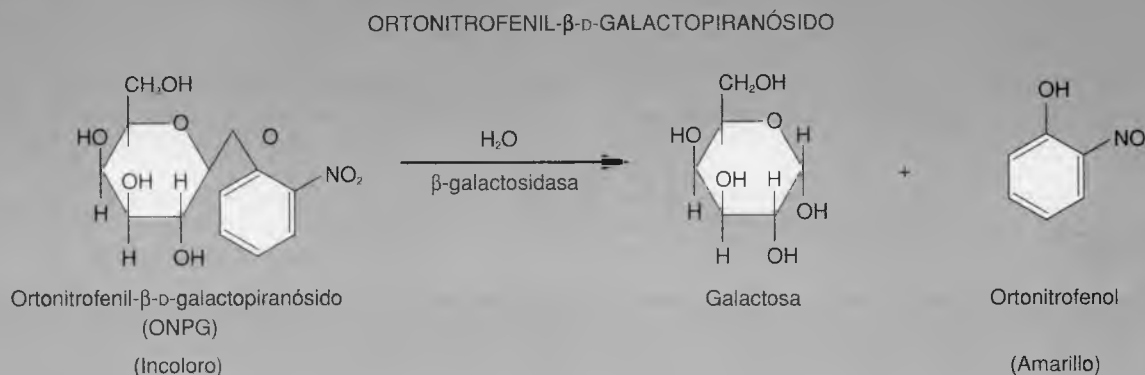
Smith TF. Viruses. En: Washington JA, ed. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2ª ed. Nueva York: Springer-Verlag, 1985.

PROTOCOLO 6-1

o-NITROFENIL- β -D-GALACTOPIRANÓSIDO

I. Principio

El *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) tiene estructura similar a la lactosa, excepto porque la glucosa ha sido sustituida por un grupo ortonitrofenilo, como se muestra en la siguiente reacción química:



Por hidrólisis, a través de la acción de la enzima β -galactosidasa, el ONPG produce dos residuos: galactosa y *o*-nitrofenol. El ONPG es un compuesto incoloro; el *o*-nitrofenol es amarillo, lo que permite la visualización de la hidrólisis.

Las bacterias fermentadoras de lactosa tienen tanto lactosa permeasa como β -galactosidasa, dos enzimas necesarias para la producción de ácido en la prueba de fermentación de la lactosa. La permeasa es necesaria para que la molécula de lactosa pueda penetrar en el interior de la célula bacteriana, donde la β -galactosidasa puede degradar el puente galactósido y producir glucosa y galactosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas y son incapaces de producir ácido a partir de la lactosa. Algunas especies bacterianas parecen ser no fermentadoras de la lactosa debido a que carecen de permeasa, pero tienen β -galactosidasa y dan una reacción de ONPG positiva. Estos denominados fermentadores lentos de la lactosa pueden producir ácido en forma tardía a partir de la lactosa debido a la actividad permeasa deficiente. En estos casos, una prueba ONPG positiva puede proporcionar una identificación rápida de la fermentación retardada de la lactosa.

II. Medios y reactivos

1. Buffer fosfato de sodio, 1 M, pH 7.
2. *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), 0,75 M (se dispone en el comercio de comprimidos de ONPG amortiguado).
3. Solución fisiológica.
4. Tolueno.

III. Control de calidad

- A. Control positivo: *Escherichia coli*.
- B. Control negativo: especies de *Proteus*.

IV. Procedimiento

Las bacterias que se han desarrollado en medios que contienen lactosa, como el agar hierro de Kligler (KIA) o el agar triple azúcar hierro (TSI), producen resultados óptimos en la prueba ONPG. Se emulsiona un ansa de bacterias en 0,5 mL de solución fisiológica para producir una suspensión densa. Se agrega una gota de tolueno a la suspensión y se mezcla enérgicamente durante algunos segundos para liberar la enzima de las células bacterianas. Se agrega una cantidad igual de solución mortiguada de ONPG a la suspensión y la mezcla se coloca en baño María a 37 °C.

Cuando se utilizan comprimidos de ONPG se agrega un ansa de suspensión bacteriana directamente al sustrato ONPG que se obtiene mediante el agregado de 1 mL de agua destilada al comprimido en un tubo de ensayo. Esta suspensión también se coloca a 37 °C en baño María.

V. Resultados

A. Interpretación

La velocidad de hidrólisis del ONPG a *o*-nitrofenol puede ser rápida en el caso de algunos microorganismos y produce un color amarillo visible en el término de 5 a 10 minutos (véase lámina en color 6-4A). La mayoría de las pruebas son positivas dentro de la hora; sin embargo, las reacciones no deben considerarse negativas antes de las 24 horas de incubación. El color amarillo suele ser bien definido e indica que el microorganismo ha producido *o*-nitrofenol a partir del sustrato de ONPG por acción de la β -galactosidasa.

PROTOCOLO 6-1

o-NITROFENIL- β -D-GALACTOPIRANÓSIDO (cont.)

VI. Bibliografía

- Belliveau RR, Grayson JW Jr, Butler, TJ. A rapid, simple method of identifying *Enterobacteriaceae*. Am J Clin Pathol 1968;50:126-128.
- Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:83-85.
- Lederberg J. The beta-d-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. J Bacteriol 1950;60:381-392.
- Lowe GH. The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -galactosidase. J Med Lab Technol 1962;19:21-25.
- MacFaddin JE. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:120-128.

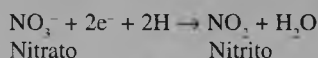
PROTOCOLO 6-2

REDUCCIÓN DE NITRATOS: APLICACIONES GENERALES

I. Principio

La capacidad de un microorganismo para reducir los nitratos a nitritos es una característica importante, que se utiliza para identificar y diferenciar especies de muchos grupos de microorganismos. Todas las *Enterobacteriaceae*, excepto ciertos biotipos de *Pantoea agglomerans* y ciertas especies de *Serratia* y *Yersinia*, reducen los nitratos. La prueba también es de utilidad para identificar miembros de los géneros *Haemophilus*, *Neisseria* y *Moraxella*.

Los microorganismos que reducen los nitratos pueden extraer oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción. La ecuación química es



La presencia de nitritos en el medio de prueba se detecta por el agregado de α -naftilamina y ácido sulfanílico, con formación de un colorante rojo de diazonio, *p*-sulfobencenoazo- α -naftilamina. Véase la figura del protocolo 19-12.

II. Medios y reactivos

A. Caldo o agar (pico de flauta) para nitratos

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1 g
Agar (libre de nitritos)	12 g
Agua destilada csp	1 L

B. Reactivo A

α -naftilamina	5 g
Ácido acético (5N), 30%	1 L

C. Reactivo B

Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético (5N), 30%	1 L

III. Control de calidad

Es importante probar cada lote nuevo de medio y cada preparación nueva de los reactivos de prueba con reacciones negativas y positivas. Se sugieren los siguientes microorganismos:

- A. Control positivo: *Escherichia coli*.
- B. Control negativo: *Acinetobacter baumannii*.

IV. Procedimiento

1. Inocular el medio para nitratos con un ansa con los microorganismos en estudio aislados en cultivo puro en agar e incubarlo a 35 °C durante 18 a 24 horas.
2. Finalizada la incubación, agregar 1 mL de cada uno de los reactivos A y B al medio de prueba, en ese orden.

PROTOCOLO 6-2

REDUCCIÓN DE NITRATOS: APLICACIONES GENERALES (cont.)

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color rojo dentro de los 30 segundos después de agregar los reactivos de prueba indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para reducción de nitratos (véase lámina en color 6-1H). Si no se observa color después de agregar los reactivos de prueba, esto puede indicar que no se han reducido los nitratos (reacción realmente negativa) o que han sido reducidos a productos diferentes de los nitritos, como amoníaco, nitrógeno molecular (denitrificación), óxido nítrico (NO) u óxido nitroso (N₂O) e hidroxilamina. Como los reactivos de prueba sólo detectan nitritos, los últimos procesos dan resultados falsos negativos. Por lo tanto, es necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de cinc a todas las reacciones negativas. Los iones cinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un color rojo después de agregar el polvo de cinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma que la reacción es verdaderamente negativa.

VI. Bibliografía

Finegold SM, Martin WJ, Scott EG. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 5ª ed. St. Louis: Mosby, 1978:490.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:236-245.

Wallace GI, Neave SL. The nitrite test as applied to bacterial cultures. J Bacteriol 1927;14:377-384.

PROTOCOLO 6-3

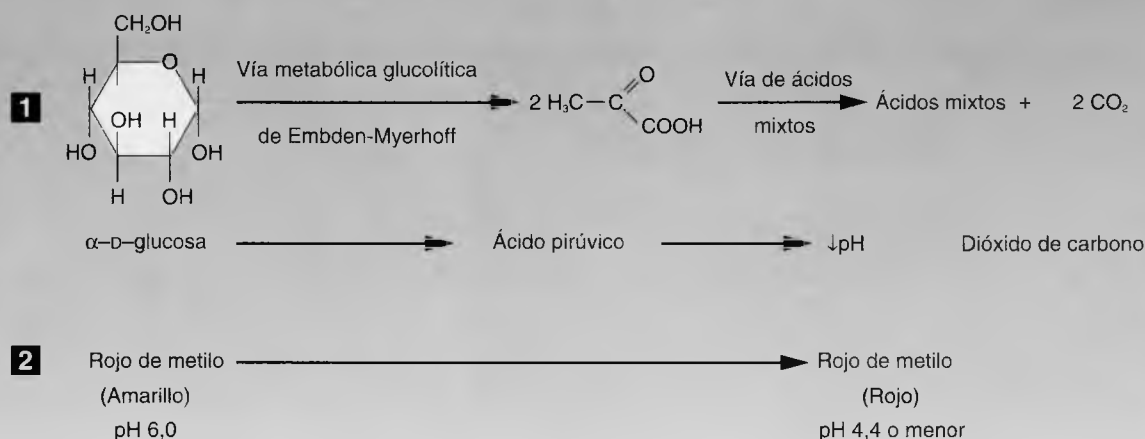
ROJO DE METILO

I. Principio

El rojo de metilo es un indicador de pH con un rango entre 6 (amarillo) y 4,4 (rojo). El pH al cual el rojo de metilo detecta los ácidos es mucho más bajo que el pH correspondiente a otros indicadores utilizados en medios de cultivo bacteriológicos. Por lo tanto, para provocar un cambio de color, el microorganismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido del sustrato de hidratos de carbono que se utilice.

La prueba del rojo de metilo es una prueba cuantitativa de la producción de ácido, que requiere que los microorganismos positivos produzcan ácidos fuertes (láctico, acético, fórmico) de la glucosa a través de la vía de fermentación ácida mixta (véase fig. 6-2). Como muchas especies de la familia *Enterobacteriaceae* pueden producir suficientes cantidades de ácidos fuertes que pueden detectarse mediante el indicador rojo de metilo durante las fases iniciales de la incubación, sólo los microorganismos que pueden mantener este pH bajo después de incubaciones prolongadas (48 a 72 horas), superando el sistema buffer del medio, pueden ser llamadas positivas para rojo de metilo.

REACCIÓN DEL ROJO DE METILO



II. Medios y reactivos

El medio utilizado con mayor frecuencia es el caldo de rojo de metilo-Voges-Proskauer (MR/VP) según la fórmula de Clark y Lubs. Este medio también sirve para realizar la prueba de Voges-Proskauer.

PROTOCOLO 6-3

ROJO DE METILO (*cont.*)

A. Caldo VP/RM

Polipectona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada, csp	1 L
pH final = 6,9	

B. Indicador de pH rojo de metilo.

Rojo de metilo, 0,1 g en 300 mL de alcohol etílico al 95%.

Agua destilada, 200 mL.

III. Control de calidad

Realizar controles positivos y negativos después de la preparación de cada lote de medio y luego de hacer cada lote de reactivos. Los controles sugeridos son los siguientes:

A. Control positivo: *Escherichia coli*.

B. Control negativo: *Enterobacter aerogenes*.

IV. Procedimiento

1. Sembrar el caldo MR/VP con un cultivo puro del microorganismo en estudio. Incubar el caldo a 35 °C durante 48 a 72 horas (no menos de 48 horas).
2. Finalizada la incubación, agregar 5 gotas del reactivo de rojo de fenol directamente al caldo.

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color rojo estable en la superficie del medio indica la suficiente producción de ácido como para disminuir el pH a 4,4 y constituye una prueba positiva (véase lámina en color 6-4C). Como otros microorganismos pueden producir pequeñas cantidades de ácido del sustrato probado, puede observarse un color naranja, intermedio entre amarillo y rojo. Esto no indica una prueba positiva.

VI. Bibliografía

Barry AL, et al. Improved 18-hour methyl red test. Appl Microbiol 1970;20:866-870.

Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:75-77.

Clark WM, Lubs HA. The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. J Infect Dis 1915;17:160.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:209-214.

PROTOCOLO 6-4

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER

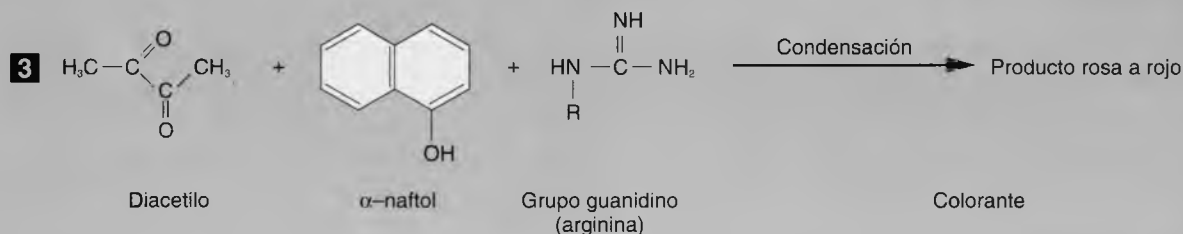
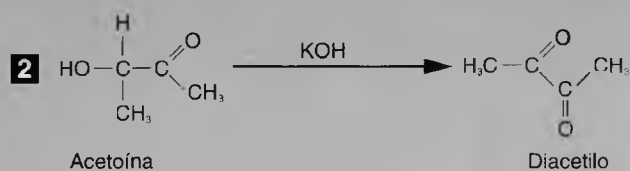
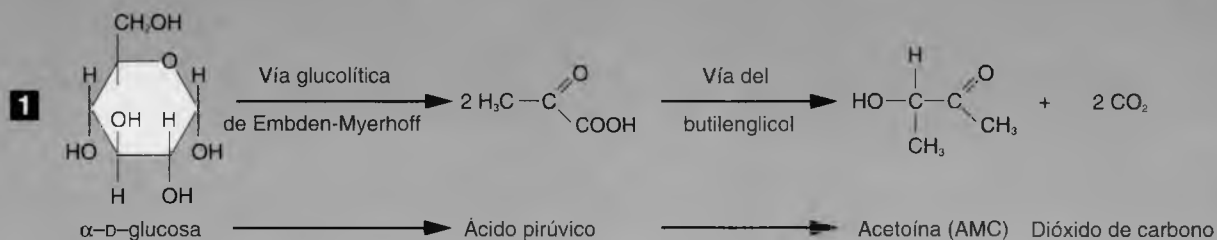
I. Principio

Voges-Proskauer es un epónimo doble, en honor de dos microbiólogos que trabajaron a principios del siglo XX. Estos investigadores fueron los primeros en observar la reacción de color rojo producida en medios de cultivo adecuados después del tratamiento con hidróxido de potasio. Luego se descubrió que el producto activo del medio, formado por el metabolismo bacteriano, es el acetil metil carbinol, producto de la vía del butilenglicol.

El ácido pirúvico, el principal compuesto formado durante la degradación fermentativa de la glucosa, se metaboliza más tarde a través de diferentes vías metabólicas, según los sistemas enzimáticos que tengan las diferentes bacterias. Una de esas vías da como resultado la producción de acetoina (acetil metil carbinol), un producto final de reacción neutra. Los microorganismos del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* producen acetoina como producto metabólico final principal del metabolismo de la glucosa y forman cantidades pequeñas de ácidos mixtos. En presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40%, la acetoina se convierte a diacetilo y el α -naftol sirve de catalizador para producir un complejo de color rojo.

PROTOCOLO 6-4

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER (cont.)



II. Medios y reactivos

A. Medios

1. El medio es el caldo MR/VP descrito en el protocolo 6-3.

B. Reactivos

1. α -naftol al 5%, intensificador de color

α -naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

2. Hidróxido de potasio al 40%, agente oxidante

Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada csp	100 mL

III. Control de calidad

Deben hacerse controles negativos y positivos después de la preparación de cada lote de medio y de cada lote de reactivos. Los controles sugeridos son los siguientes:

A. Control positivo: *Enterobacter aerogenes*.

B. Control negativo: *Escherichia coli*.

IV. Procedimiento

Sembrar un tubo de caldo MR/VP con un cultivo puro del microorganismo por probar. Incubar 24 horas a 35 °C. Finalizada la incubación, transferir 1 mL del caldo a un tubo de ensayo limpio. Agregar 0,6 mL de α -naftol al 5%, seguidos de 0,2 mL de KOH al 40%. Es esencial que los reactivos sean agregados en ese orden. Agitar suavemente el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejar el tubo en reposo durante 10 a 15 minutos.

PROTOCOLO 6-4

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER (cont.)

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color rojo 15 minutos o más después del agregado de los reactivos, que indica la presencia de diacetilo, el producto de oxidación de la acetoina, constituye una prueba positiva (véase lámina en color 6-4D). La prueba no debe leerse más allá de una hora después de dejar los tubos en reposo, porque los cultivos Voges-Proskauer negativos pueden producir un color cobrizo, que se puede interpretar como un positivo falso.

VI. Bibliografía

- Barritt MM. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naftol. J Pathol Bacteriol 1936;42:441-454.
 Barry AL, Feeney KL. Two quick methods for Voges-Proskauer test. Appl Microbiol 1967;15:1138-1141.
 Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:105-107.
 MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:308-320.
 Voges O, Proskauer B. Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differential-diagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicaemia. Z Hyg 1898;28:20-32.

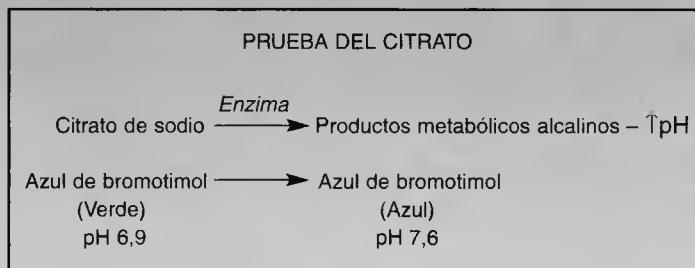
PROTOCOLO 6-5

UTILIZACIÓN DEL CITRATO

I. Principio

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico simple que se encuentra como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía de fuentes distintas de la fermentación de los hidratos de carbono, con el citrato como única fuente de carbono. La medición de esta característica es importante para identificar muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Cualquier medio usado para detectar la utilización del citrato por las bacterias que se van a probar debe carecer de proteínas e hidratos de carbono como fuente de carbono.

La utilización del citrato por la bacteria que se va a probar se detecta en el medio de citrato por la producción de subproductos alcalinos. El medio contiene citrato de sodio, que es un anión, como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco (NH_3), lo que produce la alcalinización del medio por conversión del NH_4^+ a hidróxido de amonio (NH_4OH). El indicador es el azul de bromotimol, que es amarillo por debajo de pH 6 y azul por encima de pH 7,6.



II. Medios y reactivos

El medio para citrato utilizado con mayor frecuencia es la fórmula de Simmons. El medio se coloca en tubos inclinados (agar en pico de flauta). La fórmula del medio de citrato de Simmons es la siguiente:

PROTOCOLO 6-5

UTILIZACIÓN DEL CITRATO (cont.)

Fosfato de amonio dihidrogenado	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Agar	15 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agua destilada csp	1 L

pH final = 6,9

III. Control de calidad

Cada lote nuevo de medio debe ser probado con un microorganismo de reacción positiva y uno de reacción negativa. Las siguientes especies son los controles sugeridos:

A. Control positivo: *Enterobacter aerogenes*.

B. Control negativo: *Escherichia coli*.

IV. Procedimiento

1. Se toma una colonia bien aislada de la superficie de un medio de aislamiento primario y se siembra en forma de estría única en el pico de flauta (agar inclinado) del tubo de agar citrato. El tubo se incuba a 35 °C durante 24 a 48 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

La prueba positiva está representada por la producción de color azul oscuro en el término de 24 a 48 horas, que indica que el microorganismo en prueba ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con formación de productos alcalinos (véase lámina en color 6-4D). La prueba también puede considerarse positiva sin que haya color azul, si hay desarrollo visible en la estría de siembra. Esto es válido porque para que el desarrollo sea visible, el microorganismo debió haber ingresado en la fase logarítmica de crecimiento, lo que sólo es posible si ha asimilado carbono y nitrógeno. Una interpretación positiva basada en la lectura del trazo se puede confirmar incubando el tubo durante 24 horas más, momento en que habitualmente se produce el color azul.

VI. Bibliografía

BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5ª ed. Cockeysville MD: BioQuest, 1968:115,138.

Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:15-18.

Koser SA. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes groups. J Bacteriol 1923;8:493-520.

MacFaddin JE. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:59-63.

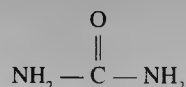
Simmons JS. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. J Infect Dis 1926;39:209-214.

PROTOCOLO 6-6

PRUEBA DE LA UREASA: CONVENCIONAL

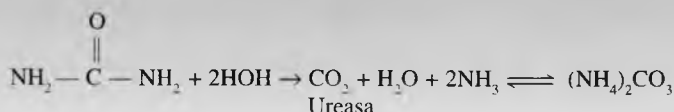
I. Principio

La urea es una diamida del ácido carbónico con la fórmula



Todas las amidas se hidrolizan fácilmente, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

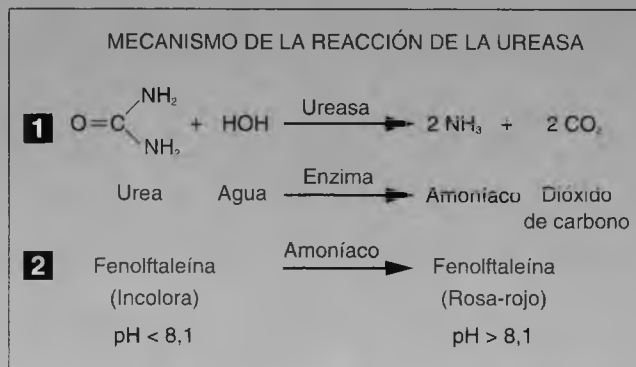
La ureasa es una enzima que tienen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar la urea según la siguiente reacción química



PROTOCOLO 6-6

PRUEBA DE LA UREASA: CONVENCIONAL (cont.)

El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumento de pH del medio.



II. Medios y reactivos

Los dos medios utilizados con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos para la detección de actividad ureasa son el caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen.

CALDO UREA DE STUART

Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato disódico	9,5 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,01 g
Agua destilada csp	1 L

pH final = 6,8

AGAR UREA DE CHRISTENSEN

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,012 g
Agar	15 g
Agua destilada csp	1 L

pH final = 6,8

III. Control de calidad

Deben probarse microorganismos de reacción positiva y negativa con cada nuevo lote de medio. Se sugieren los siguientes microorganismos:

- A. Control positivo: especies de *Proteus*.
- B. Control positivo (débil): especies de *Klebsiella*.
- C. Control negativo: *Escherichia coli*.

IV. Procedimiento

El medio líquido se siembra con un ansa de cultivo puro del microorganismo por probar; la superficie inclinada del agar (pico de flauta) se siembra en estría con el microorganismo por probar. Ambos medios se incuban a 35 °C durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

Los microorganismos que hidrolizan la urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 o 2 horas; las especies menos activas pueden requerir 3 días o más. Las reacciones son las siguientes:

1. Caldo de Stuart
Un color rojo en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de la urea.
2. Agar de Christensen
Degradadores rápidos de la urea (especies de *Proteus*): color rojo en todo el medio.
Degradadores lentos de la urea (especies de *Klebsiella*): inicialmente color rojo sólo en el pico de flauta, que gradualmente se extiende a todo el tubo.
3. Ausencia de hidrólisis de la urea: el medio conserva su color amarillo original (véase lámina en color 6-4E).

PROTOCOLO 6-6

PRUEBA DE LA UREASA: CONVENCIONAL (cont.)

VI. Bibliografía

BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5ª ed. Cockeysville MD: Bio-Quest, 1968:154.

Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J Bacteriol 1946;52:461-466.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:298-308.

Stuart CA, Van Stratum E, Rustigian R. Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. J Bacteriol 1945;49:437-444.

PROTOCOLO 6-7

DESCARBOXILASAS

I. Principio

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas con sustrato específico capaces de reaccionar con el residuo carboxilo (COOH) de los aminoácidos, para formar aminas de reacción alcalina. Esta reacción, conocida como descarboxilación, forma dióxido de carbono como producto secundario. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido. Los tres aminoácidos que se prueban habitualmente para la identificación de las *Enterobacteriaceae* son lisina, ornitina y arginina. Los productos aminados específicos son los siguientes:

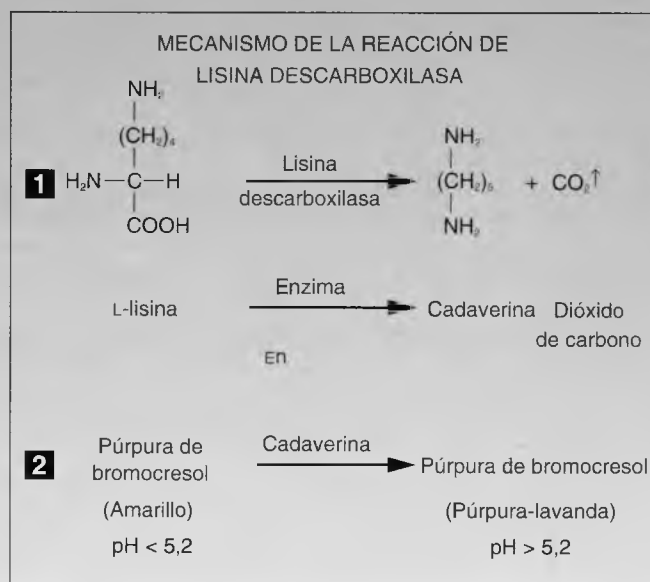
Lisina → cadaverina

Ornitina → putrescina

Arginina → citrulina

La conversión de arginina a citrulina es una reacción de dihidrolasa y no de descarboxilasa, en la que un grupo NH_2 se elimina de la arginina como primer paso. La citrulina se convierte a continuación a ornitina, que a su vez se descarboxila para formar putrescina.

El medio para descarboxilasas de Moeller es la base utilizada con mayor frecuencia para determinar la capacidad de descarboxilación de *Enterobacteriaceae*. El aminoácido por probar se agrega a la base de descarboxilasa antes de la siembra con el microorganismo en estudio. También debe sembrarse en paralelo un tubo control, que contiene la base sin el aminoácido agregado. Ambos tubos se incuban en condiciones anaerobias, lo que se logra cubriendo la siembra con una capa de vaselina líquida. Al principio de la incubación ambos tubos viran al amarillo, debido a la fermentación de la pequeña cantidad de glucosa que contiene el medio. Si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas alcalinas y el medio vira nuevamente a su color púrpura original.



PROTOCOLO 6-7

DESCARBOXILASAS (cont.)

II. Medios y reactivos

A. Caldo base de Moeller para descarboxilasa

Peptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Rojo cresol	0,005 g
Glucosa	0,5 g
Piridoxal	0,005 g
Agua destilada csp	1 L
pH final = 6	

B. Aminoácido

Agregar 10 g (concentración final = 1%) de la forma L (*levo*) del aminoácido (lisina, ornitina o arginina). Duplicar esta cantidad si se utiliza la forma D (*dextro*)-L, debido a que sólo es activa la forma L.

III. Control de calidad

Los siguientes microorganismos son los sugeridos como controles positivos y negativos:

AMINOÁCIDO	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
Lisina	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Ornitina	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Arginina	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>

IV. Procedimiento

Sembrar dos tubos de medio de descarboxilasa de Moeller, uno con el aminoácido por probar y el otro sin aminoácido, que será usado como control, a partir de una colonia aislada del microorganismo en estudio que previamente se desarrolló en agar de aislamiento primario. Cubrir ambas superficies de siembra con vaselina líquida estéril, hasta aproximadamente 1 cm por encima de la superficie e incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

El viraje del tubo control a color amarillo indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha descendido lo suficiente como para activar las enzimas descarboxilasas. La reversión del tubo que contiene el aminoácido a un color azul púrpura indica una prueba positiva, debido a la formación de aminas a partir de la reacción de descarboxilación (véase lámina en color 6-4F).

VI. Bibliografía

- Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:29-36.
- Carlquist PR. A biochemical test for separating paracolon groups. J Bacteriol 1956;71:339-341.
- Falkow S. Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of salmonellae and shigellae. Am J Clin Pathol 1958;29:598-600.
- Gale EF. The bacterial amino acid decarboxylases. En: Nord FF, ed. Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry. Vol. 6. Nueva York: Interscience Publishers, 1946.
- MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:78-93.
- Moeller V. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathol Microbiol Scand 1955;36:158-172.

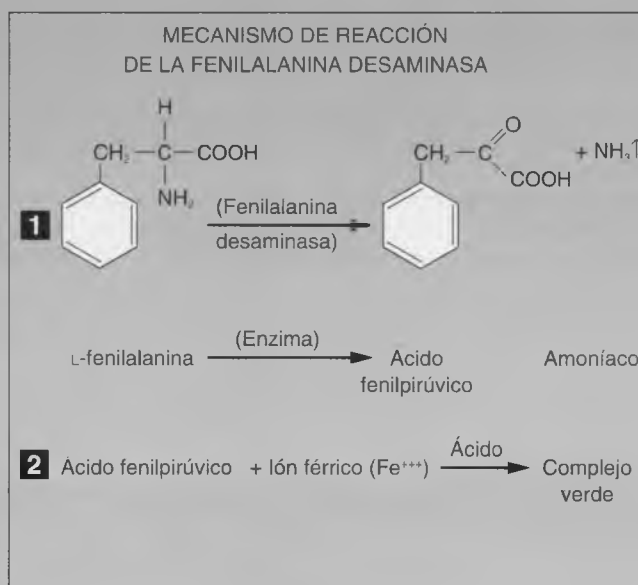
PROTOCOLO 6-8

FENILALANINA DESAMINASA

I. Principio

La fenilalanina es un aminoácido que forma un cetoácido por desaminación, el ácido fenilpirúvico. Entre las *Enterobacteriaceae*, sólo los miembros de los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* tienen la enzima desaminasa necesaria para esta conversión.

La prueba de la fenilalanina se basa en la detección de ácido fenilpirúvico en el medio de prueba después del desarrollo del microorganismo en estudio. La prueba es positiva si se observa color verde después del agregado de una solución de cloruro férrico al 10%.



II. Medios y reactivos

Se vierte agar fenilalanina en un tubo inclinado para formar un pico de flauta. No pueden utilizarse extractos de carne o hidrolizados proteicos debido a su contenido natural, variable, de fenilalanina. El extracto de levadura sirve como fuente de carbono y nitrógeno. La fórmula es la que se muestra a continuación:

Medio:

DL-fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	1 g
Agar	12 g
Agua destilada csp	1 L
pH = 7,3	

Reactivo:

Cloruro férrico	12 g
HCl concentrado	2,5 mL
Agua destilada csp	100 mL

III. Control de calidad

Cada lote nuevo de medio o reactivo debe probarse con microorganismos de reacción positiva o negativa. Se sugieren los siguientes:

- A. Control positivo: especies de *Proteus*.
- B. Control negativo: *Escherichia coli*.

PROTOCOLO 6-8

FENILALANINA DESAMINASA (cont.)

IV. Procedimiento

El agar inclinado (pico de flauta) se siembra con una sola colonia del microorganismo en un estudio, aislado en un cultivo puro primario en agar en placa. Después de una incubación a 35 °C durante 18 a 24 horas, se agregan 4 o 5 gotas de reactivo de cloruro férrico directamente sobre la superficie del agar. A medida que se agrega el reactivo, se rota el tubo para desprender las colonias de la superficie.

V. Resultados

A. Interpretación

La aparición inmediata de color verde intenso indica la presencia de ácido fenilpirúvico y la prueba es positiva (véase lámina en color 6-4E).

VI. Bibliografía

Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. Nueva York: Wiley, 1975:23-28.

Hendriksen SD. A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. J Bacteriol 1950;60:225-231.

Hendriksen SD, Closs K. The production of phenylpyruvic acid by bacteria. Acta Pathol Microbiol Scand 1938;15:101-113.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:269-274.

Shaw C, Clarke PH. Biochemical classification of *Proteus* and *Providencia* cultures. J Gen Microbiol 1955;13:155-161.

PROTOCOLO 7-1

PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN (HUGH Y LEIFSON)

I. Principio

Los microorganismos sacarolíticos degradan la glucosa, ya sea por fermentación o por oxidación, como se muestra en la figura 7-1. Los productos finales de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes, que pueden detectarse en un medio convencional de fermentación. Sin embargo, los ácidos formados por degradación oxidativa de la glucosa son en extremo débiles y para detectarlos es necesario el medio más sensible de oxidación-fermentación de Hugh y Leifson (medio OF).

El medio OF de Hugh y Leifson difiere de los medios para fermentación de hidratos de carbono en los siguientes aspectos:

La concentración de peptona se reduce del 1% al 0,2%.

La concentración del hidrato de carbono aumenta del 0,5% al 1,0%.

La concentración de agar se reduce del 1,5% al 0,3%, lo que hace que el medio sea semisólido.

La baja relación proteína/hidratos de carbono reduce la formación de aminas alcalinas que pueden neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles que pueden formarse a partir del metabolismo oxidativo. Las cantidades relativamente elevadas de hidratos de carbono sirven para aumentar la cantidad de ácido que es posible formar. La consistencia semisólida del agar permite que los ácidos que se forman en su superficie se difundan a través del medio, lo que facilita la visualización del cambio de pH del indicador. En este medio también puede observarse la motilidad.

II. Medios y reactivos

A continuación, se muestran las fórmulas de un medio convencional para fermentación de hidratos de carbono y del medio OF para su comparación:

MEDIO PARA FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
D-glucosa	5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar*	15 g
Agua destilada csp	1 L
pH = 7,0	

MEDIO DE HUGH Y LEIFSON

Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
D-glucosa	10 g
Azul de bromotimol	0,03 g
Agar	3 g
Fosfato dipotásico	0,30 g
Agua destilada csp	1 L
pH 7,1	

PROTOCOLO 7-1

PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN (HUGH Y LEIFSON) (cont.)

Las reacciones para azúcares del medio OF enumeradas en las tablas de Weaver de los CDC, descritas en el capítulo 7, se basan en pruebas con una base "especial" con rojo fenol como indicador:

Bacto casitone, 2 g

Bacto agar, 3 g

Rojo fenol, solución acuosa al 1.5%, 2 mL

Agua destilada hasta completar 1 L

El medio basal se ajusta a pH 7.3 y se coloca en autoclave. Las soluciones de hidratos de carbono se esterilizan a través de un filtro Seitz y se agregan al medio base hasta una concentración final del 1%. Los estudios realizados en los CDC revelaron que la correlación de los resultados de la prueba entre el medio de Difco y el medio basal especial OF de los CDC era excelente y que puede usarse cualquiera de ellos cuando se utilizan las tablas de Weaver para la interpretación.

El medio OF debe vertirse sin formar un pico de flauta en tubos con un diámetro interno de 15 a 20 mm para incrementar la superficie.

III. Control de calidad

A. Fermentador de glucosa: *Escherichia coli*.

B. Oxidador de glucosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

C. No sacarolítico: especies de *Moraxella*.

IV. Procedimiento

Se necesitan dos tubos para la prueba OF, ambos sembrados con el microorganismo desconocido mediante un ansa recta; es preciso sembrar en profundidad tres a cuatro veces hasta la mitad de la distancia existente hasta el fondo del tubo. Un tubo de cada par se cubre con una capa de 1 cm de vaselina líquida estéril o parafina fundida, y el otro se deja expuesto al aire. Incubar ambos tubos a 35 °C y observar a diario durante varios días.

V. Resultados

A. Interpretación

La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de color amarillo. En el caso de los microorganismos oxidativos, la producción de color se puede notar primero cerca de la superficie del medio. Los patrones de reacción son los siguientes:

TUBO ABIERTO	TUBOS CUBIERTOS	METABOLISMO
Ácido (amarillo)	Alcalino (verde)	Oxidativo
Ácido (amarillo)	Ácido (amarillo)	Fermentativo
Alcalino (verde o azul)	Alcalino (verde o azul)	No sacarolítico

Estas reacciones se muestran en la lámina en color 7-1D. Para las especies de desarrollo lento, puede necesitarse una incubación durante 3 días o más para detectar las reacciones positivas.

VI. Bibliografía

BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5ª ed. Cockeysville MD: BioQuest, 1973:129-130.

Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacilli. J Bacteriol 1953;66:24-26.

MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:260-268.

PROTOCOLO 7-2

TINCIÓN PARA FLAGELOS

I. Principio

La mayoría de las bacterias móviles tienen flagelos, cuyas formas, cantidad y posición son características importantes para la identificación de géneros y especies, en particular cuando las reacciones bioquímicas son débiles o confusas. La técnica de coloración de Leifson (o sus modificaciones) es la empleada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y no es difícil de realizar, siempre y cuando se sigan los detalles exactos de cada paso del procedimiento.

Los flagelos bacterianos pueden colorearse con soluciones alcohólicas de colorantes de rosanilina, que forman un precipitado cuando el alcohol se evapora durante el procedimiento de coloración. Se utiliza fucsina básica (acetato de pararosanilina) como colorante principal con el agregado de ácido tánico a la solución, como mordiente. Se puede utilizar un colorante de contraste, como el azul de metileno, para visualizar mejor las bacterias, en los casos en que la coloración principal es débil o no reacciona en absoluto con la pared celular de la bacteria.

PROTOCOLO 7-2

TINCIÓN PARA FLAGELOS (cont.)

II. Medios y reactivos

A. Método de Leifson

1. Fucsina básica al 1,2% en alcohol al 95%.
 - a. El producto comercial debe estar certificado para coloración de flagelos.
 - b. Se prefiere el acetato de pararosanilina. Si la solución colorante es una mezcla de acetato de pararosanilina y clorhidrato de pararosanilina, el compuesto en la forma de clorhidrato no debe ser más de los dos tercios de la solución.
 - c. El colorante, para ser satisfactorio, debe tener olor a ácido acético.
 - d. Cuando se prepara un colorante nuevo, debe dejarse pasar por lo menos un día antes de usarlo, para que se solubilice por completo.
2. Ácido tánico al 3% en agua.
 - a. La suspensión, para ser satisfactoria, debe tener color amarillo pálido.
 - b. Agregar fenol en una concentración de 1:200 para evitar el desarrollo de hongos durante el almacenamiento.
3. Cloruro de sodio al 1,5% en agua.
4. Colorante final
 - a. Combinar volúmenes iguales de las tres soluciones madre. El colorante está listo para su uso inmediatamente después de la preparación y debe conservarse en frascos con cierre hermético.
 - b. Durante el almacenamiento se formará un precipitado. Éste no debe agitarse; en lugar de eso, recuperar la solución colorante de la parte superior con una pipeta.
 - c. La duración de la solución colorante es de una semana a temperatura ambiente, un mes en el frigorífico e indefinida si se congela.

B. Método de Ryu

1. Solución I

- a. Fenol al 5%, 10 mL
- b. Ácido tánico en polvo, 2 g
- c. Sulfato de aluminio y potasio saturado con 12 H₂O (cristales) (preparar 14 g de alumbre de potasio en 100 mL de H₂O destilada), 10 mL

2. Solución II

- a. Solución saturada de violeta de genciana (cristal violeta) en alcohol (preparar 12 g en 100 mL de etanol al 95%)

3. Colorante final

- a. Diez partes de la solución I (mordiente) se mezclan con una parte de la solución II y la mezcla se conserva en un frasco plástico a temperatura ambiente.

III. Control de calidad

Las siguientes especies bacterianas pueden servir como controles:

A. Positivas: peritrico, *Escherichia coli*; polar monotrico, *Pseudomonas aeruginosa*; multitrico, *Burkholderia cepacia*.

B. Negativas: *Acinetobacter baumannii*.

IV. Procedimiento

A. Método de Leifson

1. Preparar una suspensión poco densa de bacterias en agua a partir de un cultivo joven en un agar apropiado.
2. Colocar 2 gotas de la suspensión bacteriana en un extremo de un portaobjetos lavado con ácido. Dejar secar al aire. Con un lápiz de cera, dibujar una línea perpendicular en la superficie del vidrio del lado interno de la suspensión seca.
3. Colocar el portaobjetos en un soporte inclinado y cubrir la suspensión bacteriana seca con una capa fina de colorante. La marca hecha con el lápiz de cera impide que el colorante se escurra del extremo del portaobjetos.
4. Colorear durante 5 a 15 minutos, dejando que se forme un precipitado a medida que se evapora el alcohol. El tiempo de tinción disminuye si el colorante es fresco, si la temperatura ambiente es alta, si hay corrientes de aire en el laboratorio o si la capa de colorante es muy delgada. Las condiciones opuestas aumentan el tiempo de coloración.
5. Cuando se forma el precipitado, enjuagar el portaobjetos suavemente con agua destilada, eliminar el exceso de agua y dejar secar al aire.

B. Método de Ryu

1. Preparar un frotis tomando bacterias de un cultivo joven en un medio de cultivo libre de hidratos de carbono con una aguja de siembra, tocando levemente el centro de cada una de dos gotas de agua destilada colocadas en un portaobjetos nuevo, lavado antes. Dejar que las gotas se sequen al aire a temperatura ambiente.
2. Cubrir los frotis secados al aire con abundante solución colorante durante 1 a 5 minutos (puede ser necesario realizar algunas pruebas para determinar el tiempo exacto en el que se produce la coloración satisfactoria de los flagelos, pero sin que haya excesivos detritos en el fondo). Eliminar la solución colorante por lavado con agua corriente.

PROTOCOLO 7-2

TINCIÓN PARA FLAGELOS (cont.)

3. Una vez secos los frotis, observarlos con el microscopio con objetivo de inmersión. Los cuerpos celulares y los flagelos se tiñen de violeta.

V. Resultados

A. Interpretación

Observar el portaobjetos teñido con el microscopio con objetivo de inmersión en aceite (100×). Deben verse los flagelos coloreados de rojo oscuro a azul negro. Comparar la morfología con las microfotografías proporcionadas en el *Atlas of Bacterial Flagellation* de Leifson, citado en la bibliografía y véase también la figura 7-3.

VI. Bibliografía

Clark WA. A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* 1976;3:632-634.

Leifson R. *Atlas of Bacterial Flagellation*. Nueva York: Academic Press, 1960.

Ryu E. A simple method of staining bacterial flagella. *Kitasato Arch Exp Med* 1937;14:218-219.

PROTOCOLO 7-3

FLUORESCENCIA - DENITRIFICACIÓN

I. Principio

La capacidad para producir pigmento fluorescente y para reducir por completo los nitratos o nitritos a gas nitrógeno son dos características importantes para la identificación de los *Pseudomonadales* y otros bacilos no fermentadores. La fórmula del medio de fluorescencia-denitrificación (FN) permite detectar ambas características. El medio de fluorescencia lactosa nitrato (FLN) es una modificación en la cual se agregan lactosa y rojo fenol como indicador, para permitir la detección del ácido formado de la utilización de la lactosa, lo cual es de ayuda para identificar el grupo de no fermentadores fuertemente lactosa positivos.

A. Prueba de fluorescencia

La fluoresceína es un pigmento orgánico luminiscente que al ser excitado con luz ultravioleta emite una fluorescencia verde amarillenta. Unos pocos bacilos no fermentadores, en especial *Pseudomonas aeruginosa*, son capaces de producir fluoresceína, cuya detección es útil para su identificación. La fluorescencia de las colonias puede no detectarse en un medio de aislamiento común, como el agar sangre o el agar de MacConkey; con frecuencia deben utilizarse medios que contienen sales catiónicas, como sulfato de magnesio (incluido en el medio FN), que actúan como activadores o coactivadores para intensificar la luminiscencia.

B. Prueba de denitrificación

La reducción del nitrato a gas nitrógeno (N_2) u óxido nitroso (N_2O) se denomina denitrificación y se demuestra por la siguiente ecuación química:



En este proceso de reducción, el radical nitrato acepta cinco electrones, lo que da por resultado la formación de nitrógeno gaseoso y seis moléculas de agua. La prueba de denitrificación es útil para separar el grupo de *Pseudomonas stutzeri* (la mayoría de las cepas son positivas) de otros bacilos no fermentadores (véase cuadro 7-5).

II. Medios y reactivos

A. La fórmula del medio FN es la siguiente:

Proteosa peptona 3 (Difco Laboratories, Detroit MI)	1 g
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	0,15 g
Fosfato dipotásico hidrogenado	0,15 g
Nitrato de potasio	0,2 g
Nitrito de sodio	0,05 g
Agar	1,5 g
Agua destilada csp	100 mL

pH = 7,2

1. Suspender todos los componentes en agua destilada, excepto el sulfato de magnesio. Éste se disuelve por separado en una pequeña cantidad de agua antes de agregarlo al medio con agar para evitar la formación de un precipitado insoluble.
2. Si va a prepararse el medio FLN, agregar 2 g de lactosa y 0,002 g de indicador rojo fenol. Fraccionar 4 mL de medio en tubos de 13 mm con tapa de rosca y dejar solidificar, de modo que la profundidad y la longitud del agar inclinado (pico de flauta) sean aproximadamente iguales.

PROTOCOLO 7-3

FLUORESCENCIA - DENITRIFICACIÓN (cont.)

3. El medio de Sellers, disponible en el comercio, también es apropiado para la determinación de la fluorescencia y la denitrificación por parte de bacterias no fermentadoras.

B. La fórmula del medio para la reducción de nitratos/nitritos es la siguiente:

Caldo infusión de corazón (Difco Laboratories, Detroit MI)*	25 g
Nitrato de potasio C.P.	2 g
Agua destilada csp	1 L

pH = 7

III. Control de calidad

Los siguientes microorganismos son controles apropiados:

Fluorescencia positiva/denitrificación positiva: *Pseudomonas aeruginosa*.

Fluorescencia negativa/denitrificación positiva: *Pseudomonas stutzeri*.

Fluorescencia negativa/denitrificación negativa: *Escherichia coli*.

IV. Procedimiento

Sembrar el medio con una suspensión densa del cultivo en profundidad y luego se siembra en estría el pico de flauta. Incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

Examinar el tubo con una fuente de luz ultravioleta (lámpara de Wood) para ver la producción de fluorescencia. Una luz brillante amarillo-verdosa constituye una prueba positiva. La presencia de burbujas de gas en la profundidad del medio indica que se ha producido nitrógeno por denitrificación y la superficie amarilla en el medio FLN señala que el microorganismo produjo ácido por utilización de la lactosa. En caldo, la formación de gas nitrógeno se detecta por la presencia de burbujas de gas en la parte superior del tubo de Durham invertido (lámina en color 7-2B).

VI. Bibliografía

Pickett MJ, Pedersen MM. Screening procedure for partial identification of nonfermentative bacilli associated with man. Appl Microbiol 1968;16:1631-1632.

* Para el caldo se omite el agar y se agregan tubos de Durham invertidos para detectar gas.

PROTOCOLO 7-4

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA

I. Principio

El medio de esculina sin bilis es útil para diferenciar varias especies de bacilos no fermentadores. La esculina es un glucósido sustituido que puede ser hidrolizado por ciertas bacterias para producir glucosa y esculetina. La esculina es un compuesto fluorescente bajo la luz ultravioleta de onda larga, a 360 nm. Cuando se hidroliza la esculina, la fluorescencia se pierde y el medio vira al negro, debido a la reacción de la esculetina con los iones férricos presentes en el medio. Varias especies de *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, así como *C. luteola*, *B. vesicularis*, *S. paucimobilis*, *S. maltophilia*, *R. radiobacter* y algunas especies de *B. cepacia*, *B. pseudomallei* y *O. anthropi* son esculina positivas.

II. Medios y reactivos

La fórmula del medio de esculina es la siguiente:

Agar esculina modificado:

Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar infusión corazón	40 g
Agua destilada csp	1 L

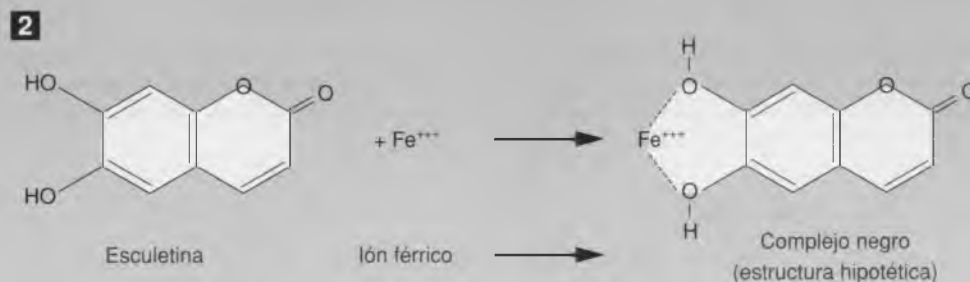
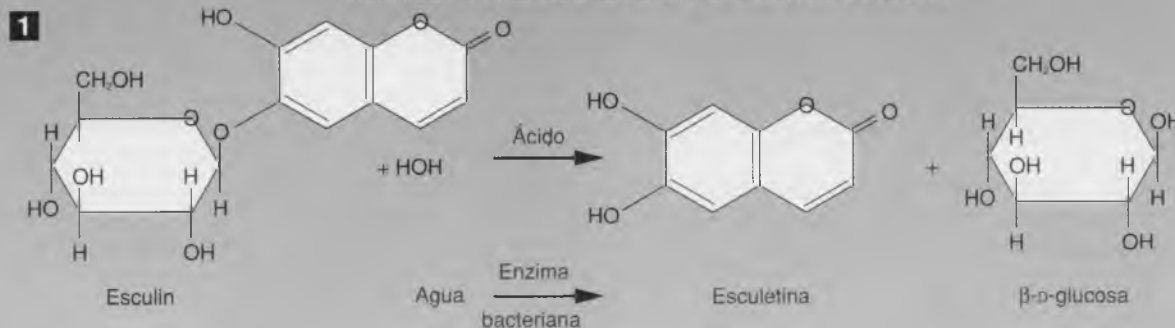
PROTOCOLO 7-4

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA (cont.)

Caldo esculina:

Infusión de músculo cardíaco	10 g
Digerido péptico de tejidos animales	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Esculina	1 g
Agua destilada csp	1 L

MECANISMO PROPUESTO DE LA REACCIÓN DE ESCULINA



III. Control de calidad

- A. Control positivo: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965.
 B. Control negativo: *P. aeruginosa* ATCC 27853.

IV. Procedimiento

Después de tocar el centro de una colonia bien aislada con un ansa o palillo de madera estériles, sembrar el microorganismo en la superficie del agar inclinado (pico de flauta) o en un tubo con caldo. Incubar 18 a 24 horas a 35 °C.

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color negro o la pérdida de fluorescencia bajo luz ultravioleta (360 nm) se interpreta como una prueba positiva. La presencia de fluorescencia o la ausencia de color negro se interpretan como una prueba negativa (lámina en color 7-2E).

VI. Bibliografía

- MacFadding JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980:4-12.
 Shigei J. Tests methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria. En: Isenberg HH, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. I. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992;1.19.38-1.19.40.

PROTOCOLO 8-1

PRUEBA CAMP

I. Principio

La identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos del grupo B puede hacerse por medio de la prueba CAMP, que es fiable y de realización sencilla. El fenómeno hemolítico fue descrito por primera vez en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Petersen, cuyos nombres proporcionan el acrónimo (CAMP) de la prueba.

La actividad hemolítica de la β -hemolisina causada por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* es intensificada por una proteína extracelular producida por los estreptococos del grupo B. La interacción de la β -hemolisina con este factor produce "hemólisis sinérgica", que puede observarse con facilidad en una placa de agar sangre. Este fenómeno se advierte tanto con los aislamientos hemolíticos como con los no hemolíticos de los estreptococos del grupo B.

II. Materiales

1. Cepa de *Staphylococcus aureus* productora de β -hemolisina.
2. Placa de agar sangre de carnero.

III. Control de calidad

- A. Control positivo: estreptococo del grupo B.
- B. Control negativo: estreptococo del grupo A.

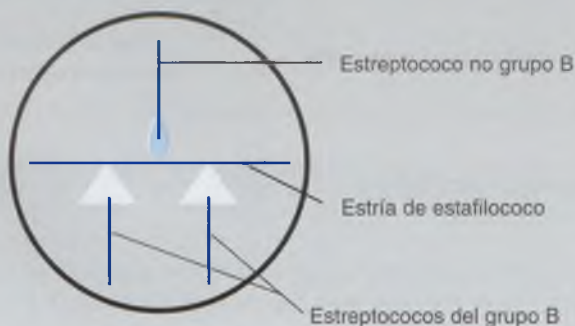
IV. Procedimiento

1. Hacer en el centro de una placa de agar sangre una sola estría en línea recta con *S. aureus* productor de β -hemolisina.
2. Teniendo cuidado de no tocar la estría del estafilococo, hacer una estría con los estreptococos β -hemolíticos por identificar, en forma perpendicular a la estría del estafilococo. Realizar estas estrías de tal manera que, después de la incubación, el desarrollo de los dos microorganismos no se junte. La estría de estreptococos debe ser de 3 a 4 cm de longitud. En la misma placa deben sembrarse en forma similar cepas conocidas de estreptococos del grupo A y del grupo B como controles negativo y positivo, respectivamente.
3. Incubar la placa a 35 °C en aire atmosférico durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

Como se ilustra más adelante, la zona de aumento de la hemólisis se observa en el punto en que se intersecan la β -hemolisina secretada por el estafilococo y el factor CAMP secretado por el estreptococo del grupo B. Cualquier estreptococo β -hemolítico resistente a la bacitracina, resistente a trimetoprim-sulfametoxazol y positivo en la prueba de CAMP, puede informarse como "estreptococo β -hemolítico presumiblemente grupo B por prueba de CAMP".



VI. Limitaciones

Algunos estreptococos del grupo A serán positivos en la prueba de CAMP si la placa se incubó en una jarra de anaerobiosis por extinción con vela, en atmósfera de CO_2 o en condiciones de anaerobiosis. Por lo tanto, la incubación debe realizarse en aire atmosférico.

PROTOCOLO 9-1

PRUEBA DE REQUERIMIENTOS DE FACTORES X Y V

I. Principio

El factor X (hemina, hematina) y el factor V (NAD) son necesarios, ya sea solos o en combinación, para facilitar el crecimiento de diferentes especies de *Haemophilus* en agar. Se comercializan tiras o discos de papel de filtro impregnados con factor X y con factor V. Los factores X y V son hidrosolubles y por eso se difunden con facilidad en medios de agar. Las tiras o discos de papel de filtro impregnados con estos factores se colocan sobre la superficie de un medio deficiente en ellos, como agar tripticasa soja o agar infusión de cerebro y corazón, que han sido sembrados en superficie con el microorganismo por probar. Los requerimientos del microorganismo para cada factor se determinan después de una noche de incubación, observando los patrones de crecimiento alrededor de las tiras o discos de papel (véase la ilustración siguiente).

II. Medios y reactivos

1. Tiras o discos de papel de filtro impregnados con factores X y V.
2. Un medio sólido deficiente en factores X y V. El agar tripticasa soja o el agar infusión de cerebro y corazón son adecuados.
3. Caldo infusión de cerebro y corazón.

III. Control de calidad

- A. *Haemophilus parainfluenzae*: requiere solamente factor V.
- B. *Haemophilus influenzae*: requiere tanto factor X como V.

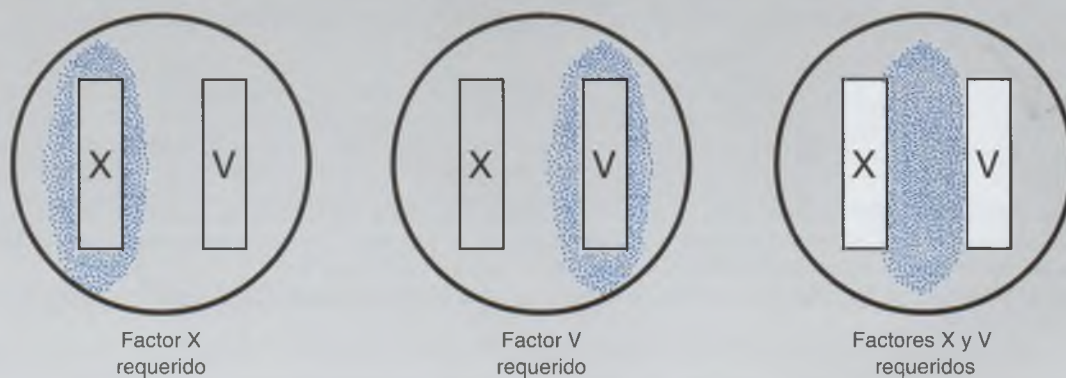
IV. Procedimiento

1. Preparar una suspensión poco densa en el caldo infusión de cerebro y corazón de un cultivo puro del microorganismo por identificar. Cuando se transfiere el cultivo hay que tener cuidado de no tomar ninguna porción del medio con hemina de la placa de cultivo. Con esta suspensión, sembrar en superficie el medio sólido deficiente en factores.
2. Colocar una tira de factor X y una de factor V sobre la superficie del agar en la zona de siembra.
3. Colocar las tiras con una separación aproximada de 1 cm.
4. Incubar la placa en CO₂ al 3-5% y 35 °C durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

Inspeccionar la superficie del agar en busca de crecimiento visible entre o alrededor de una o más de las tiras o discos. Los siguientes patrones indican la necesidad de factor X solo (*izquierda*), de factor V solo (*centro*) o de ambos (*derecha*):



VI. Bibliografía

Parker RH, Hoeprieh PD. Disk method for rapid identification of *Haemophilus* sp. Am J Clin Pathol 1963;37:319-327.

PROTOCOLO 11-1

PRUEBA DE UTILIZACIÓN RÁPIDA DE HIDRATOS DE CARBONO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *NEISSERIA*

I. Principio

Las pruebas rápidas de utilización de hidratos de carbono han suplantado en su mayor parte el uso del agar semisólido de cistina-digerido triptico con hidratos de carbono para la identificación de especies de *Neisseria*. El procedimiento descrito aquí es una modificación del detallado en *Cumitech 4*, de la American Society for Microbiology.

La prueba de utilización rápida de hidratos de carbono emplea una solución equilibrada de buffer de fosfatos que contiene rojo fenol como indicador. Se fraccionan alícuotas pequeñas (de 0,10 mL) del buffer en una serie de tubos estériles, uno para cada hidrato de carbono por probar. Se agrega una gota de cada hidrato de carbono (al 20% p/v) a cada tubo. Se prepara una suspensión densa del microorganismo en buffer sin hidratos de carbono y se agrega una gota de esta suspensión a cada tubo con hidratos de carbono. Después de 4 horas de incubación, se leen las reacciones. La producción de ácido de los hidratos de carbono se observa por un cambio de color del indicador rojo fenol, del rojo al amarillo.

II. Medios y reactivos

A. Solución amortiguadora (buffer) de fosfatos equilibrada (BBS): solución madre 10 × con la siguiente fórmula:

K₂HPO₄	0,40 g
KH₂PO₄	0,10 g
KCl	8 g
Agua destilada	100 mL

Esterilizar por filtración y almacenar entre 4 y 8 °C.

B. Solución de trabajo

Agregar 10 mL de BBS 10× a 90 mL de agua destilada. Después de esto se agregan 0,5 a 0,8 mL de una solución acuosa al 1% de rojo fenol a la solución, de modo que el producto final tenga un color "rojo cereza". Esta solución de trabajo se esteriliza luego por filtración. Para asegurarse de que el agua tiene el pH adecuado, se recomienda el uso de agua destilada de grado farmacéutico.

C. Soluciones madre de hidratos de carbono

Pesar 10 g de glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa (y, si se desea, fructosa) por separado. Disolver cada una de ellas en 50 mL de agua destilada. Las soluciones se esterilizan por filtración, se fraccionan en frascos ampolla estériles y se congelan a -20 °C. Es importante utilizar hidratos de carbono de grado analítico, debido a que la maltosa proveniente de ciertos proveedores de medios para bacteriología puede estar contaminada con glucosa. Los hidratos de carbono pueden obtenerse de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), Fisher Scientific Company (Fairlawn, NJ) o de Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO).

III. Control de calidad

- A. Glucosa positivo: *N. gonorrhoeae*.
- B. Maltosa positivo: *N. meningitidis*.
- C. Lactosa positivo: *N. lactamica*.
- D. Sacarosa y fructosa positivo: *N. mucosa*.

IV. Procedimiento

1. Se marca una serie de tubos estériles de 12 × 75 mm con el nombre del azúcar por probar. Por lo general, se prueba glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa. Algunos laboratorios también incluyen fructosa en la serie de pruebas. Se incluye un tubo adicional, marcado con el número de aislamiento de la muestra, para la preparación del inóculo.
2. Se agrega a cada uno de los tubos para hidratos de carbono 0,10 mL de BSS de trabajo. En el tubo del inóculo se colocan 0,30 a 0,40 mL de BSS.
3. Se agrega una sola gota del hidrato de carbono correspondiente a cada uno de los tubos marcados, con una pipeta de Pasteur.
4. Con un ansa bacteriológica estéril se prepara una suspensión densa del microorganismo por probar en el tubo inóculo. El inóculo se prepara de un subcultivo puro de 18 a 24 horas en agar chocolate del microorganismo. La suspensión del inóculo se agita con cuidado con una agitadora mecánica para obtener una suspensión densa y uniforme.
5. Se agrega una gota de inóculo a cada uno de los tubos que contienen hidratos de carbono. Los tubos se agitan brevemente para asegurar una mezcla completa y se colocan en baño María o estufa a 35 °C durante 4 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color amarillo en cualquiera de los tubos que contienen hidratos de carbono indica que el microorganismo utilizó ese hidrato de carbono. Las pruebas negativas permanecen de color rojo o naranja rojizo.

VI. Bibliografía

- Janda WM. Identification of *Neisseria* species and *Branhamella catarrhalis*. En: Identification of Aerobic Gram-Positive and Gram-Negative Cocci. Washington DC: American Society for Microbiology, 1986:115-131.
- Kellogg DS, Holmes KK, Hill GA. Cumitech 4. En: Marcus S, Sherris JC, eds. Laboratory Diagnosis of Gonorrhea. Washington DC: American Society for Microbiology, 1976.

PROTOCOLO 12-1

PRUEBA DE FURAZOLIDONA CON DISCOS

I. Principio

Hay varios métodos para diferenciar estafilococos de micrococcos (cuadro 12-1). Uno de ellos es la sensibilidad al compuesto furoxona (también denominado furazolidona). La prueba se realiza como otros procedimientos de sensibilidad con discos: los estafilococos son sensibles a este compuesto, en tanto que los micrococcos son resistentes.

II. Reactivos

1. Discos de furazolidona de 100 µg (FX 100, BD Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ).
2. Placa con agar sangre de carnero.

III. Control de calidad

Con cada lote nuevo de discos, o semanalmente, deben probarse cepas conocidas de *Staphylococcus* (ya sea *S. aureus* o una cepa coagulasa negativa) y especies de *Micrococcus*.

IV. Procedimiento

1. Preparar una suspensión del microorganismo por probar en agua destilada o caldo estériles. La suspensión debe tener una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland.
2. Con un hisopo, distribuir la suspensión sobre la mitad de una placa de agar sangre.
3. Colocar en forma aséptica un disco FX en el centro de la zona sembrada y presionarlo con suavidad para que se adhiera a la superficie del agar.
4. Incubar la placa a 35 °C en una estufa con aire atmosférico durante 18 a 24 horas.

V. Resultados

A. Interpretación

1. Las especies de *Micrococcus* son resistentes al FX y presentarán halos de inhibición de 6 mm (ausencia de halo) a 9 mm.
2. Las especies de *Staphylococcus* son sensibles al FX y presentarán halos de inhibición de 15 mm o mayores.

PROTOCOLO 12-2

PRUEBA DE LA NOVIOBICINA

I. Principio

Los estafilococos coagulasa negativos pueden dividirse en especies sensibles y resistentes a la novobiocina. Entre las especies resistentes, *S. saprophyticus* es el único que suele aislarse en muestras humanas como causante de infecciones urinarias. Por lo tanto, el cribado de los estafilococos coagulasa negativos aislados en cultivos cuantitativos de orina en lo que respecta a la sensibilidad a la novobiocina proporciona una identificación presuntiva fiable de esta especie.

II. Reactivos

1. Discos de novobiocina de 5 µg (NB 5, BD Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ).
2. Placa de agar sangre de carnero.

III. Control de calidad

Debe probarse una cepa conocida de *S. saprophyticus* y una de *S. epidermidis* con cada nuevo lote de discos de novobiocina o una vez por semana.

IV. Procedimiento

1. Preparar una suspensión del microorganismo por identificar en agua destilada o caldo estériles.
2. La suspensión debe tener una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland.
3. Con un hisopo estéril, distribuir parte de la suspensión sobre la mitad de la placa de agar sangre.
4. Colocar en forma aséptica un disco de novobiocina sobre la zona sembrada. Puede determinarse la sensibilidad a la furazolidona (véase protocolo 12-1) en la misma placa, colocando los discos sobre la zona sembrada, separados aproximadamente 4 cm. Presionar con suavidad el o los discos con pinzas estériles para asegurar el contacto con la superficie del agar.
5. Incubar la placa en aerobiosis durante 18 a 24 horas a 35 °C.

V. Resultados

A. Interpretación

1. *S. saprophyticus* es resistente a la novobiocina y presentará halos de inhibición de 6 mm (ausencia de halo) a 12 mm.
2. Otros estafilococos coagulasa negativos y *S. aureus* son sensibles a la novobiocina y presentarán halos de 16 mm o mayores.

PROTOCOLO 13-1

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA Y SXT

I. Principio

La sensibilidad a bajas concentraciones del antibiótico polipeptídico bacitracina y a la combinación de sulfonamidas trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) proporciona un método sencillo y económico para la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos de los grupos A y B. Aunque aún se utiliza en muchos laboratorios, esta prueba se ha reemplazado ampliamente por procedimientos serológicos fiables y bastante económicos.

Los estreptococos del grupo A son sensibles a concentraciones relativamente bajas de bacitracina y resistentes a la SXT. Los estreptococos del grupo B son resistentes a ambos antibióticos. Otros estreptococos β -hemolíticos muestran sensibilidad variable a la bacitracina, pero estos microorganismos suelen ser sensibles a la SXT. Por lo tanto, la realización de la prueba para SXT junto con la prueba de la bacitracina aumenta la sensibilidad y el valor pronóstico de la prueba de la bacitracina.

II. Reactivos

- A. Placa con agar sangre de carnero.
- B. Discos diferenciales de bacitracina Taxo "A" (0,04 unidades/disco).
- C. Discos de SXT (trimetoprim-sulfametoxazol, 1,25 μ g/23,75 μ g).

III. Control de calidad

- A. Bacitracina S, SXT R: estreptococo del grupo A.
- B. Bacitracina R, SXT R: estreptococo del grupo B.
- C. Bacitracina S o R, SXT S: estreptococo β -hemolítico, grupos C, F o G.

IV. Procedimiento

1. Tomar tres o cuatro colonias aisladas del estreptococo β -hemolítico y sembrar en estría el inóculo en el centro de la mitad de una placa de agar sangre.
2. Con un hisopo estéril o un ansa diseminar el inóculo formando una capa sobre toda la mitad de la placa.
3. Colocar en forma aséptica un disco de bacitracina Taxo "A" y un disco de SXT sobre la zona sembrada. Asegurarse de que los discos estén igualmente separados. Utilizando pinzas flameadas, golpear con suavidad los discos para que se adhieran a la superficie del agar.
4. Incubar la placa en aire ambiente a 35 °C.

V. Resultados

A. Interpretación

1. Sensible (S): cualquier tamaño de halo alrededor de cualquiera de los discos.
2. Resistente (R): desarrollo hasta el borde del disco.

Bacitracina	STX	Identificación
S	R	Presumiblemente grupo A
R	R	Presumiblemente grupo B
S/R	S	Ni A ni B

3. Los resultados deben informarse como "estreptococo β -hemolítico, presumiblemente grupo A, por prueba de bacitracina-SXT" o "estreptococo β -hemolítico, presumiblemente no grupo A, por prueba de bacitracina-SXT".
4. Como estas pruebas suelen realizarse sobre aislamientos de fauces, en los cuales se sospecha la presencia de estreptococos del grupo A, la presunción de grupo B por lo general no se informa.

VI. Limitaciones de la prueba

Deben probarse sólo los estreptococos β -hemolíticos, ya que muchos estreptococos α -hemolíticos (incluidos los neumococos) son sensibles a bajas concentraciones de bacitracina.

No se dispone de datos que indiquen que deben medirse los halos de inhibición. La interpretación a la sensibilidad a SXT puede ser difícil, ya que los microorganismos pueden desarrollarse ligeramente antes de que haya inhibición total del crecimiento.

La capa del inóculo bacteriano debe ser confluyente. Un inóculo demasiado diluido puede hacer que los estreptococos no pertenecientes al grupo A parezcan sensibles a la bacitracina.

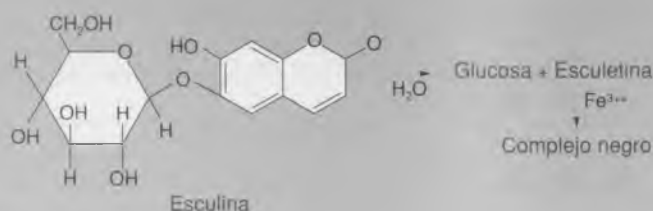
PROTOCOLO 13-2

PRUEBA DE LA BILIS ESCULINA

I. Principio

La prueba de la bilis esculina se basa en la capacidad de ciertas bacterias, en particular los estreptococos del grupo D y especies de *Enterococcus*, de hidrolizar la esculina en presencia de bilis (4% de sales biliares o 40% de bilis). La esculina es un derivado glucosídico de la cumarina (6- β -glucósido-7-hidroxicumarina). Los dos residuos de la molécula (glucosa y 7-hidroxicumarina) se encuentran unidos por una unión éster de oxígeno. Para esta prueba la esculina se incorpora en un medio que contenga 4% de sales biliares.

Las bacterias bilis esculina positivas son, ante todo, capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares. La hidrólisis de la esculina en el medio da como resultado la formación de glucosa y un compuesto denominado esculetina. Ésta a su vez reacciona con los iones férricos (aportados por el componente inorgánico del medio, el citrato férrico) para formar un complejo negro que se difunde.



II. Materiales

A. Medio

El medio de agar bilis esculina se prepara en un tubo inclinado (pico de flauta) o en placas; tiene la siguiente fórmula:

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Bilis	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH = 7,0

III. Control de calidad

A. Control positivo: especies de *Enterococcus* (p. ej., *E. faecalis*).

B. Control negativo: estreptococo del grupo viridans, no grupo D.

IV. Procedimiento

1. Con un ansa o aguja de siembra tomar dos o tres colonias morfológicamente similares de estreptococos y sembrar el pico de flauta del medio bilis esculina con un movimiento en S, o sembrar en estría la superficie de una placa de bilis esculina para obtener colonias aisladas.

2. Incubar el tubo o placa a 35 °C durante 24–48 horas en estufa con aire atmosférico.

V. Resultados

A. Interpretación

El ennegrecimiento difuso de más de la mitad del pico de flauta dentro de las 24–48 horas indica hidrólisis de la esculina. En las placas se observarán halos negros alrededor de las colonias aisladas y cualquier grado de ennegrecimiento se considera positivo.

Todos los estreptococos del grupo D son bilis esculina positivos en el término de 48 horas.

VI. Limitaciones de la prueba

Algunos estreptococos del grupo viridans (aproximadamente el 3%) también pueden hidrolizar la esculina en presencia de bilis.

PROTOCOLO 13-3

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA

I. Principio

El clorhidrato de etildihidrocupreína (optoquina), un derivado de la quinina, inhibe en forma selectiva el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* en muy bajas concentraciones (5 µg/mL o menos). Asimismo, la optoquina puede inhibir otros estreptococos del grupo viridans, pero sólo en concentraciones mucho más altas. La prueba tiene una sensibilidad de más del 95%, es sencilla de realizar y barata.

La optoquina es soluble en agua y se difunde con facilidad en agar. Por lo tanto, pueden utilizarse discos de papel de filtro impregnados con optoquina en una prueba de difusión con discos para determinar la sensibilidad de presuntos neumococos y, por medio de ella, confirmar su identidad. Las células de *S. pneumoniae* que rodean el disco se lisan debido a los cambios de tensión superficial y se produce un halo de inhibición.

II. Medios y reactivos

1. Colonias bien aisladas en agar sangre de carnero del microorganismo por probar.
2. Placa de agar sangre de carnero.
3. Discos de optoquina (5 µg): Bacto Differentiation Disks, Optochin (Difco), discos Taxo "P" (BD Microbiology).
4. Los discos deben conservarse a 4 °C mientras no se utilizan.

III. Control de calidad

- A. Control positivo: *Streptococcus pneumoniae*.
- B. Control negativo: estreptococos del grupo viridans o *Enterococcus faecalis*.

IV. Procedimiento

1. Seleccionar con un ansa común o recta tres o cuatro colonias bien aisladas del microorganismo por probar y sembrarlas en estría sobre una mitad a un tercio de la placa de agar sangre. La zona sembrada debe ser de alrededor de 3 cm².
2. Colocar un disco de optoquina en el tercio superior del área sembrada. Presionar el disco con pinzas flameadas de tal forma que el disco se adhiera con firmeza a la superficie del agar.
3. Incubar la placa a 35 °C durante 18 a 24 horas en jarra de anaerobiosis por extinción con vela o en estufa con 5-7% de CO₂.

V. Resultados

A. Interpretación

Un estreptococo del grupo viridans puede identificarse en forma presuntiva como *S. pneumoniae* si muestra un halo de inhibición de 14 mm o más alrededor de un disco de 6 mm (Taxo A) o una zona de 16 mm o más alrededor de un disco de 10 mm (Bacto).

Los microorganismos con halos menores que los mencionados deben ser probados para determinar su solubilidad en bilis.

VI. Limitaciones del procedimiento

En ocasiones, los estreptococos viridans muestran pequeños halos de inhibición alrededor de los discos de optoquina. Sin embargo, estos microorganismos no son solubles en bilis.

PROTOCOLO 13-4

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL

I. Principio

La capacidad de desarrollarse en presencia de cantidades variables de cloruro de sodio (NaCl) es una prueba utilizada para caracterizar varias bacterias, entre ellas los estreptococos del grupo viridans. Sin embargo, es de particular utilidad para la identificación presuntiva de los microorganismos pertenecientes a los enterococos del grupo D, que tienen la capacidad específica de desarrollarse en presencia de NaCl al 6.5% incorporado a caldo o agar. Esta prueba, junto con la de bilis esculina, se utiliza en muchos laboratorios para distinguir las especies de *Enterococcus* de los estreptococos del grupo D, *S. bovis* y *S. equinus*.

El caldo infusión de corazón es un caldo nutritivo de uso general que se utiliza para el cultivo de muchas bacterias. Normalmente contiene 0.5% de NaCl. Si se aumenta la concentración del NaCl al 6.5% el medio se hace semiselectivo para el desarrollo de enterococos.

II. Medio

1. El caldo con 6.5% de NaCl tiene la siguiente fórmula:

Caldo infusión de corazón	25 g
Cloruro de sodio	60 g
Indicador (1,6 g de púrpura de bromocresol en 100 mL de etanol al 95%)	1 mL
Glucosa	1 g
Agua destilada	1 L

PROTOCOLO 13-4

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL (cont.)

2. Puede omitirse el indicador.
 3. Fraccionar en tubos, en volúmenes de 3 a 5 mL, y colocar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- III. Control de calidad
- A. Desarrollo positivo: *Enterococcus faecalis*.
 - B. Desarrollo negativo: *Streptococcus bovis*.
- IV. Procedimiento
1. Inocular dos o tres colonias en el caldo.
 2. Incubar toda la noche a 35 °C en estufa con aire ambiente.
- V. Resultados
- A. Interpretación
Una prueba positiva se manifiesta por la presencia de desarrollo bacteriano evidente en el medio, con cambio de color del indicador o sin él. Si el microorganismo es bilis esculina positivo y se desarrolla en el caldo con 6,5% de NaCl, es una especie de *Enterococcus*. Si es bilis esculina positivo, pero no se desarrolla en el caldo con NaCl al 6,5%, es un estreptococo del grupo D.
- VI. Limitaciones del procedimiento
1. Si el medio se siembra con una cantidad excesiva de bacterias, el inóculo puede ser confundido con desarrollo, lo que da resultados falsos positivos.
 2. Para evitar la interpretación errónea de la prueba como negativa, agitar con suavidad el tubo antes de la lectura, ya que el desarrollo puede sedimentar durante la incubación.
 3. Hasta el 80% de los estreptococos del grupo B pueden ser tolerantes a la sal, así como ocasionales aislamientos de estreptococos del grupo A. Los aerococos también pueden ser bilis esculina positivos y desarrollarse en NaCl al 6,5%.

PROTOCOLO 14-1

COLORACIÓN DE AZUL DE METILENO DE LOEFFLER

I. Principio

El azul de metileno es una coloración simple muy útil para la identificación de especies de *Corynebacterium*.

Los gránulos metacromáticos de *C. diphtheriae* toman con facilidad el azul de metileno y aparecen con un color azul intenso. Aunque algunos autores han sostenido que la formación de gránulos citoplasmáticos característicos de *C. diphtheriae* se ve rara vez en las especies saprófitas de *Corynebacterium*, este criterio es poco fiable y no puede utilizarse para la identificación definitiva de *C. diphtheriae* sin realizar otros estudios.

II. Medios y reactivos

Azul de metileno (contenido de colorante del 80%)	0,3 g
Alcohol etílico (95%)	30 mL
Agua destilada	100 mL

III. Procedimiento

1. Fijar el frotis por calor. Cubrir su superficie con la solución colorante de azul de metileno durante un minuto. Lavar el portaobjetos con agua y secar con papel.
2. En el pasado era necesario agregar un álcali a la solución antes de usar. Sin embargo, los colorantes de azul de metileno preparados en los últimos años no requieren este paso adicional porque las impurezas ácidas encontradas en los antiguos colorantes han sido eliminadas.

IV. Resultados

A. Interpretación

Las corinebacterias son bacilos pleomorfos de tamaño variable, entre 0,5 a 1 µm de espesor y de 2 a 6 µm de longitud, con forma de bastones rectos, curvos o en forma de maza. Son característicos de estos microorganismos los gránulos metacromáticos que toman el azul de metileno y aparecen de un color azul intenso. Aunque este hallazgo es típico de las corinebacterias, algunas especies de *Propionibacterium*, algunos actinomicetos, las cepas pleomorfas de estreptococos y otras bacterias, también pueden ser similares morfológicamente a las corinebacterias y deben ser diferenciadas por otras características de cultivo y bioquímicas.

PROTOCOLO 14-2

MEDIO CON SUERO DE LOEFFLER

I. Principio

El medio con suero de Loeffler se utiliza fundamentalmente para el aislamiento de *C. diphtheriae* de muestras clínicas. Debido a su contenido de suero, el medio también puede utilizarse en forma más general para determinar la actividad proteolítica de diversos microorganismos.

C. diphtheriae produce células con morfología característica en el medio de Loeffler. El medio también es útil para la determinación de producción de pigmento por parte de algunas bacterias.

II. Medios y reactivos

A. Fórmula

Suero bovino	70 g/L
Caldo infusión dextrosa (en polvo)	2,5 g/L
Huevo (entero desecado)	7,5 g/L
pH final = 7,6	

B. Preparación

1. Para rehidratar el medio, disolver 80 g de medio de Loeffler (BBL) en 1 L de agua destilada y calentar hasta 42 a 45 °C. El polvo se agrega en forma gradual mientras se hace rotar con suavidad el frasco, para reducir al mínimo la mezcla con aire de la suspensión.
2. El medio se fracciona en tubos y se coagula-esteriliza en el autoclave de la siguiente forma:
 - a. Una vez que la suspensión es uniforme, se fracciona en tubos.
 - b. Disponer los tubos en forma inclinada, en pilas de no más de cuatro, con varias capas de papel de diario o toallas de papel por encima y debajo para evitar la coagulación rápida.
 - c. Cerrar herméticamente el autoclave, prenderlo y dejar que la presión de vapor se mantenga en 10 psi durante 20 minutos.
 - d. Durante este tiempo no permitir la salida de aire ni de vapor.
 - e. Regular la válvula de entrada del vapor y abrir la de salida de aire, de manera de mantener la presión de 10 psi. Los cambios bruscos de presión pueden formar burbujas en el medio.
 - f. Cerrar la válvula de salida cuando todo el aire haya sido reemplazado por vapor, permitir que la presión alcance 15 psi y mantenerla así durante 15 minutos.
 - g. Dejar que el autoclave se enfríe lentamente. Los picos de flauta, cuando se preparan en forma adecuada, son lisos y de un color blanco grisáceo. Los tubos deben incubarse antes de la siembra a 35 °C durante 24 horas como control de esterilidad.

III. Procedimiento

1. Cuando se sospecha *C. diphtheriae*, sembrar el medio de Loeffler lo antes posible después de la toma de la muestra.
2. Revisar los tubos en pico de flauta en busca de desarrollo después de 8 a 24 horas de incubación.
3. Preparar frotis y colorear con azul de metileno.

IV. Resultados

A. Interpretación

Para la interpretación de estos frotis teñidos, véase protocolo 14-1.

V. Comentario

Debido a que el medio de Loeffler es difícil de preparar, se recomienda su adquisición en el comercio en tubos sellados.

VI. Bibliografía

BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5ª ed. Cockeysville MD: BBL, Division of Becton, Dickinson, and Co, 1973:118-119.

Buck T. A modified Loeffler's medium for cultivating *Corynebacterium diphtheriae*. J Lab Clin Med 1949;34:582-583.

PROTOCOLO 14-3

AGAR DE TINSDALE (MODIFICACIÓN DE MOORE Y PARSONS)

I. Principio

El medio de Tinsdale sustenta el desarrollo de todas las especies de *Corynebacterium* y simultáneamente inhibe el crecimiento de los habitantes normales de las vías respiratorias altas. Moore y Parsons modificaron la fórmula original de Tinsdale simplificando su composición, pero reteniendo la especificidad para el aislamiento de *C. diphtheriae* y *C. ulcerans*.

El telurito de potasio se deposita dentro de las colonias de *Corynebacterium*, tornándolas de color negro. El medio de Tinsdale consta de cistina telurito tiosulfato de sodio, que es de utilidad específica para la identificación de *C. diphtheriae*, cuyas colonias se encuentran rodeadas por un halo marrón (véase lámina en color 14-2F).

II. Medios y reactivos

A. Fórmula (base de Tinsdale modificada)

Peptona tiotona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	14 g
L-cistina	0,24 g
Tiosulfato de sodio	0,24 g
Agua destilada	1 L

B. Preparación

1. Suspender 39 g de polvo en 1 L de agua destilada y calentar mientras se agita. Hervir durante 1 minuto. Colocar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
2. Enfriar la base modificada a 50 °C y agregar:

Suero bovino estéril	100 mL
Solución de telurito al 1%	30 mL

3. Verter 15 a 20 mL de este medio en placas de Petri y dejar solidificar.
4. El medio base de Tinsdale sin suero ni telurito es estable indefinidamente si se almacena en tubos o frascos cerrados con tapa de rosca. Sin embargo, después del agregado de suero y telurito el medio suele ser estable sólo durante 2 o 3 días en frigorífico.

III. Procedimiento

Sembrar la placa en estría de modo de obtener colonias bien aisladas. Se recomienda hacer punciones en el agar a intervalos, porque el cambio al color marrón del medio puede detectarse antes en las zonas punzadas.

IV. Resultados

A. Interpretación

La presencia de un halo marrón alrededor de la colonia se considera evidencia presuntiva de *C. diphtheriae*. Este halo se ve a veces después de 10 a 12 horas de incubación, aunque pueden necesitarse 48 horas para que aparezcan los halos típicos de color marrón oscuro. La única especie relacionada, diferente del *C. diphtheriae*, que produce estos halos es *C. ulcerans*. Otras bacterias, como los estafilococos coagulasa positivos, crecen bien en este medio, pero no presentan halo marrón. Las bacterias que producen un fuerte ennegrecimiento difuso del medio, como las especies de *Proteus*, pueden distinguirse por la coloración de Gram y las características bioquímicas.

V. Bibliografía

- Moore MS, Parsons EI. A study of modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. J Infect Dis 1958;102:88-93.
- Tinsdale GFW. A new medium for the isolation and identification of *C. diphtheriae* based on production of hydrogen sulfide. J Pathol Bacteriol 1947;59:61-66.

PROTOCOLO 14-4

AGAR SANGRE CISTINA TELURITO

I. Principio

El agar sangre cistina telurito es un medio utilizado para el aislamiento primario de *Corynebacterium diphtheriae*. Tiene algunas ventajas en comparación con el medio de Tinsdale, ya que es de preparación más sencilla y dura más.

El telurito de potasio presente en este medio inhibe el desarrollo de la mayoría de las bacterias que normalmente habitan las vías respiratorias altas, como la mayor parte de las cepas de *Streptococcus* y *Staphylococcus*. *C. diphtheriae* se desarrolla bien, con producción de colonias grisáceas o negras después de 24 a 48 horas de incubación.

II. Medios y reactivos

A. Fórmula

Agar infusión de corazón, solución al 2%	100 mL
Telurito de potasio, solución al 0,3%	15 mL
L-cistina	5 mg
Sangre de carnero	5 mL

B. Preparación

Fundir la solución estéril de agar infusión de corazón y enfriar a 45 o 50 °C. Mantener con cuidado esta temperatura mientras se realizan los siguientes pasos. Agregar en condiciones de asepsia la solución estéril de telurito de potasio (esterilizada antes en autoclave) y la sangre de carnero. Mezclar bien. Agregar la cistina en polvo, mezclar bien y verter el medio en placas de Petri estériles. Rotar la frasco con frecuencia mientras se vierten las placas, porque la cistina no se solubiliza totalmente.

III. Procedimiento

Sembrar la placa en estrías con el material clínico por cultivar para obtener colonias bien aisladas.

IV. Resultados

A. Interpretación

C. diphtheriae desarrolla colonias grises o negras después de 24 a 48 horas de incubación. En forma ocasional, las colonias de esta-filococos no inhibidos por el medio también aparecen negras; sin embargo, pueden distinguirse por su reacción característica con la coloración de Gram.

Pueden distinguirse tres biotipos de *C. diphtheriae* en agar sangre telurito cistina: 1) las colonias del biotipo *gravis* son planas, de color gris oscuro, con estrías radiales, secas y de bordes irregulares; 2) las colonias del biotipo *mitis* son pequeñas, negras, brillantes y convexas, con bordes lisos y aspecto húmedo; 3) las colonias del biotipo *intermedius* son pequeñas y planas, con un centro negro elevado.

V. Bibliografía

Frobisher M Jr. Cystine-tellurite agar for *C. diphtheriae*. J Infect Dis 1937;60:99-105.

PROTOCOLO 15-1

HIDRÓLISIS DE LA XANTINA, HIPOXANTINA, TIROSINA Y CASEÍNA

I. Principio

Los actinomicetos aerobios pueden caracterizarse por su capacidad de hidrolizar xantina, hipoxantina, tirosina y caseína. Estos compuestos se incorporan al agar nutritivo y sobre su superficie se siembran grandes cantidades de microorganismos. Los resultados se leen observando el aclaramiento del medio por debajo y alrededor del desarrollo bacteriano, que indica hidrólisis.

II. Medios y reactivos

A. Suspensiones de xantina, hipoxantina y tirosina.

1. Medio basal

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

PROTOCOLO 15-1

HIDRÓLISIS DE LA XANTINA, HIPOXANTINA, TIROSINA Y CASEÍNA (cont.)

2. Suspensiones

Tirosina	0,5 g
Xantina	0,4 g
Hipoxantina	0,4 g
Agua destilada	100 mL

Calentar el medio basal para disolver los ingredientes y fraccionar en alícuotas de 100 mL en frascos de 250 mL. Esterilizar en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Dejar enfriar el medio hasta que esté casi solidificado. Agregar a cada frasco 10 mL de suspensiones de xantina, hipoxantina o tirosina. Las suspensiones se esterilizan en autoclave antes de agregarlas al medio basal. Es esencial que los gránulos de xantina, hipoxantina y tirosina se mantengan en suspensión hasta que el medio se solidifique; por lo tanto, el agregado de los gránulos de las sustancias bioquímicas y el vertido del medio en las placas de Petri deben hacerse en el momento en que el medio basal se ha enfriado casi hasta la solidificación. Los medios se vierten en placas de Petri estériles de 15 × 100 mm.

3. Medio de caseína

a. Solución A

(1) Leche descremada (polvo)	10 g
(2) Agua destilada	100 mL

b. Solución B

(1) Agar	2,0 g
(2) Agua destilada	100 mL

Colocar las soluciones A y B por separado en el autoclave, dejar enfriar hasta aproximadamente 50 °C, mezclarlas y verter en placas de Petri estériles de 15 × 100 mm.

III. Control de calidad

A. Control negativo: *Nocardia asteroides*.

B. Control positivo: especies de *Streptomyces*.

IV. Procedimiento

Cada placa de xantina, hipoxantina, tirosina y caseína se divide habitualmente en tercios en forma sectorial, lo que permite contar con una zona para sembrar un control positivo y uno negativo junto al microorganismo por identificar. Las placas se incuban a 30 °C y se leen a los siguientes tiempos:

A. Hidrólisis de la caseína: leer después de 2 semanas.

B. Hidrólisis de la xantina: leer después de 3 semanas.

C. Hidrólisis de la hipoxantina: leer después de 3 semanas.

D. Hidrólisis de la tirosina: leer después de 3 semanas.

V. Interpretación

La hidrólisis de la caseína se evidencia por un aclaramiento completo, hasta la transparencia, del medio originalmente blanco y lechoso. Las otras tres hidrólisis se leen observando la disolución de los compuestos cristalinos alrededor de las colonias que se desarrollan en el medio.

VI. Bibliografía

Gordon RE, Mihm JM. Identification of *Nocardia caviae* (Erickson) nov. comb. Ann NY Acad Sci 1962;98:628-636.

PROTOCOLO 17-1

PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCOS (BAUER-KIRBY) PARA BACTERIAS SIN REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES

I. Principio

Un comité del Clinical Laboratory Standards Institute (antes National Committee for Clinical Laboratory Standards) ha evaluado y revisado continuamente el procedimiento de difusión con discos. El establecimiento de una prueba estándar nacional para la difusión con discos no sólo ha permitido un control de calidad más exacto, sino también una comparación válida de los resultados entre diferentes laboratorios que utilizan este procedimiento. El comité publica actualizaciones periódicas con nueva información y los cambios sugeridos por los usuarios. Es importante mantener la actualización del procedimiento. Este protocolo resume el procedimiento básico; consultar el documento del Clinical Laboratory Standards Institute que figura en la Bibliografía para ver las variaciones que se usan para probar bacterias con requerimientos nutricionales especiales.

El principio del procedimiento de difusión con discos se describe en el texto. El diámetro de los halos que se forman con la prueba no tiene sentido sin referencia a los correlatos y guías interpretativas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) publicados por el Clinical Laboratory Standards Institute.

II. Medios y reactivos

- A. Aislamiento bacteriano proveniente de un proceso infeccioso.
- B. Caldo nutritivo (se recomienda caldo soja digerido de caseína) para el desarrollo del inóculo.
- C. Estándar 0,5 de McFarland para ajustar la turbidez del inóculo.
- D. Agitadora vorticial para suspender el inóculo.
- E. Caja visora para la comparación del caldo con el estándar. Puede utilizarse un fotómetro si se demuestran resultados satisfactorios.
- F. Placas de agar de Mueller-Hinton (de 100 mm de diámetro para 5 discos como máximo; de 150 mm para 12 discos como máximo) provenientes de un lote que produzca resultados satisfactorios en el control de calidad. El pH debe ser de 7.2 a 7.4 y la profundidad del agar de aproximadamente 4 mm.
- G. Calibres, regla o patrón para medir los diámetros de los halos de inhibición.

III. Control de calidad

Las cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* deben probarse cada vez que se utiliza un nuevo lote de discos o agar. Deben realizarse controles adicionales todos los días en los que se lleva a cabo la prueba, a menos que el laboratorio pueda justificar el control de calidad en forma semanal según los criterios publicados (véase cuadro 17-14).

IV. Procedimiento

A. Preparación del inóculo (método de desarrollo)

1. Tocar con un ansa metálica la superficie de cuatro o cinco colonias bien aisladas de aspecto similar de un cultivo en placas de agar. Transferir a un tubo de caldo con 4 a 5 mL de un medio líquido apropiado.
2. Incubar el cultivo a 35 °C hasta que la turbidez coincida con la del estándar preparado con anterioridad (casi siempre 2 a 6 horas antes). Mezclar en forma enérgica el estándar en la agitadora vorticial (Vortex) inmediatamente antes de usar. Utilizar una luz adecuada para leer el tubo contra un fondo blanco con una línea negra de contraste. Si fuera necesario, agregar solución fisiológica estéril o caldo para obtener a simple vista una turbidez comparable con la del estándar. En el caso de la cepa de *E. coli* para control de calidad, esto equivale a alrededor de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC). Como alternativa, puede usarse una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de las colonias de un cultivo de 18 a 24 horas en placa de agar, ajustada al estándar. En ese caso, las bacterias deben haberse desarrollado en un medio nutritivo, no selectivo, como el agar sangre. Los dispositivos comerciales para estandarizar el inóculo sin control de la turbidez ni preincubación en medio líquido también han tenido un rendimiento aceptable.
3. Antes de transcurridos 15 minutos después de hacer coincidir la turbidez de la suspensión del inóculo con la del estándar, sumergir un hisopo de algodón no tóxico, estéril, dentro de la suspensión del inóculo y rotarlo varias veces con una presión firme sobre las paredes del tubo, para eliminar el exceso de líquido.
4. Sembrar la superficie seca de una placa de agar de Mueller-Hinton que haya sido llevada a temperatura ambiente, estriando el hisopo tres veces sobre toda la superficie del agar, haciendo rotar la placa aproximadamente 60° cada vez, para asegurar una distribución uniforme del inóculo sobre toda la superficie del agar. Para finalizar, pasar el hisopo por el borde del agar. Colocar la tapa de la placa. Dejar pasar por lo menos 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para que se seque la superficie del agar antes de agregar los discos de antibióticos.

B. Preparación alternativa del inóculo (suspensión directa de colonias)

1. Hacer una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de colonias provenientes de un cultivo en placa de agar nutritivo, no selectivo (p. ej., agar sangre), incubadas durante 18 a 24 horas.
2. Hacer coincidir de inmediato la densidad del inóculo con la densidad del estándar, como se hace en el método de desarrollo.
3. Este método se recomienda para las especies de *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y especies de *Staphylococcus* cuando se prueba la sensibilidad a la oxacilina.

C. Pruebas con antibióticos

1. Colocar los discos adecuados, impregnados en los antimicrobianos sobre la superficie del agar, utilizando pinzas o aplicadores de multidiscos.

PROTOCOLO 17-1

PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCOS (BAUER-KIRBY) PARA BACTERIAS SIN REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES (cont.)

2. Presionar con suavidad cada disco sobre la superficie del agar, para que el contacto sea uniforme. No mover el disco una vez que se haya puesto en contacto con el agar, ya que parte del fármaco se difunde casi de inmediato. Los discos deben distribuirse de manera uniforme sobre el agar, de modo que la distancia centro a centro no sea menor de 24 mm.
3. Invertir las placas y colocarlas en una estufa de aire atmosférico a 35 °C durante 16 a 18 horas (24 horas cuando se prueban estafilococos con meticilina u oxacilina, o enterococos con vancomicina).

V. Resultados

A. Interpretación

Medida de los diámetros de los halos: examinar las placas después de incubarlas durante la noche. Mediante un calibre, regla o patrón, se miden con cuidado los halos de inhibición completa del desarrollo alrededor de cada disco, redondeando al milímetro más próximo; el diámetro del disco debe incluirse en esta medición.

Todas las mediciones se hacen a simple vista, observando la placa de Petri desde abajo, con luz reflejada, contra un fondo negro que no refleje. La observación de las placas debe realizarse en sentido vertical, para evitar cualquier paralaje que pueda producir una lectura errónea. Las placas para determinaciones de sensibilidad preparadas con sangre deben observarse desde la superficie del agar y las mediciones se harán sin la tapa colocada, también con luz dirigida para iluminar la placa. Los problemas frecuentes en la determinación de los tamaños de los halos se tratan en el texto.

En las referencias de las normas publicadas se proporciona un correlato de interpretación (sensible, moderadamente sensible, intermedio o resistente) (véase cuadro 17-17). Los halos que corresponden al rango intermedio deben considerarse dudosos; si se desea hacer tratamiento con ese fármaco, debe realizarse una prueba de sensibilidad por dilución para aclarar el tema.

VI. Bibliografía

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard (M2-A8). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk Diffusion. Supplemental Tables, M100-S13 (M2). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

PROTOCOLO 17-2

REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR MICRODILUCIÓN EN CALDO CON BACTERIAS SIN REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES

I. Principio

La prueba por microdilución es una adaptación de la prueba de referencia macroscópica. Pueden probarse con facilidad grandes cantidades de aislamientos contra varios fármacos, de modo que el procedimiento se adapta bien al uso de rutina. Esta prueba genera mayor cantidad de información cuantitativa que la de difusión con discos, información que puede ser de utilidad o incluso esencial en ciertas circunstancias. Este protocolo resume el procedimiento básico: consultar el documento que figura en la bibliografía, del Clinical Laboratory Standards Institute (antes, National Committee for Clinical Laboratory Standards) para ver las variaciones que se usan para probar bacterias con requerimientos nutricionales especiales.

El principio de la prueba de microdilución es el mismo que el de la prueba macroscópica. Los aislamientos bacterianos se exponen a diluciones seriadas de cada antimicrobiano, después de lo cual la concentración de fármaco que inhibe el desarrollo se determina por observación visual.

II. Medios y reactivos

- A. Caldo nutritivo (se recomienda el caldo de digerido de caseína soja).
- B. Estándar de McFarland 0,5 para corregir el inóculo.
- C. Fondo blanco con líneas negras para la comparación de la turbidez del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland.
- D. Placas de microtitulación congeladas o liofilizadas, con antibióticos en medio de Mueller-Hinton suplementado con cationes.
- E. Inoculadores múltiples, ya sea ansas de alambre o puntas plásticas descartables.
- F. Espejo de lectura y patrón para la determinación de los puntos finales. Puede hacerse un análisis fotométrico o fluorométrico de los puntos finales si se demuestra que son equivalentes a la observación visual.

III. Control de calidad

Debe hacerse un control de calidad con cada nuevo lote de placas. Durante su utilización, los controles pueden realizarse a diario o a intervalos semanales, si se cumplen criterios estrictos.

Los microorganismos utilizados para las pruebas de dilución son *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583), *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 49226) y *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247). Nótese que la cepa de *S. aureus* es distinta de la que se usa para las pruebas de difusión con discos. Como control de combinaciones que incluyan ácido clavulánico, un inhibidor de las β -lactamasas, puede utilizarse *E. coli* (ATCC 35218) (Véase cuadro 17-22).

PROTOCOLO 17-2

REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR MICRODILUCION EN CALDO CON BACTERIAS SIN REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES (cont.)

IV. Procedimiento

A. Preparación del inóculo: como para la prueba de difusión con discos (véase protocolo 17-1).

B. Siembra de las placas

Sembrar la suspensión bacteriana en cada pocillo de la placa de microtitulación antes de transcurridos 15 minutos luego de haber ajustado la densidad del inóculo. Un pocillo debe contener bacterias sin antibióticos (control de desarrollo) y otro debe contener caldo solo (control de esterilidad). Si el volumen del inóculo supera el 10% del volumen del pocillo, debe calcularse el efecto de dilución del antibiótico. Para evitar la desecación, colocar las placas dentro de una bolsa de plástico y cerrarla con cinta adhesiva plástica o con una cubierta plástica hermética. Debe sembrarse una parte de una placa de agar nutritivo, como agar sangre, para detectar contaminaciones.

C. Incubación

Incubar las placas a 35 °C durante 16 a 20 horas (24 horas cuando se prueban estafilococos contra oxacilina, meticilina o vancomicina, o cuando se prueban enterococos contra vancomicina) en una estufa con circulación de aire. No colocar más de cuatro placas en una pila, de modo de mantener la temperatura de incubación constante.

V. Resultados

A. Interpretación

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la menor dilución de antibiótico que inhibe el desarrollo del aislamiento. Puede determinarse mediante la observación de las cubetas a simple vista, comparando el desarrollo de los pocillos que contienen antibióticos con el del pocillo control de desarrollo. La observación se facilita con un espejo de lectura, con el cual puede verse el fondo de los pocillos. Es de utilidad un patrón en el que se encuentre detallado el contenido de cada pocillo. Para que una prueba sea válida, debe haber desarrollo adecuado (turbidez difusa o un botón de sedimento de por lo menos 2 mm). En el caso de trimetoprim-sulfametoxazol, el punto final es por lo menos un 80% de inhibición del desarrollo. Un solo pocillo omitido puede ignorarse; si hay más pocillos omitidos, la prueba debe repetirse.

Consultar las directivas para interpretación de resultados de CIM, como sensible, moderadamente sensible, intermedio o resistente (véase cuadro 17-16).

Examinar la placa de pureza y si se encuentra contaminación repetir la prueba.

VI. Bibliografía

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M7-A6 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard, 6^a ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S13 (M7) MIC testing. Supplemental Tables. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

PROTOCOLO 17-3

PRUEBA DE DIFUSIÓN DE GRADIENTES (Etest) PARA SENSIBILIDAD BACTERIANA

I. Principio

La prueba de difusión de gradientes utiliza una tira de plástico no porosa que se ha calibrado con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) que abarcan 15 diluciones al medio. Sobre la superficie de la tira opuesta a la escala de CIM se fija un gradiente predefinido del antibiótico. Cuando se transfiere al medio sólido, el antibiótico se difunde desde la tira (en forma similar a lo que sucede en la prueba de difusión con discos). Este protocolo resume el procedimiento general, que debe usarse sólo para combinaciones de antibióticos y microorganismos que hayan sido validadas por comparación con métodos de referencia.

II. Materiales y reactivos

A. Caldo nutritivo o solución fisiológica al 0,85%.

B. Hisopos estériles (con el algodón no demasiado apretado).

C. Estándar de McFarland 0,5 o 1.

D. Tiras Etest.

E. Equipo aplicador para Etest o pinzas.

F. Placas de agar de Mueller-Hinton (de 100 mm o 150 mm) con suplementos, si corresponde.

III. El control de calidad se realiza con cepas adecuadas para las pruebas de dilución (véase protocolo 17-2).

PROTOCOLO 17-3

PRUEBA DE DIFUSIÓN DE GRADIENTES (ETEST) PARA SENSIBILIDAD BACTERIANA (cont.)

IV. Procedimiento

- A. Llevar las tiras Etest a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos después de sacarlas del congelador a -20°C).
- B. La preparación del inóculo es igual a la que se usa para las pruebas de difusión con discos o para microdilución en caldo (véanse protocolos 17-1 y 17-2).
- C. Sembrar la placa de agar como para la prueba de difusión con discos (véase protocolo 17-1).
- D. Dejar secar la superficie del agar 10 a 15 minutos a temperatura ambiente o en estufa antes de continuar.
- E. Abrir el envase del Etest y colocar la tira o tiras en una palca de Petri seca o en la rejilla aplicadora.
- F. Aplicar la tira o tiras sobre la superficie del agar con pinzas o el aplicador, con la escala de CIM hacia arriba. Si la tira se coloca al revés, puede corregirse si se hace de inmediato. Si la tira se incuba en posición invertida, la prueba no es válida.
- G. Incubar como corresponda para el microorganismo por probar.

V. Resultados

- A. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, leer la prueba sólo si hay desarrollo y la elipse de inhibición es claramente visible.
- B. Leer la CIM en el punto en el que un halo de inhibición bien definido interseca la tira. Los factores que deben considerarse en la determinación de la CIM se exponen en el texto y en el recuadro 17-7.
- C. Como el gradiente de antibióticos es continuo (lineal) y los criterios de interpretación son discontinuos (diluciones al medio), redondear el valor de la CIM a la dilución al medio más próxima cuando se informe el resultado.

VI. Referencia

Etest Technical Guide 3B. Sona, Sweden: AB Biodisk.

PROTOCOLO 18-1

COLORACIÓN DE DIENE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOPLASMAS

I. Principio

Las colonias de *Mycoplasma* provenientes de cultivos genitales se identifican con facilidad mediante la observación de colonias típicas en agar. La visualización de la morfología de las colonias se facilita aplicando el colorante de Dienes directamente sobre la superficie del agar.

La coloración de Dienes es una tinción inespecífica que imparte un aspecto contrastante a las colonias de *Mycoplasma* sobre agar, lo que facilita la visualización de la morfología y las características de la colonia.

II. Reactivos

- A. Colorante de Dienes modificado (solución madre)

Azul de metileno	2,5 g
Azur II	1,25 g
Maltosa	10 g
Na₂CO₃	0,25 g
Agua destilada	100 mL

La solución de trabajo del colorante de Dienes se prepara por dilución de una alícuota de la solución madre 1:3 con agua destilada.

III. Procedimiento

1. Cubrir una placa de agar que contenga desarrollo de micoplasmas con 1 mL de solución de trabajo del colorante de Dienes.
2. *Enjuagar de inmediato la superficie del agar con agua destilada para eliminar el colorante.*
3. Decolorar el medio con 1 mL de etanol al 95%. Dejar en contacto con el agar durante 1 minuto, luego eliminar. Repetir el paso de lavado una segunda vez.
4. Enjuagar la placa con agua destilada y dejar secar.
5. Observar las colonias con un microscopio de bajo aumento (50 a 100×).

IV. Resultados

- A. Interpretación

Los micoplasmas con la morfología de las colonias en "huevo frito" se tiñen con un centro de color azul oscuro y una periferia azul clara y tienen aspecto muy granuloso. El fondo del agar puede ser transparente o ligeramente violeta.

PROTOCOLO 18-1

COLORACIÓN DE DIENE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOPLASMAS (cont.)

Los micoplasmas que no son *M. pneumoniae* permanecerán coloreados; *M. pneumoniae* reduce el azul de metileno después de un tiempo y se pone incoloro. Si el aislamiento proviene del aparato genital y produce colonias y coloración típicas, puede informarse como *M. hominis*.

V. Bibliografía

Velleca WM, Bird BR, Forrester FT. Laboratory Diagnosis of Mycoplasma Infections. Atlanta: Department of Health and Human Services, 1980.

PROTOCOLO 18-2

PRUEBA DE HEMADSORCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

I. Principio

Entre los micoplasmas respiratorios, *M. pneumoniae* es la única especie que adsorbe específicamente eritrocitos. Por lo tanto, esta propiedad representa un método para su identificación presuntiva.

Cuando se observa desarrollo de colonias en medios para aislamiento de micoplasmas sembrados con muestras provenientes de las vías respiratorias, se coloca una suspensión de eritrocitos de cobayo sobre la superficie del agar durante un tiempo determinado y luego se elimina por lavado. Las colonias de *M. pneumoniae* adsorberán algunos eritrocitos sobre la superficie de la colonia.

II. Reactivos

A. Agar glucosa para micoplasmas con colonias sospechosas.

B. Eritrocitos de cobayo lavados (0,2 a 0,4%) suspendidos en caldo para micoplasma.

III. Control de calidad

A. Control positivo: *M. pneumoniae*.

B. Control negativo: especies de *Mycoplasma*.

IV. Procedimiento

1. Cubrir la superficie de la placa de agar con 2 mL de la suspensión de eritrocitos.

2. Incubar la placa a 35 °C durante 30 minutos, rotándola en ocasiones para evitar que sedimenten los eritrocitos.

3. Lavar la superficie de la placa tres veces con 3 mL de caldo para micoplasma, rotando suavemente la placa. Eliminar el líquido de lavado por aspiración con una pipeta.

4. Observar las colonias con aumento 50 × a 100 × con microscopio de disección.

V. Resultados

A. Interpretación

Prueba positiva: colonias con eritrocitos adsorbidos en la superficie = *M. pneumoniae*.

Negativa: colonias sin eritrocitos adsorbidos = especies de *Mycoplasma* no *M. pneumoniae*.

VI. Bibliografía

Manchee RJ, Taylor-Robinson D. Hemadsorption and hemagglutination by mycoplasmas. J Gen Microbiol 1968;50:465.

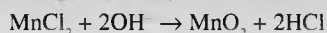
PROTOCOLO 18-3

PRUEBA DE CLORURO MANGANOSO UREA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *UREAPLASMA UREALYTICUM*

I. Principio

U. urealyticum es la única especie de micoplasmas humanos capaz de hidrolizar la urea a amoníaco. Esta propiedad no sólo facilita el aislamiento del microorganismo, sino que también representa un método rápido y conveniente para identificar la especie en los cultivos. La prueba del cloruro manganoso (MnCl_2)-urea proporciona un método para detectar visualmente la formación de amoníaco por parte de *U. urealyticum*.

La actividad ureasa de *U. urealyticum* se detecta exponiendo las colonias a una solución de MnCl_2 en presencia de urea. La ureasa del microorganismo hidroliza la urea a amoníaco, según la siguiente reacción:



PROTOCOLO 18-3

PRUEBA DE CLORURO MANGANOSO UREA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *UREAPLASMA UREALYTICUM* (cont.)

El óxido de manganeso formado en la reacción es insoluble y produce un precipitado marrón oscuro alrededor de las colonias. Esta reacción se detecta por observación con un microscopio de disección.

II. Reactivos

A. Reactivo $MnCl_2$ -urea

Urea (Sigma, St Louis, MO)	1 g
$MnCl_2$ (Fisher Scientific, Hampton, NH)	0,8 g
Agua destilada	100 mL

B. Esterilizar por filtración, fraccionar en alícuotas de 3 mL y congelar a $-20^\circ C$

C. Cultivos de colonias sospechosas en agar

III. Control de calidad

A. Control positivo: *U. Urealyticum*.B. Control negativo: *M. hominis*.

IV. Procedimiento

1. Cubrir la placa con 2 a 3 mL del reactivo $MnCl_2$ -urea.

2. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, examinar las colonias con un microscopio de disección con aumento 50× a 100×.

V. Resultados

A. Interpretación

Las colonias de *U. urealyticum* se tiñen de color marrón oscuro. Otros micoplasmas (p. ej., *M. hominis*) permanecen sin teñir.

VI. Comentarios

Esta prueba funciona en forma óptima en colonias que no están demasiado próximas entre sí en agar. Las colonias no deben tener más de 48 horas cuando se realiza la prueba.

VII. Bibliografía

Shepard MC. Howard DR. Identification of "T" mycoplasmas in primary agar cultures by means of a direct test for urease. Ann NY Acad Sci 1970;174:809.

PROTOCOLO 18-4

MEDIO PARA AISLAMIENTO DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

I. Reactivos básicos para la preparación del medio completo

A. Agar base para micoplasmas: este medio puede prepararse utilizando agar PPLO obtenido en el comercio, de acuerdo con las instrucciones del prospecto del producto, o puede prepararse de materias primas utilizando la siguiente fórmula:

Infusión de corazón vacuno	50 g
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agar purificado	14 g
Agua destilada	1 L

Mezclar todos los reactivos y poner en baño María hirviendo para fundir el agar. Fraccionar en alícuotas de 70 mL y colocar en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Conservar a $4^\circ C$.

B. Extracto de levadura

1. Adquirir extracto de levadura comercial al 25% o prepararlo como sigue: pesar 250 g de levadura de repostería activa y colocarla en 1 L de agua destilada. Calentar hasta ebullición, enfriar y filtrar para eliminar el material no disuelto. Ajustar el pH a 8 y esterilizar por filtración.

2. A continuación, el extracto de levadura (20 mL) se mezcla con suero de caballo inactivado (10 mL) en relación 2:1 y se congela en alícuotas de 30 mL a $-20^\circ C$.C. Solución de rojo fenol (0,4%): se disuelve rojo fenol (1 g) en 3 mL de NaOH 1 N y se le agregan 247 mL de agua destilada. La solución se esteriliza por filtración y se conserva entre 4 y $8^\circ C$.

D. Solución de azul de metileno (1%): se disuelve azul de metileno (1 g) en 100 mL de agua destilada y se coloca en autoclave durante 15 minutos.

PROTOCOLO 18-4

MEDIO PARA AISLAMIENTO DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* (cont.)

- E. Solución de acetato de talio (10%): se disuelven 10 g de acetato de talio en 100 mL de agua destilada y se esteriliza por filtración.
 F. Solución de glucosa: se disuelve glucosa (50 g) en 100 mL de agua destilada y se esteriliza por filtración.
 G. Solución de penicilina: se disuelve penicilina en polvo en agua destilada hasta una concentración de 100 000 unidades/mL.

II. Medio bifásico azul de metileno glucosa

1. Fundir 70 mL de agar para micoplasma en baño María hirviendo. Enfriar a 50 °C y agregar 30 mL de mezcla de extracto de levadura-suero precalentado.
2. Agregar los siguientes elementos:

Solución de azul de metileno (1%)	0,1 mL
Solución de rojo fenol (0,4%;)	0,5 mL
Solución de glucosa	2 mL
Solución de acetato de talio (10%)	0,25 mL
Solución de penicilina	3 mL

3. Ajustar el pH a 7,8 con NaOH 1 N estéril.
4. Fraccionar el agar en alícuotas de 1 mL en tubos estériles de 13 × 100 mm con tapa de rosca.
5. Mezclar 140 mL de caldo para micoplasma (como A, más arriba, sin agar) con 60 mL de la mezcla de extracto de levadura-suero. Agregar a esta mezcla lo siguiente:

Solución de azul de metileno (1%)	0,2 mL
Solución de rojo fenol	1 mL
Solución de glucosa	4 mL
Solución de acetato de talio (10%)	6 mL
Solución de penicilina	0,5 mL

Ajustar el pH a 7,8 con NaOH 1 N estéril. Agregar 2 mL a cada uno de los tubos que contienen el medio sólido ya solidificado.

III. Agar con glucosa para micoplasmas

1. Fundir 70 mL de agar para micoplasma en baño María hirviendo. Enfriar a 50 °C.
2. Precalentar 30 mL de la mezcla extracto de levadura-suero y mezclar con el agar.
3. Agregar con técnica aséptica los siguientes reactivos:

Solución de glucosa	2 mL
Solución de acetato de talio (10%)	0,25 mL
Solución de penicilina	3 mL

4. Ajustar el pH a 7,8 con NaOH 1 N estéril.
5. Verter 6 mL del medio en placas de Petri de 60 × 15 mm. Dejar enfriar. Conservar el medio a 4 °C.

IV. Medio SP-4 (también utilizado para el cultivo de *M. pneumoniae*, pero fundamentalmente para el cultivo de especies con requerimientos nutricionales especiales)

A. Medio basal

Caldo base para micoplasmas (BBL)	3,5 g/L
Bacto Tryptone (Difco)®	10 g/L
Bacto Peptone (Difco)®	5 g/L
Glucosa	5 g/L
Agua desionizada	615 mL
Ajustar el pH a 7,5 - 7,6	
Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 minutos	

PROTOCOLO 18-4

MEDIO PARA AISLAMIENTO DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* (cont.)

B. Suplementos estériles:

Suplemento para cultivo de tejidos con glutamina CMRL 1066 (Gibco)	50 mL
Extracto de levadura fresco (solución al 25%)	35 mL
Yeastolate (solución al 2%)	100 mL
Suero fetal bovino (calentado a 56 °C una hora)	170 mL
Penicilina (concentración de 100 000 U/mL)	10 mL
Solución de rojo fenol (acuosa, 0,1%)	20 mL

C. Fórmula final

Combinar el medio basal (615 mL) con los suplementos (385 mL) y fraccionar en forma aséptica en volúmenes de 3 mL, en frascos de 4 mL con tapa de rosca.

V. Bibliografía

Velleca WB, Bird BR, Forrester FT. Laboratory Diagnosis of *Mycoplasma* Infections. Atlanta: Department of Health and Human Services, 1980.

PROTOCOLO 18-5

MEDIO PARA AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS GENITALES

I. Caldo y agar U para aislamiento de *Ureaplasma urealyticum*

A. Caldo U

1. Agregar los siguientes ingredientes a 70 mL de caldo base para micoplasmas (BBL) (véase protocolo 18-4):

Extracto de levadura-suero de caballo	30 mL
Solución de urea (50%)	0,1 mL
Solución de rojo fenol (0,4%)	0,5 mL
Solución de penicilina	0,5 mL
Solución de polimixina B (5 000 µg/mL)	0,5 mL
Solución de lincomicina (1 500 µg/mL)	1 mL
Solución de anfotericina B (5 000 µg/mL)	0,1 mL

2. Ajustar el pH a 6 con HCl 1N.
3. Fraccionar en alícuotas de 2 mL en tubos estériles de 12 x 75 mm con tapa de rosca o en frascos ampolla estériles de 3,88 g. Conservar entre 4 y 8 °C.

B. Agar U

1. Agregar 30 g de caldo de tripticasa soja a 1 L de agua destilada. Añadir 11,3 g de agar purificado (p. ej., Noble agar, Ion agar 2) y calentar hasta ebullición para disolver. Fraccionar en alícuotas de 80 mL y conservar en frigorífico.
2. Fundir 80 mL de agar base en un baño María hirviendo y enfriar a 50 °C. Ajustar el pH a 6 con HCl 1N.
3. En otro recipiente estéril, mezclar lo siguiente:

Suero de caballo	2 mL
Solución de rojo fenol (0,4%)	0,5 mL
Solución de urea (50%)	0,1 mL
Solución de penicilina	0,5 mL
Solución de lincomicina (1 500 µg/mL)	1 mL

4. Agregar el agar al contenido del recipiente, mezclar y fraccionar en alícuotas de 3 mL en placas de Petri de 60 x 15 mm. Colocar en bolsas de plástico y almacenar entre 4 y 8 °C.

PROTOCOLO 18-5

MEDIO PARA AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS GENITALES (cont.)

II. Caldo y agar H para aislamiento de *Mycoplasma hominis*

A. Caldo H

1. Agregar los siguientes ingredientes a 70 mL de caldo base para micoplasmas (BBL) (véase protocolo 18-4).

Extracto de levadura-suero de caballo	30 mL
Clorhidrato de L-arginina (30%)	0,66 mL
Solución de rojo fenol (0,4%)	0,5 mL
Solución de penicilina	0,5 mL
Polimixina B (5 000 µg/mL)	1 mL
Anfotericina B (5 000 µg/mL)	0,1 mL

2. Ajustar el pH a 7 con HCl 1N.
3. Fraccionar en alícuotas de 2 mL en tubos estériles de 12 × 75 mm con tapa de rosca o en frascos ampolla estériles de 3.88 g. Conservar entre 4 y 8 °C.

B. Agar H

1. Fundir 70 mL de agar base en un baño María hirviendo y dejar enfriar a 50 °C.
2. Ajustar el pH del agar a 7 con HCl 1N.
3. Precalentar 30 mL de extracto de levadura-suero y agregar lo siguiente:

Clorhidrato de L-arginina (30%)	0,66 mL
Solución de rojo fenol (0,4%)	0,5 mL
Solución de penicilina	0,5 mL

4. Mezclar el agar base con el extracto de levadura-suero y los suplementos, y fraccionar en alícuotas de 3 mL en placas de Petri de 60 × 15 mm. Almacenar en bolsas de plástico entre 4 y 8 °C.

VI. Bibliografía

Velleca WM, Bird BR, Forrester FT. Laboratory Diagnosis of Mycoplasma Infections. Atlanta: Department of Health and Human Services, 1980.

PROTOCOLO 18-6

PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL TETRAZOLIO PARA LA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

I. Principio

M. pneumoniae es capaz de reducir el compuesto incoloro tetrazolio al compuesto de color rojo formozán. Entre los micoplasmas que forman colonias grandes, ésta es una característica peculiar de *M. pneumoniae* que representa para el laboratorio un método rápido y fácil para identificar colonias de *M. pneumoniae* directamente en el medio de aislamiento.

Mediante la utilización de enzimas asociadas con la membrana celular del microorganismo, *M. pneumoniae* puede reducir el compuesto cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolio a formozán, un compuesto rojo insoluble que precipita en las células y hace que las colonias tomen un color rojo a negro violáceo si la exposición al sustrato es prolongada.

II. Reactivos

1. Colonias aisladas en agar glucosa para micoplasmas.
2. Cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolio (Aldrich Chemical): 0,21 g/100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración y conservar en frascos color caramelo a temperatura ambiente.

III. Control de calidad

- A. Control positivo: *M. pneumoniae*.
- B. Control negativo: especies de *Mycoplasma*.

IV. Procedimiento

1. Cubrir la superficie de la placa de agar que contiene las colonias del microorganismo con 2 mL del reactivo de tetrazolio.
2. Incubar la placa a 35 °C durante 30 a 60 minutos (la incubación durante 60 minutos intensifica las reacciones que ya son evidentes a los 30 minutos).
3. Examinar las colonias con aumento entre 50× y 100× con un microscopio de disección.

PROTOCOLO 18-6

PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL TETRAZOLIO PARA LA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* (cont.)

V. Resultados

A. Interpretación

1. Prueba positiva: las colonias de *M. pneumoniae* se oscurecerán visiblemente y se verán de color rojo o púrpura después de 60 minutos. Con incubación prolongada (3 a 4 horas) las colonias se ponen negras.
2. Prueba negativa: no se notan cambios de color después de 60 minutos.

VI. Comentarios

Aunque es equivalente a la prueba de hemadsorción, la reducción de tetrazolio puede hacerse en la misma placa después de efectuar la prueba de hemadsorción.

VII. Bibliografía

Johnson JE, Smith TF. A simplified tetrazolium reduction test for *Mycoplasma pneumoniae*. Med Lab Sci 1976;33:235.

PROTOCOLO 19-1

DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN: *N*-ACETIL-L-CISTEÍNA-HIDRÓXIDO DE SODIO (NALC)

I. Principio

Las micobacterias se aíslan de manera óptima en muestras clínicas cuando se las libera de mucina, líquidos corporales y células (digestión). La *N*-acetil-L-cisteína (NALC) es un agente mucolítico que, en concentraciones del 0,5-2%, puede digerir con rapidez los esputos muy viscosos y otras muestras mucoides en el término de 2 minutos. El desarrollo de micobacterias en los medios de cultivo también se incrementa cuando la concentración de microorganismos competidores es mínima (descontaminación). El agregado de hidróxido de sodio al 4% a la mezcla de digestión, hasta alcanzar una concentración final del 2%, es el procedimiento descontaminante utilizado con mayor frecuencia.

II. Muestra

A. Tipo de muestra

Cualquier muestra de consistencia mucoide o que se sabe que está contaminada con bacterias debe someterse a un proceso de digestión y descontaminación. Se incluyen todas las muestras respiratorias, líquido de lavado gástrico, heces, orina (cuando la coloración de Gram muestra la presencia de bacterias), tejidos post mortem y muestras de biopsia.

B. Preparación del paciente

Cuando se recogen muestras que deben atravesar una zona contaminada, como esputo expectorado, debe hacerse todo lo posible para limpiar o descontaminar la zona. Por ejemplo, antes de indicar a los pacientes que expectoren, deben enjuagar muy bien su boca dos o tres veces con agua o con un medicamento para lavado bucal. La piel adyacente a un sitio de biopsia debe desinfectarse con cuidado con solución yodada y después con un hisopo con alcohol.

C. Procedimientos especiales de recolección

En el caso de pacientes en los que se sospecha tuberculosis pulmonar y que no pueden producir un esputo adecuado, debe obtenerse un esputo inducido. Cuando es difícil establecer el diagnóstico, pueden ser necesarios procedimientos invasivos, como biopsias por cepillado bronquial, lavados bronquiales o lavados broncoalveolares.

D. Condiciones especiales de manipulación

Todas las muestras remitidas para cultivo de micobacterias deben manipularse dentro de una campana de bioseguridad que funcione adecuadamente. También hay que tener cuidado durante la preparación, observación y conservación de las muestras coloreadas, ya que es posible que durante el procedimiento de fijación y coloración no mueran todos los bacilos ácido-alcohol resistentes. Hay que tener cuidado de no producir aerosoles cuando se realizan subcultivos, se centrifugan las muestras y se llevan a cabo las diferentes pruebas bioquímicas.

III. Materiales

A. Equipo

1. Centrífuga con camisas que impidan la formación de aerosoles.
2. Agitadora vortical.

B. Materiales

1. Recipiente con solución desinfectante para desechar materiales.
2. Tubos cónicos de polipropileno de 50 mL con tapa de rosca (que eviten la formación de aerosoles y graduados).
3. Pipetas estériles de 10 mL.
4. Portaobjetos de 2,5 × 7,5 cm, limpios, sin rayaduras.

C. Reactivos

N-acetil-L -cisteína (NALC) para digerir y descontaminar: TB base digestant®, 50 mL (disponible en el comercio).

PROTOCOLO 19-1

DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN: *N*-ACETIL-L-CISTEÍNA-HIDRÓXIDO DE SODIO (NALC) (cont.)

2. Buffer fosfato TB: 0.067 M, pH 6.8, 250 mL (disponible en el comercio).
3. *N*-acetil-L-cisteína (NALC): Mucomyst®, solución al 20% (disponible en el comercio, provista por Bristol Laboratories, Evansville, IN).

IV. Control de calidad

El porcentaje de muestras clínicas que muestran desarrollo de contaminantes bacterianos en los cultivos para TB después del procedimiento de digestión y descontaminación debe ser de alrededor del 3% en promedio. Una tasa de contaminación significativamente menor del 3% puede indicar una descontaminación demasiado intensa y hay que reducir la concentración de NaOH. Una tasa de contaminación significativamente mayor del 5% sugiere una descontaminación demasiado débil o una digestión incompleta. El aumento de la concentración del NaHO o del tiempo de exposición, o ambas cosas, puede corregir este problema.

V. Procedimiento

1. Agregar 1.5 mL de NALC a 50 mL de base homogeneizante para TB, para preparar la solución de trabajo.
2. En un tubo de centrifuga cónico, estéril, de polipropileno, de 50 mL con tapa de rosca, agregar un volumen de la solución de trabajo NALC-NaHO (preparado no más de 24 horas antes) igual al volumen de la muestra. Si se envían más de 20 mL de muestra, utilizar una pipeta estéril para seleccionar 10 mL de la porción más purulenta, sanguinolenta o mucoide. Cerrar bien la tapa.
3. Agitar los tubos en una agitadora vorticial durante no más de 30 segundos. Asegurarse de mover el tubo de modo que el NALC-NaHO se ponga en contacto con toda la superficie interna del tubo.
4. Dejar el tubo en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para descontaminar la muestra.
5. Diluir la mezcla, agregando agua destilada estéril o buffer fosfato 0,067 M estéril (pH 6.8) hasta la marca de 50 mL. Esto reducirá la acción continua del NaHO y disminuirá la viscosidad de la mezcla.
6. Volver a tapar bien los tubos e invertirlos varias veces para mezclar el contenido.
7. Centrifugar los tubos a 3 000 g durante 15 a 20 minutos. Utilizar camisas de centrifuga selladas para evitar los aerosoles.
8. Verter el sobrenadante en un recipiente desechable a prueba de salpicaduras que contenga desinfectante.
9. Mediante un ansa bacteriológica estéril de 3 mm de diámetro o el extremo de dos palillos de madera estériles, tomar una porción del sedimento y preparar un frotis sobre una superficie de 1 x 2 cm sobre un portaobjetos de vidrio nuevo, limpio y sin rayaduras.
10. Si los medios van a sembrarse de inmediato, suspender el sedimento restante en 1 a 2 mL de buffer TB o en agua destilada estéril. De lo contrario, suspender el sedimento en 1 a 2 mL de albúmina bovina fracción V al 0,2% estéril. Si la cantidad de sedimento es muy pequeña, reconstituirlo en sólo 1 mL.
11. Agregar 3 gotas a cada lado de un tubo de agar 7H11 en pico de flauta.
12. Sembrar 0,5 mL en un frasco ampolla BACTEC.

VI. Resultados

No corresponde.

VII. Notas acerca del procedimiento

1. Debe evitarse agitar en exceso la solución de NALC-NaHO porque el NALC es inestable en presencia de oxígeno.
2. La albúmina bovina sirve como buffer para el inóculo y aumenta la adherencia de la muestra al medio sólido.
3. Sólo debe utilizarse agua estéril: el agua corriente puede contener micobacterias ambientales que pueden confundir las observaciones de los frotis coloreados y contaminar los medios de cultivo.

VIII. Limitaciones del procedimiento

La concentración de NaHO y el tiempo de exposición de la muestra al reactivo durante el procedimiento de descontaminación deben controlarse con cuidado para evitar la pérdida de micobacterias durante el procedimiento.

IX. Bibliografía

- Good RC, Silcox V, Kilburn JO. Tuberculosis and other mycobacterioses. En: Balows A, Hausler WJ, eds. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections, 6ª ed. Washington DC: American Public Health Association, 1985:675-703.
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with *N*-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1963;87:775-779.
- Strong BE, Kubica GP. Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A Guide for the Level II Laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, 1976. Public Health Service publication 81-8390.

PROTOCOLO 19-2

COLORACIONES CON CARBOLFUCSINA

I. Principio

Los ácidos carbólicos existentes dentro de la pared celular cérea rica en lípidos de las micobacterias tienen la capacidad particular de unirse al colorante fucsina de una forma tal que no pueden destañarse con alcohol-ácido. La tinción de Ziehl-Neelsen se conoce como "coloración en caliente" porque se utiliza calor para que el colorante atraviese la pared celular. La tinción de Kinyoun se conoce como "coloración en frío" porque la alta concentración de fenol presente en el reactivo sirve para "disolver" el material lipídico de la pared celular, lo que permite la penetración del colorante carbolfucsina sin utilizar calor. Una vez teñida, la pared celular mantiene el colorante en forma "resistente", lo que le confiere el característico color rojo.

II. Muestra

Se prepara un frotis directamente de la muestra o de una suspensión de microorganismos obtenidos de colonias desarrolladas en medios de cultivo primarios.

III. Materiales

A. Equipo: portaobjetos de vidrio de 75 × 25 mm y reactivos.

B. Medios: no corresponde.

C. Reactivos

1. Carbolfucsina (disponible en el comercio).

2. Alcohol-ácido (disponible en el comercio).

3. Coloración de contraste con azul de metileno (disponible en el comercio).

IV. Control de calidad

A. Se preparan frotis control positivos sin teñir (*M. tuberculosis*) y frotis control negativos (*Nocardia asteroides*).

B. Antes de leer los frotis del paciente se revisan los frotis control para confirmar que las bacterias toman la coloración ácido-alcohol resistente:

1. Positivo: especies de *Mycobacterium*; rojo magenta en un fondo azul.

2. *N. asteroides*: no hay células ácido-alcohol resistentes; fondo azul.

C. Si los frotis control son inaceptables, revisar los procedimientos y la preparación de reactivos. Los siguientes son frotis control inaceptables:

1. Los bacilos en los controles positivos no se tiñen de rojo.

2. Los controles negativos permanecen rojos después de la decoloración.

3. El fondo no está adecuadamente decolorado.

V. Procedimiento

A. Ziehl-Neelsen

1. Colocar una tira de papel de filtro de 2 × 3 cm sobre el portaobjetos, para mantener el colorante sobre éste y filtrar los cristales no disueltos.

2. Cubrir la tira de papel con fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen.

3. Con un mechero Bunsen o con un dispositivo eléctrico para coloraciones, calentar lentamente el portaobjetos hasta la emisión de vapores, pero sin llegar a la ebullición.

4. Dejar teñir durante 5 minutos. Si el colorante se seca, agregar más sin calentar.

5. Quitar con cuidado la tira de papel del portaobjetos con pinzas.

6. Lavar con abundante agua.

7. Cubrir el frotis con decolorante alcohol-ácido al 3% durante 2 minutos.

8. Lavar con agua y eliminar el exceso.

9. Cubrir el portaobjetos con la coloración de contraste de azul de metileno durante 1 minuto. No secar con papel.

10. Examinar el frotis con un objetivo de inmersión en aceite 100×.

B. Kinyoun

1. Fijar con calor los frotis en un calentador para portaobjetos a 72–75 °C.

2. Cubrir el frotis con el reactivo de carbolfucsina de Kinyoun. Puede aplicarse un pequeño trozo rectangular de papel de filtro de 5 × 7,5 cm sobre el frotis y aplicar el colorante sobre él, para evitar el derrame por los lados del frotis. No calentar.

3. Teñir durante 5 minutos.

4. Retirar el papel de filtro con pinzas, lavar el colorante con agua destilada.

5. Decolorar durante 3 minutos con alcohol-ácido o hasta que no salga más color rojo.

6. Cubrir el frotis durante 3-4 minutos con colorante de contraste de azul de metileno.

7. Lavar, secar y examinar el frotis con un objetivo de inmersión en aceite 100 ×.

PROTOCOLO 19-2

COLORACIONES CON CARBOLFUCSINA (cont.)

VI. Resultados

Examinar el frotis con un objetivo de inmersión en aceite 100 × e informar como sigue:

Observación microscópica	Informe
1 o 2 cada 300 campos (3 barridos)	(Dudoso, repetir e informar el resultado de la repetición)
1-9 cada 100 campos	Muy escasos, 1+
1-9 cada 10 campos	Pocos, 2+
1-9 por campo de inmersión	Abundantes, 3+
9 por campo	4+

VII. Notas acerca del procedimiento

1. Evitar la decoloración insuficiente con alcohol-ácido. Los microorganismos verdaderamente ácido-alcohol resistentes son muy difíciles de decolorar en exceso.
2. Evitar hacer frotis gruesos, que pueden interferir en la decoloración adecuada.
3. Si se encuentra una cantidad no habitual de resultados positivos en los frotis, con cultivos negativos, controlar que en los depósitos de agua no haya microorganismos ácido-alcohol resistentes contaminantes. La transferencia de materiales de un portaobjetos a otro y en el aceite de inmersión son otras posibles causas de resultados falsos positivos de los frotis.
4. Las tinciones de contraste muy intensas pueden enmascarar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. El verde brillante puede ser levemente más ventajoso que el azul de metileno como colorante de contraste.

VIII. Limitaciones del procedimiento

1. Los frotis ácido-alcohol resistentes no significan nada por sí mismos; la interpretación final siempre debe hacerse teniendo en cuenta los resultados del cultivo.
2. Existen microorganismos distintos de las micobacterias que pueden tener grados variables de ácido-alcohol resistencia: especies de *Rhodococcus*, especies de *Nocardia*, *Legionella micdadei* y los quistes de especies de *Cryptosporidium*. Utilizar las diferencias morfológicas y la correlación con el aspecto de los cultivos y los resultados de otras pruebas bioquímicas.
3. Las micobacterias de crecimiento rápido pueden teñirse mal o no teñirse. La coloración de Ziehl-Neelsen puede teñir mejor que el método de Kinyoun los microorganismos débilmente ácido-alcohol resistentes.

IX. Bibliografía

- Berlin OGW. Mycobacteria. En: Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Diagnostic Microbiology*. St. Louis: Mosby, 1990:597-640.
- Ebersole LL. Acid-fast stain procedures. En: Isenberg HD. *Mycobacteriology Section, Clinical Microbiology Procedure Handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
- Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985. Department of Health and Human Services publication 86-21654.

PROTOCOLO 19-3

COLORACIÓN FLUORESCENTE: AURAMINA O; AURAMINA-RODAMINA

I. Principio

Los microorganismos ácido-alcohol resistentes emiten una fluorescencia amarilla brillante cuando se activan con luz ultravioleta de onda corta. La coloración de contraste con permanganato de potasio hace que el fondo de detritos inespecíficos emitan fluorescencia de color amarillo pálido, que contrasta con el aspecto amarillo brillante de los bacilos ácido-alcohol resistentes.

II. Muestra

Los frotis se preparan directamente del material clínico o de una suspensión de microorganismos provenientes de colonias desarrolladas en un medio de cultivo primario.

III. Materiales

A. Equipo

1. Portaobjetos de 2,5 cm × 7,5 cm.

B. Reactivos

1. Auramina O

- a. Solución 1: disolver 1,5 g de auramina O en 10 mL de etanol al 95%.
- b. Solución 2: disolver 3 g de cristales de fenol en 87 mL de agua destilada.
- c. Solución de trabajo: mezclar las soluciones 1 y 2. Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento. El vencimiento es de 3 meses si se conserva en un frasco color caramelo.

PROTOCOLO 19-3

COLORACIÓN FLUORESCENTE: AURAMINA O; AURAMINA-RODAMINA (cont.)

2. Auramina-rodamina

- Solución 1: disolver 1,5 g de auramina O y 0,75 g de rodamina B en 75 mL de glicerol.
- Solución 2: mezclar 10 mL de fenol con 50 mL de agua destilada.
- Solución de trabajo: mezclar las soluciones 1 y 2 durante 24 horas en una agitadora magnética. Filtrar el colorante a través de lana de vidrio y conservar en un frasco de vidrio. Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento. La fecha de vencimiento es a los 3 meses si se conserva en un frasco color caramelo.

3. Coloración de contraste de permanganato: 0,5%

- Disolver 0,5 g de permanganato de potasio en 100 mL de agua destilada.
- Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento.

4. Ácido-alcohol al 0,5% decolorante

- Agregar 0,5 mL de ácido clorhídrico concentrado a 100 mL de etanol al 70%
- Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento.
- El vencimiento se produce a los 3 meses si se conserva a temperatura ambiente.

C. Materiales especiales

- Microscopio de fluorescencia provisto con un filtro primario BG-12 o 52112 y un filtro barrera OG-1.

D. Instrucciones de bioseguridad

- Manipular todos los portaobjetos con cuidado. La fijación por calor puede no matar todas las micobacterias. Desechar los portaobjetos en un recipiente de bioseguridad.
- Esterilizar por calor las ansas bacteriológicas en el incinerador eléctrico que se encuentra dentro de la campana de bioseguridad.
- Realizar todas las operaciones en una campana de bioseguridad. Colocar una toalla de papel embebida con desinfectante debajo del campo de trabajo. Limpiar con cuidado todas las superficies de trabajo con una solución desinfectante antes y después de su uso.
- Carcinógeno.
- Trabajar bajo campana en el laboratorio de química especial.

IV. Control de calidad

A. Materiales de control para utilizar

En cada serie de coloraciones se incluye un frotis control positivo y uno negativo para micobacterias. Los frotis control se observan antes de leer el frotis del paciente, para confirmar que el control positivo contiene micobacterias fluorescentes y que el negativo no tiene células fluorescentes.

- Control positivo: especies de *Mycobacterium*; bacilos con fluorescencia amarilla a naranja.
- Control negativo: *Nocardia asteroides*; ausencia de células fluorescentes.

Si cualquiera de los frotis control es inaceptable, revisar las preparaciones y el procedimiento.

V. Procedimiento

- Fijar los frotis por calor sobre un calentador de portaobjetos a 72 a 75 °C.
- Cubrir la superficie del frotis con auramina O. Dejar actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con agua corriente. Escurrir.
- Decolorar con ácido-alcohol al 0,5% durante 2 minutos.
- Lavar con agua corriente. Escurrir.
- Cubrir la superficie del frotis con colorante de contraste de permanganato de potasio al 0,5% durante 2 minutos.
- Lavar con agua corriente. Escurrir.
- Secar al aire. *No secar con papel.*
- Examinar los frotis lo antes posible utilizando el microscopio de fluorescencia. Si hay una demora, refrigerarlos a 4 °C en la oscuridad.

VI. Resultados

A. Interpretación (lectura o cálculos)

Los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) miden de 1 a 10 µm de largo, tienen forma de bastón, son delgados y emiten una fluorescencia amarilla brillante contra un fondo amarillo pálido. Primero realizar un barrido rápido de los frotis con objetivo 25×; cambiar a un objetivo 63× para confirmar la morfología bacteriana de cualquier forma sospechosa fluorescente. Examinar por completo cada portaobjetos en busca de bacilos ácido-alcohol resistentes. Los bacteriólogos especialistas en micobacterias recomiendan que se examinen como mínimo 100 campos antes de informar un frotis como negativo. Tres pasajes a todo lo largo del eje longitudinal del portaobjetos o nueve pasajes a lo largo del eje transversal suelen proporcionar una amplia superficie de lectura. Esta técnica reduce al mínimo la posibilidad de leer la misma zona más de una vez.

PROTOCOLO 19-3

COLORACIÓN FLUORESCENTE: AURAMINA O; AURAMINA-RODAMINA (cont.)

B. Formato del informe

La American Lung Association recomienda el siguiente método para las coloraciones con fucsina, aplicables también a las coloraciones fluorescentes:

Número de bacilos	Informe
0	No se observan BAAR
1-2 en todo el frotis	Informar la cantidad observada y solicitar la repetición
1-9 cada 10 campos	Escasos o 1+
1-9 por campo	Pocos o 2+
10-90 por campo	Abundantes o 3+
> 90 por campo	4+

VII. Notas acerca del procedimiento

Los frotis coloreados con fluorocromos pueden colorearse de nuevo directamente con cualquiera de los procedimientos de coloración con carbolfucsina. Esto se hace para confirmar los preparados positivos y para estudiar la morfología de los microorganismos presentes.

VIII. Limitaciones del procedimiento

Otros microorganismos distintos de las micobacterias, como las especies de *Rhodococcus* y de *Nocardia*, *Legionella micdadei* y los quistes de *Cryptosporidium* y de especies de *Isoptera* pueden tener grados variables de ácido-alcohol resistencia. A menudo esto puede ser sugerido por diferencias en la morfología; en los casos confusos puede ser necesario el aislamiento de las bacterias contaminantes por subcultivo.

Las micobacterias de crecimiento rápido pueden variar en su capacidad para retener los colorantes para ácido-alcohol resistencia. La mayoría de las especies no emiten fluorescencia en los frotis coloreados con fluorocromos y se recomienda un procedimiento con carbolfucsina.

Los bacilos ácido-alcohol resistentes muertos pueden teñirse con las coloraciones fluorescentes, característica que hay que tener en cuenta cuando los frotis se utilizan para evaluar la eficacia del tratamiento.

IX. Bibliografía

- Joseph SW, Vaichulis EMK, Houk VN. Lack of Auramine Rhodamine fluorescence of Runyon Group IV mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1967;95:114-115.
- Koneman LW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4ª ed. Filadelfia: Lippincott, 1992:713-715.
- Pollock HM, Wieman EJ. Smears results in the diagnosis of mycobacteriosis using blue light fluorescence microscopy. *J Clin Microbiol* 1977;5:329-331.
- Uribe-Botero G, Prichard JG, Kaplowitz HJ. Bone marrow in HIV infections: a comparison of fluorescent staining and culture in the detection of mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1989;91:313-315.

PROTOCOLO 19-4

PRUEBA NAP (*p*-NITRO- α -ACETILAMINO- β -HIDROXIPROPIOFENONA); (BACTEC)

I. Principio

Los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* no se desarrollan en presencia de *p*-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP). Cada frasco ampolla BACTEC contiene 5 μ g de NAP. Cuando se agrega 1 mL de un cultivo en desarrollo activo en medio 12B a este frasco ampolla, el desarrollo de las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se inhibe. Las micobacterias no tuberculosis (MOTT) no muestran inhibición significativa. La presencia de desarrollo se detecta por control de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ mediante el detector de radiactividad del instrumento, cuya ausencia (falta de aumento del índice de desarrollo) es compatible con el complejo *M. tuberculosis*.

II. Muestra

Medio BACTEC 12B con un índice de desarrollo mayor de 50.

III. Materiales

A. Equipo

1. Instrumento BACTEC 560 (Becton Dickinson, Sparks, MD).
2. Tubo de dióxido de carbono con 5-10% de CO_2 y 90-95% de aire, conectado al instrumento.
3. Campana BACTEC TB (Becton Dickinson).

PROTOCOLO 19-4

PRUEBA NAP (*p*-NITRO- α -ACETILAMINO- β -HIDROXIPROPIOFENONA); (BACTEC) (cont.)

4. Gabinete de bioseguridad.
5. Estufa, bien calibrada a 37 ± 1 °C.
6. Agitadora vortical.
- B. Materiales
 1. Jeringas descartables de tuberculina con agujas incorporadas.
 2. Desinfectante Amphyl® (desinfectante fenólico)
 3. Guantes, máscaras, delantales.
 4. Compresas de algodón o gasa.
 5. Hisopos con alcohol.
- C. Medios y reactivos
 1. Medio de Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) (contiene caldo base 7H9, albúmina sérica bovina, hidrolizado de caseína, catalasa y un sustrato marcado con ^{14}C).
 2. Frascos ampolla BACTEC NAP.
- IV. Control de calidad
 - A. Medio: el control de calidad del medio 12B lo efectúa el fabricante.
 - B. Incluir como controles *M. tuberculosis* American Type Culture Collection (ATCC) 27294 y *M. kansasii* ATCC 35775.
 - C. Probar los microorganismos control junto con los cultivos en estudio por lo menos una vez por mes y cada vez que se utilice un lote nuevo de NAP. El índice de desarrollo del *M. tuberculosis* debe ser plano; el de *M. kansasii* debe mostrar una curva ascendente a medida que aumenta el tiempo de incubación.
- V. Procedimiento
 1. Leer los frascos ampolla positivos para BAAR diariamente, hasta que el índice de desarrollo alcance alrededor de 50 a 100.
 2. Mezclar bien el medio y transferir con técnica aséptica 1 mL del medio de cultivo de este frasco ampolla a un frasco ampolla NAP.
 3. Limpiar los bordes de los frascos ampolla con Amphyl y luego con alcohol etílico al 70%.
 4. Agitar el frasco ampolla para mezclar el contenido.
 5. Leer todos los días los frascos ampolla NAP originales y los sembrados durante 2 a 5 días y registrar las lecturas del ID.
 6. En el caso de que los cultivos hayan superado un ID de 100, es necesario diluir la muestra antes de realizar la prueba NAP. Para determinar la dilución debe utilizarse la siguiente tabla:

Lectura de ID	Dilución
50-100	No diluir
101-200	0,8 mL en 4 mL de 7H12/12B
201-400	0,6 mL en 4 mL de 7H12/12B
401-600	0,4 mL en 4 mL de 7H12/12B
601-800	0,3 mL en 4 mL de 7H12/12B
801-999	0,2 mL en 4 mL de 7H12/12B

Mezclar la dilución con cuidado y transferir 1 mL del contenido a un frasco ampolla NAP. Incubar el resto de la dilución y utilizarla como control de la prueba.

VI. Resultados

A. Informe

1. El informe se realiza entre los 2 y 7 días, a los 4 días en promedio.
Informar como: la prueba NAP indica complejo *M. tuberculosis*, si el índice de desarrollo es plano; la prueba NAP indica MOTT, si el índice de desarrollo aumenta.
2. El complejo *M. tuberculosis* no debe ser informado antes de los 4 días.
3. Entre las bacterias distintas del complejo *M. tuberculosis*, ciertas cepas de *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. szulgai*, *M. terrae* y *M. tri-viale* son inhibidas parcialmente por el NAP. En esos casos, existe una fase latente más prolongada en presencia de NAP y los resultados interpretados en los primeros 2 a 4 días pueden ser erróneos. Continuar la incubación y tomar muestras 2 o 3 días más antes de informar.
4. La temperatura de incubación óptima es crítica para la prueba NAP. Algunas micobacterias (*M. marinum*, *M. chelonae*) crecen a 30 °C. En esos casos, se producirá una inhibición por NAP a 37 °C. Los resultados del ensayo serán claros y pueden informarse dentro de los 4 días si los cultivos se incuban a 30 °C. La prueba NAP para muestras provenientes de heridas o piel deben incubarse a 37 y 30 °C.

PROTOCOLO 19-4

PRUEBA NAP (*p*-NITRO- α -ACETILAMINO- β -HIDROXIPROPIOFENONA); (BACTEC) (*cont.*)

B. Interpretación

1. Interpretación de los resultados de la prueba NAP: el ID diario del frasco ampolla control (con el cultivo original) continuará en aumento o disminuirá. En el frasco ampolla NAP, el aumento o la disminución depende de la especie de micobacteria:
 - a. Complejo TB: dos descensos consecutivos significativos del ID después de la siembra = complejo TB; aumento ligero pero no significativo en los primeros 2 días y luego ausencia de aumento, o descenso del ID = complejo TB.
 - b. MOTT: incremento diario en las lecturas de ID hasta más de 400 antes de los 4 días = MOTT; falta de aumento o ligero descenso en los primeros 1 a 2 días después de la siembra y luego dos días consecutivos de aumentos significativos después del día 2 = MOTT.

VII. Limitaciones del procedimiento

La prueba NAP es de utilidad para diferenciar el complejo del *M. tuberculosis* de las MOTT sólo si se utilizan cultivos puros del aislamiento. Un cultivo mixto de TB y MOTT dará un aumento del ID e indicará sólo la presencia de MOTT. La contaminación con bacterias también puede dar falsos aumentos del ID; por lo tanto, debe realizarse una tinción para ácido-alcohol resistentes y en algunos casos una coloración de Gram, para confirmar la existencia de un cultivo mixto o de contaminación bacteriana.

VIII. Bibliografía

Siddiqi SH. BACTEC NAP test. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook, Mycobacteriology Section. Washington DC, American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 19-5

ARILSULFATASA

I. Principio

La arilsulfatasa es una enzima que produce fenoltaleína libre a partir de la sal tripotásica del disulfito de fenoltaleína. La prueba para la identificación de especies de *Mycobacterium* se realiza en un tubo que contiene el sustrato de fenoltaleína en agar ácido oleico. Al cabo de 3 (o 14) días de incubación de un subcultivo de la especie desconocida, la aparición de color rosa después del agregado de carbonato de sodio indica una reacción positiva.

II. Muestra

Una colonia bien desarrollada de la especie desconocida de *Mycobacterium*, aislada en un material clínico, desarrollada en un pico de flauta de medio de Löwenstein-Jensen o en agar de Middlebrook 7H-10. Preparar una suspensión del microorganismo en agua estéril e incubar durante 3 días (14 días).

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de bioseguridad.

B. Medios

1. Sustrato concentrado de arilsulfatasa.
 - a. Disolver 2,6 g de sal tripotásica de disulfito de fenoltaleína en 50 mL de agua desionizada estéril.
 - b. Esterilizar por filtración a través de membrana (filtro de 0.22 μ m de tamaño de poro).
 - c. Conservar en frigorífico a 2-8 °C.
 - d. La duración es indefinida si se almacena en forma adecuada. Descartar si la solución se enturbia.
2. Caldo para arilsulfatasa: prueba de 3 días.
 - a. Agregar en forma aséptica 2,5 mL del sustrato concentrado a 200 mL de caldo Dubos Tween® estéril.
 - b. Fraccionar en forma aséptica volúmenes de 2 mL en tubos con tapa de rosca (16 $\times$ 125 mm).
 - c. Conservar a 2-8 °C. Descartar si la solución se enturbia.
3. Caldo para arilsulfatasa: prueba de 2 semanas.
 - a. Agregar en forma aséptica 7,5 mL del sustrato concentrado a 200 mL de caldo Dubos Tween estéril.
 - b. Fraccionar en forma aséptica volúmenes de 2 mL en tubos con tapa de rosca (16 $\times$ 125 mm).
 - c. Conservar a 2-8 °C.

El agar para arilsulfatasa de Wayne se obtiene en el comercio proveniente de varias firmas.

C. Reactivos

1. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2 N: disolver 10,6 g de carbonato de sodio anhidro en 100 mL de agua destilada.

PROTOCOLO 19-5

ARILSULFATASA (cont.)

IV. Control de calidad

A. Prueba de 3 días

1. Control positivo: *Mycobacterium fortuitum* de la American Type Culture Collection (ATCC) 6841 (si el control positivo es negativo, repetir las pruebas con un subcultivo nuevo del microorganismo positivo. Si los controles negativos son positivos, repetir la prueba con un nuevo lote de medios).
2. Control negativo: *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950.
3. Medio sin sembrar y reactivo solo: no se obtiene desarrollo de color.

B. Prueba de 14 días

1. Control positivo: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 23292.
2. Control negativo: *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950.
3. Medio sin sembrar y reactivo solo: no se obtiene desarrollo de color.

V. Procedimiento

1. Sembrar cada tubo de sustrato con una suspensión ligeramente turbia en agua estéril del microorganismo por probar. Emulsionar por completo el cultivo en el caldo.
2. Incubar el tubo durante 3 o 14 días (prueba de 2 semanas) a 35 °C en estufa sin CO₂.
3. Después de la incubación, agregar 1 mL del reactivo de carbonato de sodio 2 N, mezclar y observar los cambios de color.

VI. Resultados

A. Interpretación (lectura o cálculos).

Observar visualmente el cambio de color de rosa pálido a rojo oscuro. La ausencia de cambio de color indica una reacción negativa.

VII. Notas acerca del procedimiento

Incluir un microorganismo de control en fase de desarrollo activo en cada prueba. Para los microorganismos de crecimiento lento, utilizar un subcultivo de 3 a 5 semanas; para los de crecimiento rápido utilizar un subcultivo de 1 a 3 semanas. Si el control positivo es negativo, repetir las pruebas con un subcultivo joven del microorganismo positivo. Si los controles negativos son positivos, repetir la prueba con un nuevo lote de medios.

VIII. Limitaciones del procedimiento

- A. Los resultados falsos negativos pueden deberse a que los cultivos control son demasiado viejos.
- B. Los resultados falsos positivos pueden presentarse cuando el medio contiene fenolftaleína libre.

IX. Bibliografía

- Kubica GP, Ridgon AL. The arylsulfatase activity of mycobacteria. III. Preliminary investigation of rapidly growing mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1961;83:737-740.
- Kubica GP, Vestal AL. The arylsulfatase activity of acid fast bacilli: I. Investigation of stock cultures of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1961;83:728-732.
- Lutz B. Arylsulfatase test. En: Isenberg HD. *Mycobacteriology Section, Clinical Microbiology Procedure Handbook*. Washington DC. American Society for Microbiology, 1992.
- Wayne LG. Recognition of *Mycobacterium fortuitum* by means of a three-day phenolphthalein sulfatase test. *Am J Clin Pathol* 1961;36:185-187.

PROTOCOLO 19-6

DETERMINACIÓN DE LA FOTORREACTIVIDAD DE LAS MICOBACTERIAS

I. Principio

La aparición de pigmento amarillo en las colonias de las micobacterias fotocromógenas es el resultado de la producción de cristales de caroteno, de color naranja amarillento, por parte de los microorganismos metabólicamente activos después de la exposición a la luz intensa. Las especies escotocromógenas tienen la capacidad de producir pigmento amarillo sin exposición a la luz; sin embargo, el tipo de pigmento se desconoce. La pigmentación de las colonias jóvenes de micobacterias después de desarrollarse en la oscuridad o después de ser expuestas a la luz puede ser una ayuda importante para identificar ciertas especies de *Mycobacterium*.

II. Muestra

Un cultivo primario en caldo del microorganismo por probar, lo suficientemente diluido como para producir colonias aisladas cuando se siembra en agar.

PROTOCOLO 19-6

DETERMINACIÓN DE LA FOTORREACTIVIDAD DE LAS MICOBACTERIAS (cont.)

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de bioseguridad.
2. Estufa de incubación a 37 °C.

B. Materiales

1. Tubos de ensayo estériles con tapa de rosca de 20 × 110 o 20 × 125 mm.
2. Pipetas de Pasteur estériles.
3. Anas y agujas para sembrar.

C. Medio

1. Tres tubos en pico de flauta de medio de Löwenstein-Jensen.
2. Tres placas de agar de Middlebrook 7H10.

IV. Estándares y controles (incluir los controles en cada prueba)

A. Fotocromógeno positivo: *M. kansasii* ATCC 12478.B. Escotocromógeno positivo: cepas de reserva de *M. scrofulaceum* o *M. gordonae*.C. Cromógeno negativo: *M. tuberculosis* ATCC 25177.

V. Procedimiento

1. Inocular la superficie de los tres tubos de agar inclinado (pico de flauta) de Lowenstein-Jensen o de las tres placas de agar de Middlebrook 7H10 con el líquido proveniente de un cultivo diluido en caldo del microorganismo por probar. Envolver dos de los tubos o placas con papel de aluminio; dejar el tercero expuesto a la luz ambiente dentro de la estufa de incubación.
2. Incubar uno de los tubos o placas envueltos a 25-30 °C; incubar los otros tubos o placas envueltos a 37 °C.
3. Varios días después de detectar desarrollo en la placa o tubo control expuestos a la luz, examinar los tubos o placas envueltos para ver si hay desarrollo.
4. Si se detecta desarrollo precoz en las placas o tubos envueltos, exponer uno de cada par a una luz fuerte durante aproximadamente 5 horas. Para esto, una lámpara de tungsteno o fluorescente de 100 W es adecuada. Aflojar la tapa del tubo durante este período de exposición a la luz.
5. Después de la exposición a la luz, el tubo o la placa se coloca nuevamente en la estufa y se observa a las 24 o 48 horas en busca de pigmento amarillo.

VI. Resultados

A. Interpretación

Las micobacterias escotocromógenas producen la misma cantidad de pigmento cuando se las expone a la luz o se las deja en la oscuridad. *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. xenopi* y *M. szulgai* (este último sólo es escotocromógeno cuando se incuba a 37 °C) integran el grupo de escotocromógenos.

Las micobacterias fotocromógenas producen pigmento amarillo sólo después de la exposición a la luz. Los fotocromógenos encontrados con mayor frecuencia son *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* y *M. asiaticum*.

Las micobacterias no cromógenas son incapaces de producir pigmento, ya sea en la oscuridad o después de la exposición a la luz. Los no cromógenos encontrados con mayor frecuencia son *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y las cepas clásicas de *M. avium*.

VII. Notas acerca del procedimiento

Cuando se sospecha *M. szulgai*, los tubos o placas expuestos a la luz deben incubarse a 25 °C durante 3-5 días. Si se incuban a 37 °C, el potencial fotocromógeno quedará enmascarado por el desarrollo de pigmento escotocromógeno que se observa a esa temperatura.

VIII. Limitaciones del procedimiento

En la actualidad una alta proporción de cepas de *M. avium*/*M. intracellulare* aisladas en pacientes con SIDA muestran producción de pigmento. Por lo tanto, ciertas cepas clasificadas antes como no cromógenas pueden ser en realidad cromógenas. Esta desviación, junto con la cromogenicidad dependiente de la temperatura de *M. szulgai*, son las razones que se esgrimen en este momento contra la validez de la clasificación clásica de las micobacterias de Runyon.

IX. Bibliografía

Wayne LG, Doubek SR. The role of air in the photochromogenic behavior of *M. kansasii*. Am J Clin Pathol 1964;42:431-435.

PROTOCOLO 19-7

CATALASA A 68 °C

I. Principio

La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La producción de oxígeno se evidencia como burbujas. Algunos tipos de catalasa son inactivados por calentamiento a 68 °C durante 20 minutos, característica valiosa para identificar ciertas especies de *Mycobacterium*. El peróxido de hidrógeno empleado para la identificación de especies de *Mycobacterium* es diferente del que se usa para detectar catalasa en otros tipos de bacterias; se utiliza en una concentración del 30% (Superoxol) en una solución fuerte de detergente (Tween 80 al 10%). El detergente ayuda a dispersar las micobacterias hidrófobas fuertemente agrupadas, convirtiendo los grandes acúmulos en bacilos aislados, lo que maximiza la detección de catalasa.

II. Muestra

Colonia madura de la especie desconocida de *Mycobacterium* aislada en un material clínico y cultivada en agar inclinado (pico de flauta) de Löwenstein-Jensen o en agar de Middlebrook 7H-10.

III. Materiales

A. Equipo

1. Baño María a 68 °C o platina caliente.

B. Medios

1. Caldo de Middlebrook 7H9.
2. Medio de Löwenstein-Jensen para siembra en profundidad, en tubos de ensayo de 25 × 150 mm con tapa de rosca.

C. Reactivos

1. Peróxido de hidrógeno al 30% (se obtiene en el comercio como Superoxol®).
2. Tween 80 al 10%.
3. Buffer de fosfatos M/15 (0.067 M).

IV. Control de calidad

A. Control negativo: *M. tuberculosis* American Type Culture Collection® (ATCC) 15177 produce burbujas a 22-25 °C, pero no a 68 °C.

B. Control positivo: *M. fortuitum* ATCC 6841 produce burbujas a 22-25 °C y a 68 °C.

C. Los controles deben incluirse con cada lote de pruebas.

V. Procedimiento

A. Prueba de la catalasa termoestable

1. Preparar un tubo con tapa de rosca por cada muestra de microorganismo por probar en agua estéril.
2. Marcar cada tubo con el número de la muestra.
3. Agregar a cada tubo 0,5 mL de buffer de fosfatos 0,067 M estéril.
4. Sembrar el buffer con una punta de espátula llena de un subcultivo en fase de crecimiento activo del microorganismo por probar (de 2 a 4 semanas de desarrollo).
5. Emulsionar por completo el cultivo en el buffer.
6. Incubar los tubos en baño María a 68 °C exactamente 20 minutos.
7. Retirar los tubos del baño María. Enfriar a temperatura ambiente.
8. Agregar 0,5 mL de reactivo Tween 80®-peróxido de hidrógeno recién preparado.
9. Dejar los tubos en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. No agitarlos.
10. Observar la aparición de burbujas.

B. Prueba de la catalasa semicuantitativa

1. Sembrar un medio líquido, como caldo Dubos Tween o caldo de Middlebrook 7H9, con una punta de espátula o un ansa llena del cultivo por probar. Incluir controles.
2. Incubar 7 días a 37 °C.
3. Mezclar durante 5 a 10 segundos en una agitadora vorticial.
4. Transferir 6 gotas a un medio de Löwenstein-Jensen para siembra en profundidad (preparado en tubos de 25 × 150 mm).
5. Incubar los tubos sembrados en profundidad 14 días a 37 °C. Asegurarse de que las tapas estén flojas.
6. Agregar 1 mL de reactivo Tween 80-peróxido de hidrógeno recién preparado. Evitar el contacto del reactivo con la piel.
7. Dejar los tubos de prueba a temperatura ambiente 5 minutos.
8. Medir la altura de la columna de burbujas.

VI. Resultados

A. Interpretación (lectura o cálculos)

1. Prueba de catalasa termoestable: la aparición de burbujas indica un resultado positivo; la falta de burbujas es una reacción negativa. *M. tuberculosis* y otras micobacterias pierden su actividad catalasa cuando se las calienta a 68 °C.
2. Prueba de catalasa semicuantitativa:
Reacción de catalasa alta: > 45 mm de espuma.
Reacción de catalasa baja: < 45 mm de espuma.

PROTOCOLO 19-7

CATALASA A 68 °C (cont.)

VII. Notas acerca del procedimiento

La falta de los resultados esperados en los cultivos control se debe por lo general al uso de cultivos demasiado viejos; utilizar sólo cultivos en fase de crecimiento activo.

VIII. Limitaciones del procedimiento

Los resultados falsos negativos pueden deberse a la utilización de cultivos con desarrollo inadecuado, demasiado viejos o al uso de reactivos vencidos. El desarrollo inadecuado puede ser el resultado de un inóculo deficiente o del cierre excesivo de las tapas de rosca. Pueden observarse resultados falsos positivos si los cultivos están contaminados con especies bacterianas catalasa positivas.

IX. Bibliografía

Kubica GP, et al. Differential identification of mycobacteria: I. Tests on catalase activity. *Am Rev Respir Dis* 1966;95:400-405.

Lutz B. Catalase tests. En: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*, Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 19-8

DESARROLLO EN AGAR DE MACCONKEY

I. Principio

La capacidad de desarrollarse en agar de MacConkey especial, sin violeta de genciana (cristal violeta), diferencia *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*, que pueden mostrar desarrollo en el término de 5 días, de otras micobacterias de crecimiento rápido que muestran sólo un desarrollo leve después de 11 días.

II. Muestra

Se prueba una colonia madura de la especie de *Mycobacterium* desconocida, aislada en materiales clínicos, desarrollada en un pico de flauta de Löwenstein-Jensen o en agar de Middlebrook 7H-10.

III. Materiales

A. Equipo: ninguno.

B. Medios: agar de MacConkey sin violeta de genciana. Comercializado por Remel Laboratories (Lenexa, KS). Conservado en frigorífico común a 4 °C.

C. Reactivos: ninguno.

D. Materiales: ninguno.

IV. Control de calidad

A. Control positivo: *M. fortuitum* American Type Culture Collection (ATCC) 6841.

B. Control negativo: *M. phlei* ATCC 11758; medio sin sembrar y reactivo solo.

V. Procedimiento

1. Sembrar una placa de MacConkey recién preparada con 3 gotas del microorganismo desarrollado durante 7 a 10 días en caldo 7H9 y esparcir en estría para obtener colonias aisladas.

2. Incubar entre 28 y 30 °C durante 11 días sin CO₂.

3. A los 5 y 11 días, inspeccionar la superficie del agar en busca de desarrollo de colonias.

VI. Resultados

A. Interpretación (lectura o cálculos)

Una prueba positiva para *M. fortuitum* mostrará desarrollo en toda la estría y posiblemente un cambio de color en el medio a los 5 días. La ausencia de desarrollo indica un resultado negativo.

VII. Notas acerca del procedimiento

Incluir controles con cada lote de pruebas. Si los resultados no son los esperados, repetir la prueba con microorganismos control y un lote de medio nuevos.

VIII. Limitaciones del procedimiento

Alrededor del 25% de las cepas de *M. smegmatus* se desarrollan en agar de MacConkey sin violeta de genciana. A fin de evitar cualquier dificultad diagnóstica puede utilizarse la prueba de arilsulfatasa de 3 días para diferenciar *M. smegmatus* (negativo) de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* (positivos).

IX. Bibliografía

Jones WD, Kubica GP. The use of MacConkey agar for differential typing of *M. fortuitum*. *Am J Med Technol* 1946;30:182-195.

Lutz B. Nitrate reduction. En: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*, Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 19-9

INHIBICIÓN POR LA HIDRAZIDA DEL ÁCIDO TIOFEN-2-CARBOXÍLICO (T₂H, 1 µg/mL)

I. Principio

La hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico tiene la propiedad de inhibir el desarrollo de *Mycobacterium bovis*, pero no de otras especies de micobacterias, característica útil para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

II. Muestra

Un cultivo de 3 a 4 semanas del microorganismo por probar, desarrollado en medio de Löwenstein-Jensen o agar de Middlebrook 7H10.

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de bioseguridad.
2. Estufa de incubación con CO₂ al 10% a 37 °C.

B. Materiales

1. Palillos de madera estériles.
2. Tubos para dilución con 9 mL de agua estéril.
3. Agua desionizada estéril.
4. Placas de Petri en cuadrantes.

C. Medios

1. Medio para sensibilidad a hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico (T₂H, también conocido como TCH, 10 µg/mL)
 - a. Preparar dos lotes de 200 mL de medio de Middlebrook 7H10 en frascos separados.
 - b. Esterilizar en autoclave. Enfriar a 50 °C en baño de agua.
 - c. Pipetear 5 mL de medio enfriado de uno de los frascos en los cuadrantes I y III de una placa de Petri en cuadrantes.
 - d. Agregar 2 mL de una solución madre de TCH de 1 000 µg/mL al otro frasco (concentración final 10 µg/mL). Agitar bien para mezclar.
 - e. Colocar 5 mL de este medio en los cuadrantes II y IV de cada placa.
 - f. Proteger las placas de la luz cubriéndolas con papel marrón. Almacenarlas entre 2 y 8 °C; la duración es de aproximadamente un mes.

IV. Control de calidad

- A. Control positivo: *M. bovis* American Type Culture Collection (ATCC) 35734 (sensible a concentraciones de 10 µg/mL de TCH).
- B. Control negativo: *M. tuberculosis* ATCC 25177 (resistente).

V. Procedimiento

1. Preparar una suspensión de la micobacteria desconocida en agua estéril, con una turbidez equivalente al estándar 1 de McFarland.
2. Diluir en agua desionizada estéril para hacer una suspensión entre 10⁻³ a 10⁻⁴.
3. Sembrar tres gotas de cada dilución en un cuadrante control y en un cuadrante TCH de las placas en cuadrantes.
4. Cubrir las placas con papel marrón para evitar la exposición a la luz y dejarlas a temperatura ambiente sin mover para permitir la adsorción del inóculo.
5. Colocar cada placa en una bolsa con cierre relámpago permeable al CO₂, invertirlas e incubar a 37 °C en 8 a 10% de CO₂ durante 3 semanas.
6. Finalizada la incubación, contar las colonias en el cuadrante control y en el cuadrante que contiene TCH en concentración de 10 µg/mL.

VI. Resultados

- A. Calcular el porcentaje de resistencia de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Número de colonias en el cuadrante con TCH} \times 100}{\text{Número de colonias resistentes en el cuadrante control}} = \text{Porcentaje de resistencia}$$

- B. Registrar el cultivo problema como resistente a la TCH si la cifra calculada es mayor del 1%.

VII. Bibliografía

- Harrington R, Karlson AG. Differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* by in vitro procedures. Am J Vet Res 1967;27:1193-1196.
- Lutz B. Identification tests for mycobacteria: Inhibition by thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
- Wayne LG, et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase and for resistance to isoniazid, thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine and *p*-nitrobenzoate. Int J Syst Bacteriol 1976;26:311-318.

PROTOCOLO 19-10

CAPTACIÓN DE HIERRO

- I. Principio

La capacidad de captar hierro de un reactivo que contenga hierro inorgánico ayuda a diferenciar *Mycobacterium fortuitum* y *M. phlei* (positivos) de *M. chelonae* y *M. abscessus*, que no captan hierro.
- II. Muestra

Colonia madura de la especie desconocida de *Mycobacterium* aislada en un material clínico, desarrollada en agar inclinado (pico de flauta) en medio de Löwenstein-Jensen.
- III. Materiales
 - A. Equipo
 1. Gabinete de bioseguridad.
 2. Estufa de incubación entre 28 y 30 °C.
 3. Pipetas de Pasteur estériles.
 - B. Medios
 1. Tubos de Löwenstein-Jensen en pico de flauta (comercializados por Remel Laboratories, Lenexa, KS).
 - C. Reactivos

Citrato amónico férrico al 20%.

 1. Agregar 20 g de citrato amónico férrico a 100 mL de agua desionizada.
 2. Agitar para disolver.
 3. Colocar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
 4. Conservar en frigorífico entre 2 y 8 °C.
- IV. Control de calidad
 - A. Control positivo: *M. fortuitum*, American Type Culture Collection (ATCC) 6841.
 - B. Control negativo: *M. chelonae* ATCC 35751; medio sin sembrar y reactivo solo.
- V. Procedimiento
 1. Utilizar un subcultivo en la fase activa de crecimiento (de 1 a 2 semanas) de una micobacteria de desarrollo rápido en agar inclinado (pico de flauta) de Löwenstein-Jensen.
 2. Agregar tantas gotas de citrato amónico férrico al 20% como mililitros de medio contenga el agar inclinado. Por ejemplo, para 8 mL de medio, agregar 8 gotas de citrato amónico férrico.
 3. Reincubar el pico de flauta entre 28 y 30 °C hasta 3 semanas.
 4. Observar la superficie de los picos de flauta en busca de la presencia de color oscuro, marrón oxidado.
- VI. Resultados

El color de una prueba verdaderamente positiva de captación de hierro debe ser de óxido muy oscuro. Una reacción positiva observada con una cepa de micobacteria de desarrollo rápido es indicativa de *M. fortuitum*.
- VII. Notas acerca del procedimiento

Si los resultados no son los esperados, controlar la edad y la pureza de los cultivos control y en estudio. Repetir las pruebas con reactivo de citrato amónico férrico nuevo y con nuevos cultivos control.
- VIII. Limitaciones del procedimiento

Algunos aislamientos de *M. chelonae* producen un color marrón bronceado, denominado a veces "parecido al de una tortuga", que representa una reacción falsa positiva. Buscar un color de óxido muy oscuro.
- IX. Bibliografía

Lutz B. Iron uptake. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook, Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

Silcox VA, Good RA, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex. J Clin Microbiol 1981;14:686-691.

PROTOCOLO 19-11

ACUMULACIÓN DE NIACINA

- I. Principio

Todas las especies de *Mycobacterium* producen ribonucleótido de niacina; sin embargo, casi todas las cepas de *M. tuberculosis*, *M. simiae* y algunas cepas de *M. chelonae* carecen de las enzimas necesarias para convertir la niacina a dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD). La niacina se acumula en el medio de cultivo, del que puede ser extraída con agua o solución fisiológica estériles. El extracto se coloca en un pequeño tubo de ensayo al cual se agrega una tira de papel de filtro impregnada en reactivo para niacina.

PROTOCOLO 19-11

ACUMULACIÓN DE NIACINA (cont.)

II. Muestra

Un cultivo con desarrollo denso de más de 3 semanas en Löwenstein-Jensen del microorganismo por probar. El crecimiento en otros medios de cultivo no produce la niacina suficiente como para obtener una reacción positiva de la prueba por este método.

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de bioseguridad.
2. Estufa de incubación a 37 °C.

B. Materiales

1. Tubos de ensayo estériles con tapa de rosca, de 20 × 110 o de 20 × 125 mm.
2. Pipetas de Pasteur estériles.
3. Pipetas estériles de 5 mL.

C. Reactivos

1. Tiras de papel de filtro para niacina (Difco).
2. H₂O estéril.

IV. Estándares y controles (incluir controles con cada determinación)

- A. Control positivo: *M. tuberculosis* American Type Culture Collection (ATCC) 25177.
- B. Control negativo: *M. intracellulare* ATCC 13950.

V. Procedimiento

1. Cubrir la superficie de agar inclinado (pico de flauta) de Lowenstein-Jensen sobre el crecimiento denso del microorganismo por probar con 1 mL de H₂O estéril. Punzar el medio con la punta de la pipeta para permitir la entrada de agua en el medio subyacente.
2. Inclinar el tubo de tal forma que el agua cubra todo el pico de flauta. Dejar en reposo durante 20 a 30 minutos.
3. Rotar el tubo de modo que el agar inclinado mire hacia abajo. Extraer con cuidado 0.6 mL de extracto, sin tocar el agar inclinado y transferir a un tubo de ensayo con tapa de rosca.
4. Con una pinza, dejar caer una tira de prueba para niacina con la flecha hacia abajo, dentro del tubo. Tapar el tubo de inmediato.
5. Agitar el tubo con suavidad y repetir la agitación después de 5 y 10 minutos.
6. Después de 12 a 15 minutos, y no más de 30, observar la reacción en busca de color amarillo.

VI. Resultados

A. Interpretación

El desarrollo de color amarillo indica una prueba positiva. Si un cultivo se asemeja a *M. tuberculosis*, pero la prueba de niacina es negativa, reincubar el agar inclinado 2 a 4 semanas más y repetir la prueba.

VII. Limitaciones del procedimiento

Puede haber reacciones falsas negativas. Las razones son: 1) poco crecimiento en el agar inclinado, 2) no punzar el agar si el desarrollo es confluyente y 3) la presencia de bacterias contaminantes que puedan metabolizar la niacina que se haya acumulado.

M. simiae y algunas cepas de *M. bovis*, *M. marinum* y *M. chelonae* pueden acumular niacina en el medio de prueba. Estas especies pueden diferenciarse con facilidad de *M. tuberculosis* por varias características claves descritas en la sección de interpretación de este manual.

VIII. Bibliografía

- Gungadharan PR, Droubi DSA. A comparison of four different methods for testing the production of niacin by mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1971;104:434-437.
- Kilburn JO, Kubica GP. Reagent impregnated paper for detection of niacin. *Am J Clin Pathol* 1968;50:530-531.
- Konno K et al. Niacin metabolism in mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1966;93:41-46.
- Lutz B. Nitrate reduction. En: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
- Runyon EH, Selin MJ, Hawes HW. Distinguishing mycobacteria by the niacin test. *Am Rev Tubercu* 1959;79:663-665.
- Young WE Jr, et al. Development of paper strip test for the detection of niacin produced by mycobacteria. *Appl Microbiol* 1970;20:939-945.

PROTOCOLO 19-12

REDUCCIÓN DE NITRATOS: MICOBACTERIAS

I. Principio

Las micobacterias que producen nitrorreductasa son capaces de catalizar la reducción de nitratos a nitritos. En la reacción, se extrae oxígeno del nitrato de acuerdo con la siguiente fórmula:



El nitrito producido se detecta por el agregado de α -naftilamina y ácido sulfanílico, con formación del colorante rojo de diazonio *p*-sulfobenceno-azo- α -naftilamina.

II. Muestra

Un cultivo de 3 a 4 semanas del microorganismo por probar, desarrollado en medio de Löwenstein-Jensen u otro medio con huevo coagulado.

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de bioseguridad.
2. Baño María a 37 °C o platina caliente.

B. Materiales

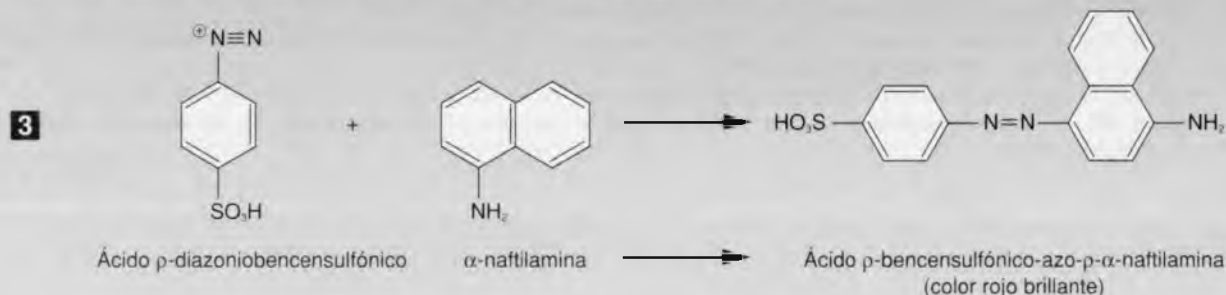
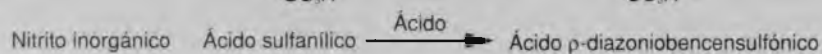
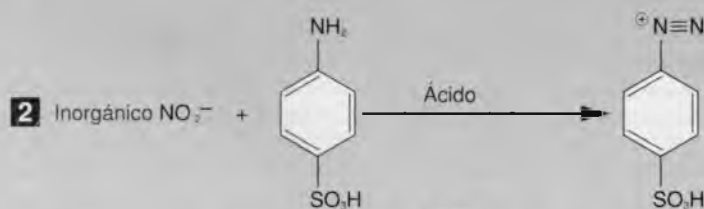
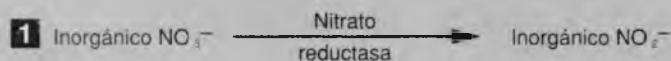
1. Pipetas de Pasteur estériles.
2. Pinzas estériles.

C. Reactivos

1. Sustrato para la prueba de nitratos (0,01 M) en buffer fosfatos M/45 (0,02 M, pH 7)

NaNO_3	0,8 g
KH_2PO_4	1,17 g
Na_2HPO_4	1,93 g
H_2O	999 mL (volumen final)

MECANISMO PROPUESTO PARA LA REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE NITRATOS



PROTOCOLO 19-12

REDUCCIÓN DE NITRATOS: MICOBACTERIAS (cont.)

Disolver y mezclar las sustancias. Ajustar el pH a 7,0. Colocar en autoclave y almacenar en alícuotas de 0,2 mL en tubos estériles. Conservado entre 2 y 8 °C, la duración es de 1 a 2 meses.

2. Sulfanilamida al 0,2%: disolver por completo 0,1 g de sulfanilamida en 50 mL de agua desionizada. Puede ser necesario calentar el agua entre 47 y 50 °C para que haya disolución completa. Si se almacena en frascos color caramelo entre 2 y 8 °C, la duración es de alrededor de un mes.
3. Diclorhidrato de *N*-(1-naftil)etilendiamina al 0,1%: disolver 0,05 g de diclorhidrato de *N*-(1-naftil)etilendiamina en 50 mL de agua desionizada. La duración es de un mes si se almacena en frascos color caramelo entre 2 y 8 °C.

IV. Control de calidad

- A. Control positivo: *M. tuberculosis* American Type Culture Collection (ATCC).
- B. Control negativo: complejo *M. avium* ATCC.
- C. Control de reactivo negativo: tubo sin sembrar con el sustrato adecuado.

V. Procedimiento

1. Emulsificar un ansa o una punta de espátula cargada con colonias provenientes del medio sólido en 2 mL de sustrato para nitratos.
2. Agitar en forma manual para mezclar e incubar entre 35 y 37 °C durante 2 horas.
3. Agregar los reactivos a la mezcla anterior en el siguiente orden:
 - 1 gota de HCl concentrado
 - 2 gotas de sulfanilamida al 0,2%
 - 2 gotas de diclorhidrato de *N*-(1-naftil)etilendiamina al 0,1%
4. Dejar la mezcla en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Observar el desarrollo de color rosado a rojo.

VI. Resultados

La aparición de color rosado a rojo indica una prueba positiva. Puede hacerse una lectura cuantitativa si se compara con estándares de reducción de nitratos. En la mayoría de los laboratorios no se realiza la cuantificación.

VII. Notas acerca del procedimiento

Si no hay cambio de color, confirmar el resultado negativo agregando una pequeña cantidad de cinc en polvo. La aparición de color rojo intenso o rosado después de agregar el polvo de cinc indica que el nitrato ha sido reducido. Conservar los reactivos en frigorífico, a 2 a 8 °C, protegidos de la luz directa.

VIII. Limitaciones del procedimiento

En algunos casos, el color puede desvanecerse con rapidez y pueden obtenerse resultados falsos negativos si la lectura no se realiza de inmediato después de agregar los reactivos.

IX. Bibliografía

- Master RN. Nitrate reduction. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
- Virtanen S. A study of nitrate reduction of mycobacteria. Acta Tuberc Scand Suppl 1960;418:119.
- Wayne LC, Dubek SR. Classification and identification of mycobacteria: II. Tests employing nitrite as substrates. Am Rev Respir Dis 1965;91:478-745.

PROTOCOLO 19-13

PIRAZINAMIDASA

I. Principio

La desaminación de la pirazinamida a ácido pirazinoico en 4 días es una característica fenotípica útil por la cual puede diferenciarse *M. marinum* (positivo) de *M. kansasii* (negativo) y que permite distinguir las cepas de *M. bovis* débilmente niacina positivas (negativas) del complejo de *M. tuberculosis* (positivo).

II. Muestra

Colonias maduras de la especie desconocida de *Mycobacterium* aisladas en materiales clínicos, desarrolladas en agar inclinado (pico de flauta) del medio de Löwenstein-Jensen o en agar de Middlebrook 7H-10.

III. Materiales

- A. Equipo: ninguno
- B. Medio
 1. Medio sustrato para pirazinamidasa
 - a. Disolver 6,5 g de caldo base de Dubos en 1 L de agua destilada.

PROTOCOLO 19-13

PIRAZINAMIDASA (cont.)

b. Agregar

Pirazinamida	0,1 g
Piruvato de sodio	2,0 g
Agar	15 g

c. Calentar para disolver. Fraccionar de a 50 mL en tubos con tapa de rosca.

d. Colocar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

e. Dejar solidificar el agar con los tubos en posición vertical.

f. La duración es de 6 meses si se almacenan entre 2 y 8 °C. Descartar si el agar parece deshidratado o contaminado.

C. Reactivos

Sulfato amónico ferroso al 1% (preparar inmediatamente antes de usar): colocar 0,1 g de sulfato amónico ferroso en tubos estériles con tapa de rosca. Agregar 10 mL de agua desionizada estéril inmediatamente antes de usar y dejar que los cristales se disuelvan.

D. Materiales

1. Palillos de madera estériles.

2. Pipetas estériles de 1 o 5 mL.

IV. Control de calidad

A. Control positivo: *M. intracellulare* American Type Culture Collection (ATCC) 13950.

B. Control negativo: *M. kansasii* ATCC 12478.

V. Procedimiento

1. Sembrar el contenido de un ansa bien cargada con un subcultivo en fase de desarrollo activo sobre la superficie de dos tubos de agar pirazinamidasa para siembra en profundidad.

2. Incubar los tubos con las tapas flojas a 37 °C.

3. Sacar uno de los tubos de la estufa de incubación después de 4 días. Sacar también uno de los tubos control.

4. Agregar 1 mL de sulfato amónico ferroso al 1% recién preparado a cada tubo.

5. Observar los tubos en busca de una banda rosada en el agar después de dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Colocar los tubos negativos en frigorífico y examinarlos nuevamente a las 4 horas en busca de la banda rosada.

VI. Resultados

A. Interpretación

Después de 4 horas, observar los tubos en busca de la aparición de una banda rosada en la capa de reactivo que se encuentra sobre la superficie del agar (reacción positiva), utilizando luz incidente contra un fondo blanco. Repetir el procedimiento con el tubo restante después de 7 días de incubación.

VII. Notas acerca del procedimiento

Realizar todos los procedimientos en una campana de bioseguridad.

VIII. Bibliografía

Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1974;109:147-151.

Lutz B. Identification tests for mycobacteria: Pyrazinamidase. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook, Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 19-14

TOLERANCIA AL CLORURO DE SODIO: MICOBACTERIAS

I. Principio

De las micobacterias de desarrollo lento, sólo *M. triviale* crece en medios que contienen 5% de NaCl; de las micobacterias de desarrollo rápido de importancia médica, sólo *M. chelonae* subespecie *chelonae* no se desarrolla en esos medios.

II. Muestra

Un cultivo de 3 a 4 semanas del microorganismo por probar, desarrollado en un medio de Löwenstein-Jensen u otro medio con huevo coagulado.

PROTOCOLO 19-14

TOLERANCIA AL CLORURO DE SODIO: MICOBACTERIAS (cont.)

III. Materiales

A. Equipo

1. Campana de bioseguridad.
2. Gradillas inclinadas.

B. Materiales

1. Palillos de madera estériles.
2. Pipetas estériles de 1 mL.
3. Estándar 1 de McFarland.

C. Medios

1. Löwenstein-Jensen sin NaCl al 5% en agar inclinado (pico de flauta).
2. Löwenstein-Jensen con NaCl al 5% en pico de flauta.
3. Caldo Dubos Tween o Middlebrook 7H9.

IV. Control de calidad

- A. Control positivo: *M. fortuitum* American Type Culture Collection (ATCC) 6841.
- B. Control negativo: *M. gordonae* ATCC 14470.

Hacer controles para cada nuevo número de lote de medio que se reciba. Descartar el medio si los resultados con los microorganismos control no son los esperados. Adquirir el medio de Löwenstein-Jensen con NaCl y sin él en tubos del mismo tamaño, para que la interpretación de los resultados sea coherente.

V. Procedimiento

1. Utilizar un cultivo en crecimiento activo (de 2 a 4 semanas para las micobacterias de desarrollo lento; 1 a 2 semanas para las de desarrollo rápido). Hacer una suspensión de los microorganismos en caldo de Middlebrook 7H9 equivalente al estándar 1 de McFarland.
2. Tomar un pico de flauta de Löwenstein-Jensen con NaCl al 5% y uno sin NaCl al 5% y sembrar en cada tubo 0,1 mL de la suspensión descrita.
3. Incubar los picos de flauta con las tapas flojas en una estufa con 5 a 10% de CO₂. Colocar los picos de flauta acostados en una gradilla durante la incubación. Incubar durante una semana a 29 a 30 °C para los microorganismos de desarrollo rápido y a 37 °C para los de desarrollo lento. Colocar los tubos negativos en posición vertical; incubar 3 semanas más. Examinar visualmente los picos de flauta una vez por semana en busca de desarrollo.

VI. Resultados

1. Cuando se observen numerosas colonias en el tubo control y más de 50 colonias en el medio que contiene NaCl al 5%, considerar la prueba como positiva.
2. Si hay colonias en el tubo control y no hay desarrollo visible en el pico de flauta con NaCl, continuar la incubación hasta 4 semanas.

VII. Notas acerca del procedimiento

Utilizar el tubo sin NaCl al 5% para controlar la viabilidad del microorganismo. No es necesario que haya el mismo desarrollo en ambos tubos. Si el microorganismo no se desarrolla en el pico de flauta sin NaCl, repetir la prueba.

VIII. Limitaciones del procedimiento

Algunas cepas de *M. fortuitum* y de *M. chelonae* se desarrollan en medios con NaCl sólo a temperaturas inferiores a 35 °C. Por esta razón, todas las muestras deben incubarse a 29 a 30 °C.

IX. Bibliografía

- Lutz B. Sodium chloride tolerance. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook, Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
- Silcox VA, Good RA, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex. J Clin Microbiol 1981;4:686-691.

PROTOCOLO 19-15

HIDRÓLISIS DEL TWEEN-80

I. Principio

Tween-80® es la marca registrada del derivado polietilenado del monooleato de sorbitano. Algunas especies de *Mycobacterium* tienen una enzima que libera ácido oleico a partir del Tween-80. El cambio de color del naranja al rosado se debe a la hidrólisis del Tween-80, que modifica la rotación óptica de la luz que atraviesa el sustrato.

II. Muestra

Colonia madura de la especie de *Mycobacterium* desconocida aislada en materiales clínicos, desarrollada en agar inclinado (pico de flauta) en medio de Löwenstein-Jensen.

PROTOCOLO 19-15

HIDRÓLISIS DEL TWEEN-80 (cont.)

III. Materiales

A. Insumos

1. Palillos de madera estériles.
2. Tubos con tapa de rosca (12 × 100 mm) con 2.0 mL de agua destilada cada uno.

B. Medios

1. Pico de flauta en medio de Löwenstein-Jensen.

C. Reactivos

1. Reactivo para hidrólisis del Tween-80.
2. Dos gotas de reactivo Difco (Detroit, MI) agregadas al agua destilada de los tubos con tapa de rosca.

D. Equipo

1. Campana de bioseguridad.

IV. Control de calidad

A. Control positivo: *M. kansasii*, American Type Culture Collection (ATCC) 12478 incubado durante 12 días.

B. Control negativo: cultivo madre de *M. intracellulare* ATCC 13950.

C. Reactivo negativo: tubo sin sembrar de sustrato, incubado durante 12 días.

V. Procedimiento

1. Agregar 2 gotas de reactivo Tween a 1 mL de agua destilada estéril en tubos con tapa de rosca.
2. Sembrar una ansada del microorganismo por probar.
3. Incubar a 35 °C en la oscuridad, con las tapas bien cerradas.
4. Inspeccionar los tubos a las 24 horas. Si son negativos, leer otra vez a los 5 y a los 10 días. Comparar el color del líquido con el de los tubos control.

VI. Resultados

El resultado se considera positivo cuando el líquido, no las células, vira de un naranja pálido al rosa o rojo. En general, *M. kansasii* se torna positivo dentro de las 24 horas. Leer nuevamente a los 3, 5 y 10 a 12 días. Anotar los resultados y descartar los positivos. Descartar todos los tubos a los 12 días.

VII. Notas acerca del procedimiento

Mantener el reactivo para hidrólisis del Tween en la oscuridad. No almacenar ni incubar los tubos a la luz. El color rojo de una reacción positiva no se debe a un cambio de pH, sino a la liberación de rojo neutro.

VIII. Bibliografía

Lutz B. Tween-80 hydrolysis. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Mycobacteriology Section. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.

Kilburn JO, et al. Preparation of a stable mycobacterial Tween hydrolysis test substrate. App Microbiol 1973;26:826.

Wayne LG, Doubek JR, Russell RL. Classification and identification of mycobacteria: I Tests employing Tween-80 as substrate. Am Rev Respir Dis 1964;90:588-597.

PROTOCOLO 19-16

UREASA: MICOBACTERIAS

I. Principio

La ureasa es una enzima que tienen muchas especies de *Mycobacterium*, que puede hidrolizar la urea para formar amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumento de pH del medio.

II. Muestra

A. Tipo de muestra

Colonia madura de la especie de *Mycobacterium* desconocida, aislada en materiales clínicos y desarrollada en agar inclinado (pico de flauta) en medio de Löwenstein-Jensen.

III. Materiales

A. Equipo

1. Gabinete de seguridad biológica.
2. Estufa de incubación a 37 °C.

PROTOCOLO 19-16

UREASA: MICOBACTERIAS (cont.)

B. Medio

1. Caldo urea

- Agregar 10 g de Bacto agar base urea Difco (Detroit, MI) concentrado a 90 mL de agua desionizada estéril. Mezclar bien para disolver.
- Fraccionar asépticamente en alícuotas de 3 mL en tubos de ensayo estériles con tapa de rosca.
- Almacenar entre 2 y 8 °C; la duración es de un mes.

IV. Control de calidad

A. Control positivo: *M. kansasii* American Type Culture Collection (ATCC) 12478.

B. Control negativo: *M. avium/intracellulare* ATCC 13950.

V. Procedimiento

- Sembrar cada tubo de sustrato con una punta de espátula llena de un cultivo en fase de crecimiento activo. Emulsificar por completo el cultivo en el caldo.
- Incubar a 37 °C durante 5 días.
- Leer los tubos a los 1, 3 y 5 días.

VI. Resultados

El cambio de color del amarillo al rosa fuerte o al rojo indica una reacción positiva. La ausencia de cambios de color es una reacción negativa.

VII. Notas acerca del procedimiento

Repetir las pruebas que tengan color rosa pálido; si la repetición de la prueba es también ±, informar como negativa.

VIII. Limitaciones del procedimiento

- Las pruebas falsas positivas por lo general se deben a una interpretación incorrecta de los resultados, a una incubación más allá de los 5 días o a la contaminación de los cultivos de prueba o controles.
- Los resultados falsos negativos se deben al uso de un medio incorrecto (alguno utilizado para probar bacterias diferentes de los bacilos ácido-alcohol resistentes), a un inóculo insuficiente o a que los cultivos son demasiado viejos.

IX. Bibliografía

Kent PT. Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985. Department of Health and Human Services publication 86-21654-6.

Lutz B. Identification tests for mycobacteria: urease. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

Murphy DB. Hawkins JE. Use of urease disks in the identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1975;1:465-468.

PROTOCOLO 19-17

SONDAS DE DNA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

I. Principio

Se comercializa un sistema, AccuProbe Culture Confirmation Tests (GenProbe, Inc., San Diego, CA), para la identificación de aislamientos de varias especies de micobacterias (complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, complejo *M. avium* y *M. kansasii*). El sistema se basa en el uso de sondas de DNA complementarias al rRNA específico de especie. Las células micobacterianas se lisan por sonicación, se matan por calor y se exponen a DNA marcado con un colorante quimioluminiscente. La sonda de DNA marcada se combina con el rRNA del microorganismo para formar un híbrido estable de DNA-RNA. Un reactivo de selección "mata" las señales emitidas por todo el DNA no unido. La quimioluminiscencia producida por los híbridos DNA-RNA se mide con un luminómetro.

II. Muestra

Puede usarse cualquier cultivo en crecimiento activo de menos de un mes, aislado en un medio líquido o sólido (Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11, 7H11 selectivo o Löwenstein-Jensen).

PROTOCOLO 19-17

SONDAS DE DNA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS (cont.)

III. Materiales

A. Reactivos

Reactivo	Descripción	Temperatura de almacenamiento (°C)
Tubos para lisado	Buffer y perlas de vidrio liofilizados	23-25
Reactivo sonda	DNA especie-específico liofilizado en tubos	4
Reactivo 1	Diluyente de la muestra	23-25
Reactivo 2	Diluyente de la sonda	23-25
Reactivo 3	Reactivo de selección	23-25
Detección I	H ₂ O ₂ en solución de ácido nítrico con NaOH 1 N	23-25
Detección II	H ₂ O ₂ en solución de ácido nítrico con NaOH 1 N	23-25
Aumentador ultrasónico	Solución similar detergente para aumentar la sonicación	23-25

B. Materiales

1. Micropipetas (100 µL)
2. Micropipeteador (300 µL)
3. Repipeteador (300 µL)
4. Jeringas para repipeteador
5. Ansas estériles de plástico (1 µg)

C. Equipo

1. Luminómetro (Leader 1, Leader 250 o PAL).
2. Agitadora vorticial.
3. Baño de agua o platina caliente, 90 ± 5 °C.
4. Baño de agua o platina caliente, 60 ± 5 °C.

IV. Control de calidad

A. Frecuencia y tolerancia de los controles

1. Correr un control positivo y uno negativo con cada lote de microorganismos por probar.
2. Si los controles no se encuentran dentro de los límites preestablecidos, controlar la edad del cultivo (debe ser de menos de 2 meses), el nivel de agua del sonicador, la calidad del sonicador (observando los patrones de ondas de agua cuando está encendido: el agua debe "bailar") y la temperatura de hibridación; si fuera necesario, correr un estándar de tritio.

B. Microorganismos de control

Sonda por probar	Control	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> American Type Culture Collection (ATCC) 25291	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	<i>M. avium</i> ATCC 25291
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 14470	<i>M. avium</i> ATCC 25291
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19073
Complejo <i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	<i>M. gordonae</i> ATCC 14470
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177

V. Procedimiento

1. Agregar una taza de aumentador ultrasónico al agua del sonicador. Desgasificar el agua durante 15 minutos. Prender el baño María (o platina caliente) a 95 °C y el baño María (o platina caliente) a 60 °C.
2. Agregar 100 mL de reactivo 1 (diluyente de la muestra) y 100 mL de reactivo 2 (diluyente de la sonda) a cada tubo de lisado.
3. Trabajando en un gabinete de bioseguridad, transferir el volumen de un ansa (1 µL) del microorganismo en estudio. Frotar el ansa contra las paredes del tubo para descargar todo el inóculo.
4. Colocar los tubos de lisado en el sonicador. Asegurarse de que el nivel de agua cubra el contenido de los tubos. No permitir que los tubos toquen las paredes del sonicador y accionarlo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

PROTOCOLO 19-17

SONDAS DE DNA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS (cont.)

5. Colocar los tubos de lisado en el baño María (o platina caliente) a 95 °C durante 15 minutos.
 6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 7. Pipetear 100 mL del lisado muerto dentro del tubo con reactivo de sonda.
 8. Incubar los tubos en baño María (o platina caliente) a 60 °C durante 15 minutos.
 9. Pipetear 300 mL de reactivo 3 (reactivo de selección) en cada tubo. Tapar los tubos, agitar en la agitadora vortical y colocarlos de inmediato otra vez en baño María (o platina caliente) a 60 °C. Incubar 5 minutos.
 10. Preparar el luminómetro para usar haciendo un ciclo completo de lavado. Para evitar las cargas estáticas y asegurarse de que no queden residuos por fuera de los tubos, limpiar cada uno con papel tisú húmedo antes de colocarlo en el luminómetro. Leer cada tubo y los controles. El luminómetro registra unidades relativas de luz (URL).
- VI. Resultados
- A. Un resultado positivo es > 30 000 URL.
 - B. Las señales menores de 30 000 URL se consideran negativas.
 - C. Repetir todas las pruebas con resultados entre 20 000 y 29 999 URL.
- VII. Notas acerca del procedimiento
- A. Es importante mantener la platina caliente a 60 ± 1 °C ya que la configuración circular del híbrido DNA-RNA es sensible a la temperatura.
 - B. El nivel de agua del sonicador debe ser suficiente para cubrir el buffer de hibridación, las perlas y el microorganismo.
 - C. Otras fuentes de error incluyen la omisión de agitar en agitadora vortical después de agregar la mezcla microorganismo-buffer al tubo con sonda y después de agregar el reactivo 3, que inactiva el éster de acridinio no unido al rRNA.
 - D. Este método se encuentra en evaluación para utilizarlo con frascos BACTEC.
- VIII. Limitaciones del procedimiento
- A. Este método no puede llevarse a cabo directamente sobre muestras clínicas recién obtenidas; sólo se usa para la confirmación de cultivos.
 - B. Una pequeña cantidad de aislamientos, determinados bioquímicamente como pertenecientes al complejo *M. avium*, no dan resultados positivos con la sonda para el complejo *M. avium*. En la actualidad, la ubicación taxonómica de estas cepas es dudosa.
 - C. La prueba para confirmación de un cultivo del complejo *M. tuberculosis* no diferencia entre *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. microti*.
 - D. La confirmación de un cultivo del complejo *M. avium* no diferencia entre *M. avium* y *M. intracellulare*.
- IX. Bibliografía
- Gen-Probe. Product Information: AcuProbe Mycobacterium Culture Confirmation Tests. San Diego CA: Gen-Probe. 1990.
- Stockman L. Identification of Mycobacteria in DNA probes. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology. 1992.

PROTOCOLO 19-18

DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS DE *M. TUBERCULOSIS* POR MÉTODOS RADIOMÉTRICOS

I. Principio

El metabolismo del [^{14}C] ácido palmítico a $^{14}\text{CO}_2$ por parte de miembros del género *Mycobacterium* es un método sensible y específico para aislar, identificar y probar la sensibilidad de las micobacterias a los fármacos. El $^{14}\text{CO}_2$ se detecta en la cámara de ionización del BACTEC 460 (Becton Dickinson Instruments Systems, Sparks, MD). Debido a la sensibilidad del instrumento para detectar $^{14}\text{CO}_2$, la capacidad de hallar desarrollo en presencia de alguno de los diversos agentes antituberculosos incorporados al medio proporciona un método rápido para determinar la resistencia a los fármacos. Las muestras clínicas pueden controlarse diariamente en busca de actividad. El desarrollo se determina por el hallazgo de un aumento de las lecturas de $^{14}\text{CO}_2$ en la cámara de ionización.

II. Muestra

Se utiliza un cultivo positivo sospechoso de ser *M. tuberculosis* (determinado por la inhibición del desarrollo en un frasco de NAP sembrado en paralelo, por observación de formación de cordones en las tinciones AAR, o por examen de las microcolonias en una placa con medio de Middlebrook 7H10), proveniente de un frasco ampolla de caldo BACTEC 12A que haya alcanzado un índice de desarrollo de 500 o más.

PROTOCOLO 19-18

DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS DE *M. TUBERCULOSIS* POR MÉTODOS RADIOMÉTRICOS (cont.)

III. Materiales

A. Equipo: Instrumento BACTEC 460

B. Medios

1. Frascos para cultivo en caldo BACTEC 12A (dos por cada muestra desconocida).
2. Frasco ampolla BACTEC NAP.
3. Frascos para cultivo en caldo BACTEC 12A, cada uno de ellos contiene uno de los siguientes fármacos antituberculosos:
 - a. Isoniazida
 - b. Estreptomina
 - c. Rifampicina
 - d. Etambutol

IV. Control de calidad

El control de calidad de los frascos ampolla que contienen antibióticos es realizado por el fabricante antes de su envío. La práctica local determinará si es necesario efectuar un control de calidad de cada lote nuevo de frascos ampolla que contienen antibióticos con una cepa de *M. tuberculosis* que tenga un perfil de resistencia conocido.

V. Procedimiento

1. El procedimiento comienza con la detección de un frasco ampolla BACTEC 12A positiva que haya alcanzado un índice de desarrollo de 100 en el cual se determina la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.
2. Inocular 1 mL del cultivo en un frasco ampolla que contenga medio 12A más *p*-nitroacetil-aminohidroxipropiofenona (NAP; véase protocolo 19-4). Sembrar también 1 mL del cultivo positivo en otro frasco ampolla que contenga sólo medio 12A.
3. Si el desarrollo es inhibido después de 3 a 5 días de incubación, el aislamiento es *M. tuberculosis* o *M. bovis*; la falta de inhibición del desarrollo indica que el microorganismo es una especie de *Mycobacterium* diferente de *M. tuberculosis*, caso en el cual no puede realizarse la prueba de sensibilidad BACTEC.
4. Si el desarrollo es inhibido en el frasco NAP, observar el índice de desarrollo en el frasco ampolla con medio 12A sin NAP que se ha sembrado en paralelo. Cuando el índice de desarrollo llega a 500, la concentración es suficiente para realizar estudios de sensibilidad a antimicobacterianos en la cepa desconocida de *M. tuberculosis*.
5. Sembrar 0,1 mL del cultivo positivo en cada uno de los frascos ampolla que contienen fármacos provistos por el fabricante (en la actualidad, isoniazida, estreptomina, rifampicina y etambutol) y con cepas control representativas.
6. Al mismo tiempo, sembrar otro frasco ampolla de medio 12A sin fármacos con 0,1 mL de una dilución 1:100 del cultivo positivo utilizado para sembrar los frascos ampolla con fármacos. Esto equivaldrá a un desarrollo del 1% en el método proporcional para prueba de sensibilidad a los fármacos.
7. Incubar los frascos ampolla y leerlos diariamente hasta que el índice de desarrollo en el frasco ampolla control alcance 30. En ese momento, registrar el índice de desarrollo de los frascos ampolla que contienen fármacos.

VI. Resultados

A. Interpretación

Si el aumento del índice de desarrollo en el medio que contiene fármacos es mayor que el cambio de índice de desarrollo del control (30 o más), la cepa de *M. tuberculosis* está creciendo en presencia de ese fármaco y se considera resistente.

VII. Notas acerca del procedimiento

La concentración final de fármaco en cada uno de los frascos ampolla es el 90% de la concentración nominal, debido al factor de dilución (2 mL de medio más 0,1 mL de solución de fármaco más 0,1 mL de inóculo = 2,2 mL).

VIII. Bibliografía

- Damato JJ, Collins MT, Rothlauf MV, et al. Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. *J Clin Microbiol* 1983;17:1066-1073.
- Gross WM, Hawkins JE. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1985;21:565-568.
- Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:384-388.
- Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al. Evaluation of the radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. *J Clin Pathol* 1983;18:689-696.

PROTOCOLO 20-1

MICROSCOPIA EN CAMPO OSCURO DE LESIONES GENITALES

I. Principio

La detección de espiroquetas en campo oscuro permite el diagnóstico presuntivo de sífilis durante el período primario, antes de que se desarrollen los anticuerpos. Existen pocas espiroquetas contaminantes en los genitales, de modo que la detección de espiroquetas de morfología compatible con *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* representa un diagnóstico firme. La prevalencia de espiroquetas en la cavidad bucal impone mayor precaución. Lo mejor es no realizar la prueba en la cavidad bucal: si se ven espiroquetas, su identidad debe establecerse por métodos inmunológicos específicos.

II. Equipos y reactivos

Microscopio de luz transmitida y un condensador de campo oscuro. Utilizar un objetivo 10× para enfocar la muestra y centrar el condensador de campo oscuro. Usar un objetivo 40× o 63× para examinar la muestra. La identificación final se hace con un objetivo 100×. Portaobjetos, de 26 mm × 76 mm. Su espesor debe concordar con lo recomendado en el manual del microscopio.

Cubreobjetos # 1, de 22 mm × 22 mm.

Aceite de inmersión no secante, Cargille® tipo A o similar.

Papel y líquido de limpieza para lentes.

Palillos de madera.

Solución fisiológica estéril.

Desinfectante, como yodo o alcohol al 70%.

III. Control de calidad

Para regular el control de condensador de campo oscuro puede usarse como control un raspado de mucosa gingival.

IV. Procedimiento

A. Obtención de la muestra

1. General

- Eliminar toda escara o costra que cubra la lesión.
- Eliminar el exudado con una gasa o esponja.
- Si es necesario, oprimir la base de la lesión o aplicar una ventosa para producir la acumulación de líquido tisular en la superficie de la úlcera.
- Hacer un frotis con un ansa estéril.
- Colocar un cubreobjetos sobre la muestra y presionar para eliminar las burbujas de aire.
- Examinar de inmediato.

2. Lesiones papuloescamosas secas de piel

- Eliminar con suavidad la capa superficial de piel, tratando de evitar el sangrado.
- Comprimir la lesión en caso de que aparezca muy poca cantidad de líquido.
- Tocar con un portaobjetos la lesión o transferir una pequeña cantidad de líquido a un portaobjetos, por medio de un ansa de bacteriología.
- Como alternativa, puede inyectarse una pequeña cantidad de solución fisiológica dentro de la lesión, aspirarla de nuevo y colocarla sobre el portaobjetos.
- Colocar un cubreobjetos y examinar de inmediato.

3. Lesiones vaginales y de cuello uterino

- Eliminar todo exudado cervical o vaginal bajo observación con un espéculo.
- Obtener exudado seroso con un ansa bacteriológica.
- Si es necesario, el exudado seroso puede producirse comprimiendo la lesión con una pinza de Kelly.
- Hacer los preparados como se describió antes.

4. Placas en mucosas

- Utilizando un ansa estéril, recoger parte del moco y colocarlo sobre un portaobjetos.
- Colocar un cubreobjetos y examinar de inmediato.

V. Observación de la muestra

Preparar el microscopio de campo oscuro antes de recoger la muestra.

Recorrer en forma sistemática el preparado usando un objetivo 40× a 63×.

Cuando se encuentre una estructura sospechosa, examinar con aumento 100×.

Una vez finalizada la observación, descartar el preparado en desinfectante.

Características de *T. pallidum* y de la especie genital saprófita, *T. refringens*.

PROTOCOLO 20-1

MICROSCOPIA EN CAMPO OSCURO DE LESIONES GENITALES (cont.)

Característica	<i>T. pallidum</i>	<i>T. refringens</i>
Morfología		
Forma	Delicado tirabuzón	Espiras flojas, gruesas
Longitud	6-14 μm	8-20 μm
Ancho	0,25-0,3 μm	0,4-0,75 μm
Separación entre espiras	Aproximadamente 1-1,5 μm	
Motilidad		
Traslación	Movimiento lento, deliberado, hacia adelante y atrás	Movimiento rápido, contorsivo
Rotación	Rotación lenta a rápida (tirabuzón); puede rotar en el mismo sitio	Rotación activa en serpentina
Flexión	Rotación acompañada por acodaduras y flexiones suaves Acodaduras rígidas en la porción media del microorganismo	Flexión marcada
Distorsión	Puede verse como un anillo o adherido a células	Ninguna destacable

VI. Resultados

A. Interpretación

Puede haber resultados falsos positivos si no se confirman las espiroquetas bucales o si se interpreta erróneamente la motilidad de las espiroquetas genitales.

Unos pocos eritrocitos en el preparado son índice de que se ha obtenido exudado, pero la muestra no debe ser sanguinolenta. Deben eliminarse con cuidado las burbujas de aire.

Pueden obtenerse resultados falsos negativos si se obtiene insuficiente cantidad de exudado, si ha transcurrido mucho tiempo entre la toma de la muestra y la observación, si la lesión es tardía o si el paciente ha sido tratado con fármacos antitreponémicos.

VII. Bibliografía

Larson SA, Hunter EF, Kraus SJ, eds. Manual of Tests for Syphilis, 8ª ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1990.

PROTOCOLO 20-2

PRUEBA SÉRICA EN PORTAOBJETOS DEL VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (VDRL)

I. Principio

La prueba VDRL en portaobjetos es la prueba no treponémica de referencia para sífilis. Es la única prueba ampliamente reconocida para el diagnóstico de neurosífilis.

La VDRL es una prueba no treponémica de microfloculación. Utiliza un antígeno que contiene cardiolipina, lecitina y colesterol. El antígeno forma grumos microscópicos cuando se mezcla con anticuerpos dirigidos contra el complejo cardiolipina.

II. Equipos y reactivos

A. Equipo

1. Aguja no descartables sin bisel.
 - a. Para probar suero: calibre 18.
2. Frascos: redondos, de 30 mL, de boca estrecha, de 35 mm de diámetro, con tapones de vidrio o similar y fondo interior de superficie plana (Corning Glass Works, Corning, NY, catálogo LG-1 MW-90530).
3. Dispositivo de seguridad para pipetear con puntas descartables, que descargue 50 μL .
4. Pipetas serológicas, graduadas hasta la punta:
 - a. de 1 mL, graduadas en 1/100 mL.
 - b. de 5 mL, graduadas en 1/10 mL.
 - c. de 10 mL, graduadas en 1/10 mL.

PROTOCOLO 20-2

PRUEBA SÉRICA EN PORTAOBJETOS DEL VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (VDRL) (cont.)

5. Portaobjetos

- Para probar suero: de 25 × 75 mm, con 12 anillos de parafina o cerámica de alrededor de 14 mm de diámetro (los anillos deben ser lo suficientemente altos como para evitar derrames durante la rotación).
 - 12 concavidades de 16 mm de diámetro y 1,75 mm de profundidad.
- SopORTE para portaobjetos de 25 × 75 mm.
 - Molde para anillos de parafina si no se utilizan anillos de cerámica.
 - Placa rotatoria mecánica regulable a 180 ± 2 rpm, que describa un círculo de 19 mm de diámetro en el plano horizontal.
 - Recipientes para residuos o desinfectantes, guantes de látex descartables.
 - Cubiertas humectantes (en climas secos).

B. Reactivos

- Antígeno VDRL: conservar en la oscuridad a temperatura ambiente o en frigorífico. Descartar los frascos que contengan precipitado.
- Solución salina tamponada (amortiguada) VDRL, pH $6 \pm 0,1$ (NaCl al 1%) (adquirida o preparada).
- Muestras de suero control: reactivo (R), reactivo débil (D), no reactivo (N).
- Solución fisiológica al 0,9%.
- Solución fisiológica al 10%.

III. Procedimientos para las pruebas serológicas

A. Preparación de la suspensión antigénica

- Preparar una nueva suspensión de antígeno VDRL todos los días. La temperatura de los reactivos debe ser de 23 a 29 °C.
- Pipetear 0,4 mL de solución salina tamponada VDRL en el fondo de un frasco redondo de 30 mL con tapón de vidrio y con fondo interno de superficie plana.
- Agregar 0,5 mL de antígeno VDRL directamente a la solución fisiológica mientras se hace girar el frasco en forma continua, pero con suavidad, sobre una superficie plana. Agregar el antígeno gota a gota, a una velocidad aproximada de 6 segundos para cada 0,5 mL de antígeno. Mantener la punta de la pipeta en el tercio superior del frasco y no salpicar solución fisiológica sobre la punta de la pipeta. La velocidad adecuada de rotación se obtiene cuando el centro del frasco describe una circunferencia de 5 cm de diámetro, aproximadamente tres veces por segundo.
- Expulsar la última gota de antígeno de la pipeta sin que ésta toque la solución fisiológica. Continuar girando el frasco durante 10 segundos.
- Con una pipeta de 5 mL, agregar 4,1 mL de solución salina tamponada.
- Tapar el frasco y agitar invirtiéndolo alrededor de 30 veces en 10 segundos. La suspensión de antígeno debe utilizarse dentro de las 8 horas de su preparación.
- Mezclar la suspensión por agitación suave cada vez que se utilice. No mezclar aspirando y expeliendo con jeringa y aguja.

B. Comprobación de la precisión de la aguja distribuidora de la suspensión de antígeno

- La precisión de la prueba depende de la cantidad de antígeno utilizada. Controlar periódicamente la precisión de la aguja calibrada.
- Para las pruebas cualitativas y cuantitativas en suero, distribuir la suspensión de antígeno por medio de una jeringa con aguja calibre 18 sin bisel, que distribuya 60 ± 2 gotas de suspensión de antígeno por mililitro (17 µL/gota) cuando se mantiene en posición vertical.
- Colocar la aguja en una jeringa de 2 mL o en una pipeta de 1 mL y llenar la jeringa o la pipeta con suspensión de antígeno VDRL. Manteniendo la jeringa o la pipeta en posición vertical, contar la cantidad de gotas contenidas en 0,5 mL. La aguja está correctamente calibrada si produce 30 ± 1 gota cada 0,5 mL. Corregir o reemplazar la aguja si no cumple con estas especificaciones.

C. Prueba y almacenamiento de la suspensión de antígeno VDRL

- Preparar una nueva suspensión de antígeno todos los días. Almacenarla a temperatura ambiente, entre 23 y 29 °C.
- Probar la suspensión de antígeno con los sueros control reactivo, débilmente reactivo y no reactivo.
- Utilizar sólo las suspensiones de antígeno que reproducen el patrón de reactividad establecido para los controles.
- Después de terminar las pruebas del día, desechar la suspensión de antígeno y limpiar la aguja y la jeringa de distribución por lavado con agua, alcohol y acetona, en ese orden. Sacar la aguja de la jeringa después de la limpieza.

D. Preparación y conservación de las muestras

- Observar las medidas de seguridad recomendadas para la manipulación de sueros humanos.
- Centrifugar la sangre coagulada a temperatura ambiente entre 1 500 y 2 000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los elementos celulares.
- Transferir el suero a un tubo de ensayo limpio y seco y calentar a 56 °C en baño María durante 30 minutos.

PROTOCOLO 20-2

PRUEBA SÉRICA EN PORTAOBJETOS DEL VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (VDRL) (cont.)

4. Volver a centrifugar toda muestra que contenga detritos después de la inactivación por calor.
 5. Si la prueba se demora más de 4 horas, calentar nuevamente el suero a 56 °C durante 10 minutos.
 6. Las muestras deben estar a temperatura ambiente (23 a 29 °C) en el momento de la prueba.
- E. Realización de la prueba cualitativa en suero
1. Una vez que todos los reactivos alcanzan la temperatura ambiente, poner 50 µL de suero dentro de un anillo de parafina o cerámica colocado sobre un portaobjetos, utilizando un dispositivo de seguridad para pipetear. No usar portaobjetos con concavidades, cubetas o pocillos de vidrio.
 2. Resuspender suavemente la suspensión de antígeno VDRL.
 3. Manteniendo la jeringa y la aguja de distribución de antígeno VDRL en posición vertical, dejar salir varias gotas para eliminar el aire de la aguja. Luego agregar exactamente una gota producida por caída libre (17 µL) de suspensión de antígeno dentro de cada círculo que contenga suero.
 4. Colocar el portaobjetos sobre la placa rotatoria mecánica. Rotar durante 4 minutos a 180 ± 2 rpm. En climas secos, cubrir el portaobjetos con una cubierta humectante durante la rotación.
 5. Inmediatamente después de terminada la rotación, sacar el portaobjetos de la placa y leer los resultados de la prueba en microscopio, utilizando un ocular 10× y un objetivo 10×.
 6. Informar los resultados de la siguiente forma:

LECTURA**Grumos grandes o medianos****Grumos pequeños****Ausencia de grumos o ligera irregularidad****INFORME****Reactivo (R)****Reactivo débil (D)****No reactivo (N)**

7. Probar en forma cuantitativa hasta punto final todas las muestras que tengan resultado reactivo, reactivo débil o no reactivo "con rugosidades" en la prueba cualitativa.
- F. Realización de la prueba cuantitativa en suero
1. Cuantificar las muestras de suero hasta título final. Pueden hacerse pruebas cuantitativas hasta dilución 1:8 de tres muestras en un solo portaobjetos.
 2. Colocar 50 µL de solución fisiológica al 0,9% en círculos numerados del 2 al 4, sin distribuir la solución fisiológica.
 3. Utilizando un dispositivo de seguridad para pipetear, colocar 50 µL de suero en el círculo 1 y en el círculo 2.
 4. Mezclar la solución fisiológica y el suero del círculo 2, aspirando y expulsando la solución con la pipeta de seguridad ocho veces. Evitar la formación de burbujas.
 5. Transferir 50 µL del círculo 2 (1:2) al círculo 3 y mezclar.
 6. Transferir 50 µL del círculo 3 al círculo 4 y mezclar. Descartar los últimos 50 µL.
 7. Resuspender con suavidad la suspensión de antígeno VDRL.
 8. Manteniendo la jeringa y la aguja de distribución de antígeno VDRL en posición vertical, descartar varias gotas para eliminar el aire de la aguja. Luego, agregar exactamente 1 gota producida por caída libre (17 µL) de suspensión de antígeno a cada círculo.
 9. Colocar el portaobjetos en la placa rotatoria mecánica. Rotar durante 4 minutos a 180 ± 2 rpm. En climas secos, agregar una cubierta humectante.
 10. Inmediatamente después de terminada la rotación, leer los resultados de la prueba en microscopio, utilizando un ocular 10× y un objetivo 10×.
 11. Si la dilución más alta probada (1:8) es reactiva, proceder de la siguiente forma:
 - a. Preparar una dilución 1:8 de la muestra por probar. Agregar 0.1 mL de suero a 0.7 mL de solución fisiológica al 0,9% y mezclar por completo.
 - b. Colocar 50 µL de solución fisiológica al 0,9% en el segundo, tercero y cuarto anillo de parafina de una hilera del portaobjetos. Preparar diluciones seriadas adicionales para muestras fuertemente reactivas.
 - c. Agregar 50 µL de la dilución 1:8 de la muestra por probar a los anillos de parafina 1 y 2.
 12. Informar los títulos en términos de la mayor dilución que presenta resultado reactivo (no reacción débil):

DILUCIONES DE SUERO

No diluido	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
R	W	N	N	N	N
R	R	W	N	N	N
R	R	R	W	N	N
W	W	R	R	W	N
N (rugoso)	W	R	R	R	N
W	N	N	N	N	N

INFORME

Reactivo, sin diluir, 1 dil

Reactivo, dilución 1:2, 2 dils

Reactivo, dilución 1:4, 4 dils

Reactivo, dilución 1:8, 8 dils

Reactivo, dilución 1:16, 16 dils

Débilmente reactivo, sin diluir, 0 dil

PROTOCOLO 20-2

PRUEBA SÉRICA EN PORTAOBJETOS DEL VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (VDRL) (cont.)

IV. Resultados

A. Interpretación

1. La reacción VDRL es una ayuda para el diagnóstico de sífilis. Una reacción positiva puede indicar infección pasada o presente. Los resultados falsos positivos se deben a errores del laboratorio, a infecciones por otros treponemas o a la presencia de anticuerpos no relacionados con la infección treponémica. El valor pronóstico de una prueba VDRL positiva aumenta cuando se combina con una prueba treponémica reactiva, como la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (véase protocolo 20-4) o la prueba de microhemaglutinación.
2. Un resultado no reactivo puede indicar ausencia de infección, infección bien tratada o infección en el pasado lejano. Puede obtenerse un resultado no reactivo durante el período de incubación o en la sífilis primaria temprana. Se observan fenómenos de zona, en especial en presencia de títulos altos, en la sífilis secundaria. Los sueros deben diluirse si se obtienen resultados rugosos o si la información clínica indica la probabilidad de que exista sífilis.
3. Un aumento de cuatro veces en el título puede indicar reinfección o fracaso del tratamiento. Un descenso de cuatro veces en el título en la sífilis temprana por lo general indica un tratamiento adecuado.
4. Todos los sueros deben titularse hasta punto final. Pueden encontrarse títulos desusadamente altos en algunos pacientes con infección simultánea por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. En algunos pacientes con linfomas pueden encontrarse títulos falsos positivos muy altos.

V. Fuentes de error

1. Si la temperatura del suero, del ambiente de la prueba o de los reactivos es menor de 23 °C, la reactividad disminuye. Si la temperatura de cualquiera de ellos es mayor de 29 °C, la reactividad aumenta.
2. Si se utilizan sueros hemolizados, contaminados o extremadamente turbios, los resultados de la reacción son impredecibles.
3. La reactividad es impredecible si los reactivos están vencidos, la prueba se realiza en forma incorrecta o no se siguen estrictamente los procedimientos. La aspiración y la expulsión repetidas del antígeno VDRL con la jeringa y aguja pueden hacer que el antígeno pierda reactividad.

VI. Limitaciones de la prueba

1. El fenómeno de zona descrito puede producir resultados falsos negativos en sueros de título alto.
2. La suspensión de antígeno VDRL debe prepararse a diario.
3. La prueba VDRL en líquido cefalorraquídeo (LCR) debe realizarse sólo si la prueba en suero es reactiva.
4. Para la prueba VDRL no puede utilizarse plasma.
5. Se observan resultados biológicos falsos positivos con los antígenos de la cardiolipina, en especial en muestras provenientes de drogadictos, de pacientes con enfermedades como lupus eritematoso, mononucleosis, paludismo, lepra o neumonía viral, o de los que han sido recientemente vacunados.
6. Nota: la prueba VDRL en portaobjetos para LCR es similar a la que se hace con suero, pero existen importantes diferencias metodológicas (véase bibliografía). En el caso del LCR, los resultados sólo se informan como reactivo o no reactivo.

VII. Bibliografía

Larson SA, Hunter EF, Kraus SJ, eds. Manual of Tests for Syphilis, 8ª ed. Washington DC: American Public Health Association, 1990.

PROTOCOLO 20-3

PRUEBA RÁPIDA DE REAGINA PLASMÁTICA (RPR) EN TARJETA

I. Principio

La RPR (circle) Card Test fue instituida como prueba de detección sistemática en los Maryland State Department of Health Laboratories el 13 de enero de 1964. Las principales ventajas de la RPR en comparación con la prueba VDRL son que el suero no necesita ser tratado con calor, las lecturas son macroscópicas en lugar de microscópicas, el antígeno es estable y los componentes, desechables. Las pruebas pueden llevarse a cabo en forma rápida y económica, lo que hace que la técnica sea adecuada para operaciones de gran volumen. La sensibilidad y la especificidad de la prueba RPR son iguales a las de la VDRL y otras pruebas serológicas no treponémicas.

La suspensión de antígeno RPR es un antígeno de cardiolipina que contiene carbón y detecta "reagina", sustancia similar a un anticuerpo, presente en el plasma y el suero de las personas con sífilis o con exposición previa al treponema. Cuando una muestra contiene anticuerpos específicos, se produce floculación con coaglutinación de las partículas de carbón del antígeno RPR en tarjeta, que se ve como grumos negros contra el fondo blanco de la tarjeta recubierta con plástico. Esta coaglutinación puede leerse a simple vista; las muestras no reactivas tienen un color gris claro lechoso uniforme.

PROTOCOLO 20-3

PRUEBA RÁPIDA DE REAGINA PLASMÁTICA (RPR) EN TARJETA (*cont.*)

II. Equipos, materiales y reactivos

1. Aguja calibre 20 descartable, sin bisel, tratada con siliconas.
2. Frasco de plástico para distribuir antígeno, de 3,89 g.
3. Tarjetas RPR recubiertas de plástico con diez círculos, de aproximadamente 18 mm de diámetro cada uno.
4. Dispositivos plásticos desechables (Dispenstir®), para distribución-agitación, que libera 50 μ L.
5. Placa rotatoria mecánica, de velocidad fija o regulable a 100 ± 2 rpm, que describa un círculo de 1.8 cm de diámetro en el plano horizontal.
6. Cubierta humectante para la placa rotatoria.
7. Lámpara incandescente de alta intensidad.
8. Dispositivo de seguridad para pipetear, con puntas descartables de 50 μ L.
9. Recipientes para residuos y desinfectantes.
10. Guantes de látex desechables, anteojos de seguridad y ropa protectora.
11. Suspensión de antígeno RPR (una variante del antígeno para VDRL): combinación estabilizada de cardiolipina al 0,003%, lecitina al 0,020-0,022%, colesterol al 0,09%, cloruro de colina al 10%, EDTA 0,0125M, carbón al 0,1875%, Na_2HPO_4 0,1 M, KH_2PO_4 0,01 M, timerosal al 0,1% y agua destilada.
12. Muestras de suero control: sueros liofilizados sobre una tarjeta reactivo (R), de reacción mínima (MR) y no reactivo (N).
13. Solución fisiológica al 0,9% como diluyente.

III. Procedimientos

A. Comprobación de la precisión de la aguja para antígeno

1. Controlar periódicamente la aguja calibrada para asegurarse de que libera 60 ± 2 gotas/mL (17 μ L). La precisión de la prueba depende de la cantidad de antígeno que se utiliza.
2. Consultar el procedimiento de calibración de agujas para la prueba VDRL (véase protocolo 20-2).

B. Control y almacenamiento de la suspensión de antígeno

1. Conservar las ampollas de antígeno entre 2 y 8 °C. No almacenar bajo luz solar directa, por encima de 29 °C, ni congelar. El antígeno de una ampolla abierta es estable hasta 12 meses.
2. Fijar el mandril de la aguja a la pieza correspondiente del frasco plástico para distribución. Abrir la ampolla, después de agitarla para resuspender las partículas. Oprimir el frasco plástico para colapsarlo, insertar la aguja en la ampolla y aspirar toda la suspensión de antígeno con el frasco de distribución. Agitar con suavidad el frasco antes de colocar cada serie de gotas de antígeno.
3. Probar cada lote de suspensión de antígeno junto con un antígeno de reactividad estándar conocida antes de ponerlo en uso.
4. Con cada serie de determinaciones, comprobar la reactividad del antígeno con tarjetas control o con sueros de reactividad conocida. Utilizar sólo suspensiones que produzcan la reactividad adecuada.
5. Después de terminar el trabajo del día, sacar la aguja del frasco de distribución, lavarla con agua destilada y secar al aire. No frotar la aguja con elementos absorbentes (puede eliminarse la cubierta de siliconas).

C. Preparación y conservación de las muestras

1. Para las pruebas puede utilizarse suero o plasma. El plasma se obtiene recolectando sangre en un tubo que contenga EDTA como anticoagulante.
2. No probar muestras que estén macroscópicamente contaminadas, hemolizadas en exceso o quillosas.

D. Realización de la prueba cualitativa

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (23 a 29 °C) antes de realizar la prueba.
2. Colocar 50 μ L de suero o plasma en uno de los círculos de 18 mm de la tarjeta de prueba RPR, por medio de un Dispenstir o un dispositivo de seguridad para pipetear.
3. Con el Dispenstir invertido (el extremo cerrado) o con un palillo de madera plano, distribuir el suero o plasma para que cubra la totalidad del círculo, pero sin sobrepasar sus límites.
4. Agitar con suavidad el frasco de distribución para resuspender las partículas.
5. Manteniendo el frasco y la aguja en posición vertical, descartar varias gotas para eliminar el aire de la aguja. A continuación, agregar exactamente 1 gota producida por caída libre (17 μ L) de suspensión de antígeno a cada círculo que contenga suero o plasma. No mezclar el antígeno con el suero o plasma.
6. Colocar la tarjeta en la placa rotatoria mecánica bajo una cubierta humectante. Rotar la tarjeta durante 8 minutos a 100 ± 2 rpm.
7. Sacar inmediatamente la tarjeta de la placa. Inclinarla y rotarla con suavidad con la mano, como ayuda para distinguir los resultados no reactivos de los de reacción mínima. Leer las reacciones de la prueba mientras todavía están húmedas, utilizando una luz incandescente de alta intensidad, sin emplear aumento.

PROTOCOLO 20-3

PRUEBA RÁPIDA DE REAGINA PLASMÁTICA (RPR) EN TARJETA (cont.)

8. Informar los resultados de la siguiente forma:

LECTURA

**Formación característica de grumos, de marcada e intensa (reactivo)
a leve pero bien definida (reactividad mínima)
Irregularidad leve o ausencia de grumos**

INFORME

**Reactivo (R)
No reactivo (N)**

9. Realizar la prueba cuantitativa en las muestras que tengan cualquier grado de reactividad o "rugosidad".

IV. Realización de la prueba cuantitativa

1. Cuantificar a punto final todas las muestras de suero con resultados reactivos o no reactivos rugosos en la prueba cualitativa. Probar cada muestra sin diluir (1:1) y en diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
2. Colocar 50 µL de solución fisiológica en círculos numerados del 2 al 5. No distribuir la solución fisiológica.
3. Utilizando un dispositivo de seguridad para pipetear, colocar 50 µL de suero en el círculo 1 y 50 µL de suero en el círculo 2. Mezclar la solución fisiológica y el suero aspirando y expulsando la mezcla ocho veces con la pipeta de seguridad. Evitar la formación de burbujas.
4. Transferir 50 µL del círculo 2 (1:2) al círculo 3 y mezclar.
5. Transferir 50 µL del círculo 3 (1:4) al círculo 4 y mezclar.
6. Transferir 50 µL del círculo 4 (1:8) al círculo 5 (1:16) y mezclar. Descartar los últimos 50 µL.
7. Utilizando el extremo ancho de un Dispensitir limpio, distribuir la dilución de suero hasta cubrir toda la superficie del círculo 5, la dilución más alta (1:16). Con el mismo Dispensitir, hacer lo mismo con los círculos 4 (1:8), 3 (1:4), 2 (1:2) y 1 (sin diluir).
8. Agitar con suavidad el frasco de distribución para resuspender las partículas.
9. Manteniendo el frasco y la aguja en posición vertical, descartar una o dos gotas para eliminar el aire de la aguja. A continuación, agregar exactamente 1 gota producida en forma espontánea (17 µL) de suspensión de antígeno a cada círculo. No mezclar.
10. Colocar la tarjeta en la placa rotatoria mecánica bajo una cubierta humectante y rotar la tarjeta durante 8 minutos a 100 ± 2 rpm.
11. Sacar de inmediato la tarjeta de la placa; inclinar y rotar con suavidad la tarjeta con la mano (tres o cuatro movimientos de ida y vuelta), como ayuda para distinguir los resultados no reactivos de los de reacción mínima. Leer los resultados mientras la prueba todavía está húmeda, sin utilizar aumento, usando una luz incandescente intensa.
12. Informar los resultados en términos de la mayor dilución que sea reactiva, incluidos los resultados mínimamente reactivos de la siguiente forma:

DILUCIONES DE SUERO

	1:2	1:4	1:8	1:16
No diluido				
RM	N	N	N	N
R	R	R	N	N
R	R	R	RM	N

INFORME

**Reactivo, sin diluir
Reactivo, dilución 1:4
Reactivo, dilución 1:8**

R, Reactivo; RM, Reactividad mínima; N, No reactivo

Nota: informar los resultados como reactivo o no reactivo; no informar reactividad mínima con la prueba RPR en tarjeta.

V. Resultados

A. Interpretación

1. Los médicos deben combinar los resultados de esta prueba con la información clínica y epidemiológica. El valor pronóstico de una prueba RPR positiva aumenta si la muestra también es positiva en una prueba treponémica específica, como la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS).
2. Una prueba reactiva indica infección actual o pasada inadecuadamente tratada, o una reacción falsa positiva. Las reacciones falsas positivas por razones técnicas pueden detectarse porque cuando se repite la prueba los resultados son negativos. Las reacciones falsas positivas por razones biológicas se detectan mediante una prueba treponémica específica negativa, como la prueba FTA-ABS.
3. Una prueba negativa en ausencia de síntomas clínicos puede indicar ausencia de infección o una infección pasada tratada de forma adecuada. También puede haber reacciones negativas durante el período de incubación antes de que se manifiesten los primeros síntomas. Puede haber pruebas negativas en presencia de síntomas clínicos en los primeros estadios de la sífilis primaria, como manifestación de un fenómeno de zona en la sífilis secundaria u, ocasionalmente, en la sífilis terciaria.

PROTOCOLO 20-3

PRUEBA RÁPIDA DE REAGINA PLASMÁTICA (RPR) EN TARJETA (*cont.*)

4. Cuando se realiza una prueba RPR en pacientes con sífilis, un aumento de cuatro veces en los títulos puede indicar infección activa, reinfección o fracaso del tratamiento. Un descenso de cuatro veces en los títulos por lo general señala un tratamiento antisifilítico adecuado.
5. Todas las pruebas RPR cualitativas reactivas deben titularse hasta punto final e informarse el título de punto final. Pueden encontrarse títulos muy altos de RPR en tarjeta en pacientes con infección por el HIV. En los pacientes con linfomas pueden encontrarse títulos falsos positivos muy altos.

B. Variaciones aceptables

1. Preparar una dilución 1:16 para cuantificación adicional, utilizando 50 µL de muestra y 750 µL de solución fisiológica al 0.9%.
2. Si después de la detección sistemática parece probable que el suero por titular exceda 1:16, preparar todas las diluciones directamente en la tarjeta, utilizando suero no reactivo 1:50 como diluyente, comenzando con el círculo 6 (1:32) y continuando con el resto de la tarjeta.

VI. Fuentes de error

1. Si la temperatura del suero, de los reactivos o del ambiente en el que se realiza la prueba son menores de 23 °C, la reactividad disminuye; si es mayor de 29 °C, la reactividad aumenta.
2. Si la velocidad de la placa rotatoria es muy baja o muy alta, la mezcla inadecuada del antígeno con el suero puede dar resultados impredecibles.
3. Si la tarjeta se rota e inclina excesivamente con la mano después de sacarla de la placa rotatoria, puede haber reacciones falsas positivas.
4. Si la iluminación produce un reflejo en la tarjeta, los resultados pueden ser confusos.
5. Si el antígeno está vencido o no se ha probado su reactividad, los resultados pueden ser impredecibles.
6. Si el suero se distribuye de manera no uniforme dentro del círculo, el antígeno y el anticuerpo pueden no mezclarse adecuadamente.
7. Si se utilizan muestras de suero o plasma hemolizadas, contaminadas o recolectadas en forma inadecuada, la reacción puede quedar enmascarada.
8. Las muestras de plasma almacenadas a -20 °C durante más de una semana son inadecuadas para esta prueba.
9. Si no se utiliza una cubierta humectante para tapar las tarjetas mientras se someten a rotación, no se mantendrá la humedad adecuada y los componentes pueden secarse sobre la tarjeta, lo que producirá reacciones falsas positivas.

VII. Limitaciones del procedimiento

1. Las pruebas RPR en tarjeta no pueden utilizarse con líquido cefalorraquídeo.
2. A veces puede encontrarse un fenómeno de prozona. En estas reacciones, hay inhibición parcial o total de la reactividad en el suero sin diluir. El fenómeno de prozona puede ser tan intenso como para que un suero que en la prueba cuantitativa es fuertemente positivo, produzca sólo una reacción imprecisa en la prueba cualitativa. Todas las muestras que produzcan cualquier grado de rugosidad o reactividad en la prueba cualitativa deben probarse de nuevo con una prueba cuantitativa.
3. La prueba RPR en tarjeta puede ser reactiva en personas procedentes de zonas en las que el pian, la pinta o la sífilis no venérea sean endémicos. Como regla general, los títulos residuales de estas enfermedades son menores de 1:8.
4. En ocasiones, se observan reacciones falsas positivas por razones biológicas, en particular en drogadictos, en personas que tienen enfermedades como lupus eritematoso, mononucleosis, paludismo, lepra o neumonía viral, o en las que han sido vacunadas recientemente.
5. Los títulos de las pruebas no treponémicas de las personas que han sido tratadas en los estadios latentes o tardíos de la sífilis o que se han reinfectado no disminuyen con tanta rapidez como los de las personas tratadas precozmente durante la infección primaria. Algunos de estos individuos pueden hacerse "seropersistentes" y conservar su reactividad de por vida.

VIII. Bibliografía

- Fiumara NJ. Serologic responses to treatment of 128 patients with late latent syphilis. *Sex Transm Dis* 1979;6:243-246.
- Larson SA, Hunter EF, Kraus SJ, eds. *Manual of Tests for Syphilis*, 8ª ed. Washington DC: American Public Health Association, 1990.

PROTOCOLO 20-4

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS FLUORESCENTES (FTA-ABS)

I. Principio

La prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) es una técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (véase cap. 3). El suero del paciente, que se ha diluido 1:5 en un absorbente (extracto proveniente de cultivos de *Treponema phagadenis*, el treponema de Reiter) se coloca en una capa sobre un portaobjetos al que se ha fijado *T. pallidum* subespecie *pallidum*. Si el suero contiene anticuerpos contra *T. pallidum*, éstos cubrirán los treponemas. Cuando se agrega antiglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se unirá a los anticuerpos del paciente que se habían fijado a las espiroquetas. La reacción fluorescente se visualiza con un microscopio de fluorescencia.

II. Materiales

A. Equipo

Estufa de incubación de 35 a 37 °C.

Baño de agua regulable a 56 °C.

Dispositivo de seguridad para pipetas.

Micropipeteadores graduables de 10 a 200 µL.

Ansa bacteriológica estándar de platino, de 2 mm, calibre 26.

Papel absorbente.

Soporte para portaobjetos con cámara húmeda y toallas de papel.

Placas de coloración, de vidrio o plástico, con soporte para portaobjetos desmontable.

Portaobjetos de 2,5 × 7,5 cm, con un extremo mate, de 1 mm de espesor, con dos círculos grabados, de 1 cm de diámetro interno.

Cubreobjetos, n° 1, de 2 mm².

Tubos de ensayo (12 × 75 mm) y gradillas.

Recipientes para descartar el material y desinfectantes.

Guantes de látex descartables, anteojos de seguridad y ropa protectora.

Microscopio de fluorescencia equipado para microscopia con fluoresceína.

Agitadora; agitadora vorticial Jr. o equivalente

B. Reactivos

1. Comerciales

a. Antígeno de *T. pallidum*: una suspensión de *T. pallidum* (cepa Nichols) obtenida en tejido testicular de conejo y lavada con solución salina tamponada, para eliminar las globulinas de conejo.

b. Suero anti-IgG humana marcado con FITC.

c. Absorbente: preparado de cultivos de treponemas de Reiter no patógenos, habitualmente sin el agregado de conservantes. A menudo se venden fraccionados en cantidades de 5 mL y liofilizados, aunque también se venden en estado líquido.

d. Suero control reactivo: una mezcla de muestras de suero humano obtenidas de dadores sifilíticos que son reactivos 4+. Se utilizan para preparar sueros control 4+ y controles mínimamente reactivos 1+. El control 1+ muestra el grado mínimo de fluorescencia informado como reactivo y se utiliza como estándar de lectura.

e. Suero control inespecífico: una mezcla de sueros obtenida de individuos no sifilíticos. Sin agregado de conservantes. Este control muestra una reactividad inespecífica ≥ 2+ en una dilución 1:5 en buffer de fosfatos (PBS) y casi no se tiñe cuando se diluye 1:5 en absorbente.

f. Aceite: aceite de inmersión de baja fluorescencia, no secante, tipo A, Cargille 1248.

g. Acetona: reactivo grado ACS.

2. Preparados

a. PBS, pH 7,2.

b. Tween 80 (polisorbato 80) al 2% en PBS. Calentar los reactivos en baño María a 56 °C. Agregar a 49 mL de PBS estéril 1 mL de Tween 80, medido desde el extremo de una pipeta, lavando la pipeta con la mezcla. Controlar el pH y llevarlo a 7,2 con NaOH 1 N. Desechar si se forma un precipitado o el pH cambia.

c. Medio de montaje: agregar una parte de PBS a 9 partes de glicerina (reactivo proanálisis).

d. Agua destilada.

III. Preparación de los reactivos de la prueba

A. Antígeno de *T. pallidum*

1. Rehidratar el antígeno de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los frascos ampolla abiertos, conservados a 2 a 8 °C, son estables durante una semana.

2. Para preparar los portaobjetos, mezclar completamente la suspensión del antígeno en una agitadora durante 10 segundos. Determinar por microscopia de fondo oscuro que los treponemas estén adecuadamente dispersos antes de realizar los frotis para la prueba FTA-ABS.

3. Limpiar los portaobjetos con una gasa limpia para eliminar las panículas de polvo. Limpiar los portaobjetos por vibración sónica o frotándolos con alcohol si los treponemas no se ven con claridad después de la coloración.

PROTOCOLO 20-4

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS FLUORESCENTES (FTA-ABS) (cont.)

4. Preparar frotis muy delgados de *T. pallidum* dentro de cada círculo mediante un ansa de alambre de 2 mm. Colocar el antígeno contenido en un ansa dentro de dos círculos de 1 cm. Dejar secar al aire al menos durante 15 minutos.
5. Fijar los portaobjetos en acetona durante 10 minutos y secar al aire. No fijar más de 60 portaobjetos con 200 mL de acetona. Conservar los frotis fijados con acetona a -20°C . No descongelar y congelar nuevamente los frotis.
6. Conservar los frascos ampolla de antígeno no abiertos a 2 a 8°C . El antígeno no abierto es estable hasta la fecha de vencimiento.

B. Titulación de la anti-IgG humana

1. Rehidratar el conjugado de acuerdo con las instrucciones. Si está turbio, centrifugarlo a 500 g durante 10 minutos. Fraccionar en alícuotas pequeñas y conservar a -20°C . No congelar nuevamente el conjugado descongelado; conservarlo a 2 a 8°C .
2. Preparar diluciones 4+ y 1+ del suero reactivo de control, para determinar la dilución de trabajo del conjugado.
3. Correr el patrón control con una referencia o un conjugado conocido. Se muestra un ejemplo:

DILUCIONES DE CONJUGADO	TINCIÓN INESPECÍFICA DE CONTROL (PBS)	SUERO REACTIVO DE CONTROL (4+) (1:5 en PBS)	SUERO DE CONTROL DE LA REACCIÓN (1+)
<i>Conjugado de referencia</i>			
Dilución 1:400	—	4+	1+
<i>Conjugado nuevo</i>			
1:12,5	< 1+	4+	3+
1:25	—	4+	3+
1:50	—	4+	3+
1:100	—	4+	2+
1:200*	—	4+	1+
1:400	—	4+	< 1+
1:800	—	3+	±

* La dilución seleccionada para el título de trabajo es 1:200, una dilución al medio por debajo del punto final 4+ (1:400), con tinción 1+ con la dilución control 1+ (1:200) y ausencia de tinción inespecífica hasta tres diluciones al doble por debajo de la dilución de trabajo (1:25).

C. Adsorbente

1. Rehidratar el material liofilizado con agua destilada estéril o de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El adsorbente rehidratado puede conservarse a 2 a 8°C o a -20°C . Puede utilizarse todo el tiempo que se desee mientras la reactividad obtenida sea aceptable y el producto no esté contaminado.

D. Suero problema

1. Seguir las medidas de seguridad recomendadas para la manipulación de sueros humanos.
2. Calentar el suero problema y el suero control a 56°C durante 30 minutos, antes de realizar la prueba.
3. El día de la prueba recalentar el suero problema durante 10 minutos a 56°C .

E. Suero control

1. Rehidratar el suero de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Fraccionar en alícuotas de 0,25 mL y conservar a -20°C durante todo el tiempo en que la reactividad sea aceptable.
3. Preparar los siguientes controles para cada determinación:
 - a. Suero control reactivo (R) 4+: un suero sífilítico que muestre fluorescencia 4+ en una prueba sin absorción y fluorescencia sólo levemente reducida en la prueba absorbida. Para producir suero no absorbido, agregar 50 μL de suero control reactivo a un tubo que contenga 200 μL de PBS y mezclar bien. Para producir suero absorbido, transferir 50 μL del suero control reactivo a un tubo con 200 μL de adsorbente y mezclar bien.
 - b. Suero control mínimamente reactivo (MR). Es una dilución en PBS del suero control reactivo, que dé el mínimo grado de fluorescencia (1+) considerada reactiva.
 - c. Suero control inespecífico (NS): un suero no sífilítico que muestre fluorescencia $\geq 2+$ en la prueba no absorbida. Para producir el suero no absorbido, transferir 50 μL del suero control inespecífico a un tubo que contenga 200 μL de PBS y mezclar bien. Para producir el suero absorbido, transferir 50 μL del suero control inespecífico a un tubo con 200 μL de adsorbente y mezclar bien.
 - d. Los controles para tinción inespecífica de los conjugados consisten en un frotis de antígeno cubierto con 30 μL de PBS en lugar de suero y un frotis de antígeno cubierto con 30 μL de adsorbente en lugar de suero.

PROTOCOLO 20-4

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS FLUORESCENTES (FTA-ABS) (cont.)

F. Prueba FTA-ABS

1. Identificar los portaobjetos preparados antes con antígeno numerándolos en el extremo mate.
2. Numerar cada tubo y portaobjetos para que se correspondan con el suero problema y el suero control por utilizar.
3. Preparar diluciones del suero control reactivo (4+), mínimamente reactivo (1+) y control inespecífico en absorbente o PBS de acuerdo con las instrucciones.
4. Pipetear 200 µL de absorbente en un tubo de ensayo para cada suero problema.
5. Agregar 50 µL de suero problema calentado al tubo correspondiente y mezclar ocho veces.
6. Cubrir los frotis de antígeno que corresponda con 30 µL de las diluciones suero control reactivo (4+), mínimamente reactivo (1+) y control inespecífico.
7. Cubrir los frotis de antígeno que corresponda con 30 µL de PBS y 30 µL de absorbente para los controles a y b de tinción inespecífica. Los controles deben mostrar el siguiente patrón:

PATRÓN DE CONTROL PARA LA PRUEBA FTA-ABS

Control reactivo	a. Dilución en PBS 1:5	R4+
	b. Dilución en absorbente 1:5	R(4+ a 3+)
Control mínimamente reactivo	1+ Dilución control	R1+
Controles de suero inespecífico	a. Dilución en PBS 1:5	R(2+ a 4+)
	b. Dilución en absorbente 1:5	N - ±
Controles de tinción inespecífica	a. Antígeno, PBS, conjugado	N
	b. Antígeno, absorbente, conjugado	N

8. Cubrir los frotis de antígeno que correspondan con 30 µL de las diluciones del suero problema.
9. Evitar la evaporación colocando los portaobjetos en cámara húmeda e incubar a 35 a 37 °C durante 30 minutos.
10. Al finalizar la incubación realizar los siguientes lavados:
 - a. Colocar los portaobjetos en los soportes para tinción y lavar 5 segundos con PBS corriente.
 - b. Colocar durante 5 minutos los portaobjetos en cubetas de coloración que contengan PBS.
 - c. Agitar los portaobjetos sumergiéndolos y retirándolos del PBS al menos 30 veces.
 - d. Repetir los dos pasos anteriores con PBS nuevo.
 - e. Lavar los portaobjetos durante 5 segundos con agua destilada corriente y secar en forma suave con papel absorbente.
11. Diluir la anti-IgG humana marcada con FITC hasta su título de trabajo en PBS con 2% de Tween 80 y colocar aproximadamente 30 µL de conjugado diluido sobre cada frotis.
12. Repetir la incubación y los lavados de los portaobjetos.
13. Montar los portaobjetos de inmediato, colocando una pequeña gota de medio de montaje y un cubreobjetos sobre cada frotis.
14. Colocar los portaobjetos en una habitación oscura y leer antes de transcurridas 4 horas.
15. Controlar los frotis por microscopia de fondo oscuro, utilizando primero la lámpara de tungsteno, para verificar la presencia de treponemas en el frotis, luego leer la fluorescencia FITC (prueba).
16. Utilizando el portaobjetos de control mínimamente reactivo (1+) como estándar de lectura, registrar la intensidad de fluorescencia de los treponemas:

REGISTRO DE LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA

Lectura	Intensidad de la fluorescencia
2+ a 4+	Moderada a intensa
1+*	Equivalente al control mínimamente reactivo (1+)
± a < 1+	Tinción visible pero menor de 1+
-	Ninguna o vagamente visible pero sin fluorescencia definida
Atípica**	Variada: los treponemas parecen estar "apolillados" o tener "cuentas" de fluorescencia en toda su longitud

* Probar nuevamente todos los materiales que dan inicialmente una intensidad 1+ de fluorescencia.

** Los patrones de fluorescencia atípicos o en cuentas se describieron en pacientes con lupus y otras enfermedades autoinmunitarias.

PROTOCOLO 20-4

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS FLUORESCENTES (FTA-ABS) (cont.)

17. Informar los resultados de la siguiente forma:

SISTEMA DE INFORME PARA LA PRUEBA FTA-ABS

Lectura inicial de la prueba	Lectura de la repetición	Informe
4+		Reactivo
3+		Reactivo
2+		Reactivo
1+	> 1+	Reactivo
1+	1+	Mínimamente reactivo*
1+	< 1+	No reactivo
< 1 +		No reactivo
N		No reactivo
Fluorescencia en rosario		Fluorescencia atípica observada**

* En ausencia de signos de infección treponémica, este resultado de la prueba debe considerarse dudoso. Debe obtenerse una segunda muestra 1 a 2 semanas después de la muestra inicial y enviarla al laboratorio para realizar pruebas serológicas.

** La fluorescencia en rosario ha sido observada en pacientes con lupus eritematoso sistémico activo o con otras enfermedades autoinmunitarias. El procedimiento de absorción del DNA puede solicitarse al Treponemal Pathogenesis and Immunobiology Branch, Division of Sexually Transmitted Diseases, CDC, Atlanta, GA 30333. La solicitud debe enviarse a través del correspondiente State Health Department.

IV. Variaciones aceptables

1. Las lecturas de los portaobjetos puede demorarse más de 4 horas si los portaobjetos se protegen de la luz y se conservan a 2 a 8 °C. Para que la prueba sea válida con una lectura demorada, *todo el patrón de control debe ser claramente satisfactorio cuando se leen los portaobjetos.*
2. El conjugado que ha sido esterilizado por filtración y contiene un conservante, como la azida sódica, para evitar la contaminación bacteriana, puede mantenerse a 2 a 8 °C. Debe eliminarse por centrifugación todo precipitado o turbidez.
3. Los portaobjetos se pueden mantener de 30 minutos a 1 hora en PBS si se interrumpe la prueba. Para que los resultados sean válidos, los portaobjetos control deben reaccionar en forma adecuada cuando se lee la prueba.
4. Pueden utilizarse portaobjetos con círculos múltiples en lugar de los de dos círculos. Agregar volúmenes de sólo 10 µL a los frotis de antígeno. Tener cuidado al manipular y lavar los portaobjetos, para evitar la mezcla de sueros.
5. Con micropipetas de precisión, la dilución problema 1:5 puede prepararse pipeteando 25 µL de suero en 100 µL de diluyente.

V. Fuentes de error

1. Si no se observan estrictamente los procedimientos de evaluación de los reactivos, los resultados no serán fiables.
2. Si se utilizan portaobjetos con círculos múltiples y el suero de uno de los círculos se derrama sobre otro, el suero de una persona sin sífilis podrá parecer reactivo.
3. Si los portaobjetos no están limpios, la prueba puede ser difícil de leer y los resultados no serán fiables.
4. Si se utiliza una prueba FTA-ABS como procedimiento de cribado, en lugar de para confirmar los resultados reactivos de una prueba no treponémica, o como una prueba diagnóstica específica en pacientes con síntomas o signos de sífilis tardía, el valor pronóstico positivo de la prueba FTA-ABS se reduce.
5. Si el microscopio no está bien centrado y no se obtiene el patrón control, los resultados de la prueba no son válidos.
6. Si los reactivos se contaminan con bacterias, el título de anticuerpos puede disminuir y los resultados no serán válidos.
7. Si no se respetan las instrucciones de conservación de los reactivos, no se obtendrán resultados control satisfactorios.
8. Si los portaobjetos con antígeno congelados se descongelan y congelan nuevamente, los treponemas serán difíciles de visualizar y los resultados no serán satisfactorios.
9. Si un suero está contaminado con bacterias o hemolizado en exceso, los resultados de la prueba pueden no ser válidos.
10. Si los portaobjetos no se secan y conservan de acuerdo con el procedimiento o si se coloca demasiado volumen sobre el portaobjetos, el antígeno puede desaparecer. El contenido de antígeno de un ansa es suficiente para dos círculos de 1 cm.
11. Si se fijan demasiados frotis en un volumen dado de acetona, puede aumentar la tinción de fondo.
12. Si el antígeno rehidratado no se adhiere al portaobjetos, pueden observarse muy pocos treponemas.

PROTOCOLO 20-4

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS FLUORESCENTES (FTA-ABS) (cont.)

13. Si se forma un precipitado en la preparación del conjugado, puede observarse una tinción inespecífica.
14. Si no se reconoce el patrón de coloración atípico en cuentas de collar, es posible que esas muestras se informen erróneamente como reactivas.
15. Si los portaobjetos para FTA-ABS se leen en un microscopio equipado con luz incidente, los no reactivos deben observarse en campo oscuro para verificar la presencia de treponemas.

VI. Limitaciones del procedimiento

1. La prueba FTA-ABS no es apta para el uso de rutina o como procedimiento de cribado. Su mayor valor reside en distinguir los resultados verdaderamente positivos de las pruebas no treponémicas de los resultados falsos positivos y para establecer el diagnóstico de sífilis latente o tardía.
2. Se originan problemas cuando la FTA-ABS se utiliza como procedimiento de cribado ya que cerca del 1% de la población general da resultados falsos positivos.
3. A pesar de que los resultados falsos positivos en la prueba FTA-ABS son a menudo transitorios y la causa se desconoce, existe una asociación definida entre esos resultados y el diagnóstico de las variedades discoide, sistémico e inducido por fármacos del lupus eritematoso.
4. En los pacientes ancianos pueden darse resultados FTA-ABS reactivos inexplicables.

VII. Bibliografía

Larson SA, Hunter EF, Kraus SJ, eds. Manual of Tests for Syphilis. 8ª ed. Washington DC: American Public Health Association, 1990.

PROTOCOLO 22-1

TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE HECES PARA EL AISLAMIENTO DE PARÁSITOS INTESITNALES

I. Principio

La cantidad de parásitos existente en muestras de heces suele ser muy escasa como para detectarla por microscopia en preparados directos en fresco o en frotis teñidos. Por lo tanto, deben emplearse procedimientos de concentración para poder detectarlos. Las dos técnicas utilizadas con mayor frecuencia son la de sedimentación y la de flotación.

A. Técnicas de sedimentación

Las técnicas de sedimentación son las efectuadas con mayor frecuencia en los laboratorios de diagnóstico microbiológico generales porque son las más fáciles de realizar y las menos propensas a los errores técnicos. La sedimentación se basa en que la densidad de los quistes de protozoos y de los huevos de helmintos es mayor que la del agua. Su tendencia natural a sedimentar en soluciones acuosas puede ser acelerada por centrifugación a baja velocidad. Puede agregarse a la suspensión final una mezcla de formalina acetato de etilo u otros conservantes para evitar el problema de la posible inflamabilidad del éter, con la finalidad de eliminar los detritos fecales y fijar las formas parasitarias que pudieran estar presentes.

B. Técnicas de flotación

La principal ventaja de las técnicas de flotación es que los preparados microscópicos tienen un fondo más limpio. La técnica se basa en la propiedad de muchos quistes de protozoos y huevos de helmintos de flotar en la superficie de una solución de alta densidad. La utilizada con mayor frecuencia es una solución de sulfato de cinc con densidad de 1,180. Los parásitos que flotan en la superficie pueden aislarse barriendo la capa superior de la solución con un ansa. Las técnicas de flotación tienen la desventaja de que algunos huevos de parásitos no flotan y en el caso de que sí lo hagan, las paredes de los huevos y los quistes a menudo se colapsan, lo que dificulta su identificación.

II. Reactivos

1. Procedimiento de sedimentación

Acetato de etilo

Formalina amortiguada al 10%

NaCl al 0,85%

Yodo de D'Antoni o de Lugol

2. Procedimiento de flotación

Formalina amortiguada al 10%

NaCl al 0,85%

Sulfato de cinc (solución acuosa al 33%)

Sulfato de cinc 330 g

Agua destilada 670 mL

PROTOCOLO 22-1

TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE HECES PARA EL AISLAMIENTO DE PARÁSITOS INTESTINALES (*cont.*)

Disolver el sulfato de cinc en agua destilada en un frasco adecuado con una agitadora magnética. Llevar la densidad a 1,20 agregando más sulfato de cinc o agua destilada, según sea necesario. Almacenar en frasco con tapón de vidrio. La duración es de 2 años.

III. Procedimiento

A. Técnica de sedimentación

1. Usar guantes para manipular muestras fecales.
2. En un recipiente adecuado, mezclar por completo una porción de muestra de heces de aproximadamente el tamaño de una nuez con 10 mL de solución fisiológica. Mezclar con cuidado.
3. Filtrar la emulsión a través de una gasa fina dentro de un tubo cónico de centrífuga.
4. Centrifugar con una fuerza de centrifugación relativa (FCR) de 600 g (aproximadamente 2 000 rpm) durante no menos de 10 minutos. La suspensión debe producir alrededor de 0,75 mL de sedimento para las muestras frescas y 0,5 mL para heces formalizadas.
5. Volcar el sobrenadante y lavar el sedimento con 10 mL de solución fisiológica. Centrifugar otra vez y repetir los lavados hasta que el sobrenadante esté limpio.
6. Después del último lavado, descartar el sobrenadante y agregar al sedimento 10 mL de formalina al 10%. Mezclar y dejar en reposo durante 5 minutos para fijar los elementos.
7. Agregar 1 a 2 mL de acetato de etilo. Tapar el tubo y agitar en forma vigorosa.
8. Centrifugar con una FCR 450 g (aproximadamente 1 500 rpm) durante 10 minutos. Se deben obtener cuatro capas: 1) una capa superior de acetato de etilo, 2) un tapón de detritos, 3) una capa de formalina y 4) sedimento.
9. Separar el tapón de detritos de las paredes del tubo, haciendo movimientos circulares con un palillo de madera. Descartar con cuidado las tres capas superiores.
10. Con una pipeta, mezclar el sedimento con la pequeña cantidad de líquido remanente y transferir una gota de la suspensión a una gota de solución fisiológica y a una de yodo colocadas sobre un portaobjetos: cubrir con un cubreobjetos y observar con el microscopio en busca de formas parasitarias. Examinar en forma sistemática toda la superficie de cada cubreobjetos con el objetivo de 10x; si no se observa nada, examinar la mitad de cada cubreobjetos con el objetivo de 40x.

B. Técnica de flotación

1. Agregar una parte de heces (cantidad suficiente para producir alrededor 0.75 mL de sedimento) a 3 a 5 partes de formalina al 10%. Mezclar por completo y dejar que se fije durante 30 minutos.
2. Filtrar la suspensión bien mezclada de heces y formalina a través de una capa de gasa en un tubo de fondo redondo (100 x 26 mm), hasta una altura de 20 mm del borde.
3. Centrifugar la suspensión a una FCR de 600 g (aproximadamente 2 000 rpm) durante 3 a 5 minutos. Dejar que la centrífuga se detenga sin aplicar el freno.
4. Descartar el sobrenadante y secar la última gota sobre un trozo de papel absorbente limpio.
5. Agregar solución de $ZnSO_4$ hasta una altura de 25 mm del borde del tubo.
6. Con dos varillas de madera resuspender el sedimento compactado hasta que no queden partículas grandes.
7. De inmediato, centrifugar la suspensión a una FCR de 450 g (alrededor de 1 500 rpm) durante 1.5 minutos. Nuevamente, dejar detener la centrífuga sin aplicar el freno.
8. Llevar con cuidado el tubo a una gradilla que lo mantenga derecho en posición vertical. Dejar en reposo durante 5 a 10 minutos.
9. Con un ansa de 7 mm de diámetro, doblada en ángulo recto respecto del mango, transferir el contenido de dos ansas de la película superficial a una gota de solución salina al 0.85% y a una gota de reactivo de yodo de D'Antoni o de Lugol colocadas sobre un portaobjetos, y lo suficientemente separadas entre sí como para que los líquidos no se mezclen cuando se coloquen los cubreobjetos. Mezclar cada suspensión con un palillo de madera.
10. Colocar sobre cada preparado un cubreobjetos limpio, número 1. Examinar con el microscopio antes de transcurrida 1 hora. Examinar sistemáticamente toda la superficie de cada cubreobjetos con el objetivo 10x; si no se ve nada, examinar alrededor de la mitad de cada uno con el objetivo 40x.

IV. Control de calidad

1. Controlar las soluciones cada vez que se usen para asegurarse de que están limpias y no presentan contaminación bacteriana.
2. Procesar muestras positivas conocidas durante el procedimiento para verificar el aislamiento de microorganismos. Esto debe hacerse por lo menos dos veces por año.

V. Resultados

Informar los quistes y trofozoítos de protozoos, y los huevos o larvas de helmintos como sea adecuado. La semicuantificación de los resultados puede ser de utilidad en algunos casos. Puede ser necesario hacer un frotis con una tinción permanente para confirmar la identificación de especie de formas parasitarias vistas en preparados del sedimento u obtenidos por flotación.

PROTOCOLO 22-1

TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE HECES PARA EL AISLAMIENTO DE PARÁSITOS INTESTINALES (cont.)

VI. Notas acerca del procedimiento

A. Sedimentación

1. El procedimiento de sedimentación también puede usarse para procesar muestras fijadas en alcohol polivinílico (PVA). Modificar el procedimiento llenando la mitad de un tubo con la mezcla heces-PVA y agregar NaCl al 0.85% casi hasta el borde del tubo. Luego, filtrar la mezcla a través de gasa húmeda en un tubo de centrifuga de 15 mL y seguir el resto del procedimiento estándar.
2. Si se usa acetato de etilo, enjuagar las paredes internas del tubo con un hisopo de algodón después de eliminar el tapón de detritos y decantar el exceso de líquido. El exceso de acetato de etilo en el sedimento formará burbujas en el momento de preparar los frotis, que pueden ocultar las formas parasitarias que se están tratando de observar.
3. Puede haber errores de interpretación si se usa mucha cantidad, o poca, para el procedimiento de sedimentación. Debe respetarse la fórmula recomendada de 0.75 mL de sedimento para las muestras en fresco y de 0.5 mL para las heces en formol, como se describe en el paso 4 del procedimiento.
4. Dejar que la centrifuga alcance su velocidad máxima antes de empezar a contar el tiempo. Si el tiempo de centrifugación es demasiado corto, ciertas formas parasitarias pequeñas, como los ooquistes de las especies de *Cryptosporidium*, pueden no sedimentar.

B. Flotación

1. Las técnicas de flotación con sulfato de cinc tienen la ventaja general de que se elimina el fondo de detritos fecales, lo que pone en evidencia cualquier quiste o huevo que pueda estar presente.
2. Los preparados de flotación deben realizarse no más de 12 horas después de su preparación porque los quistes y los huevos comienzan a sedimentar de nuevo tras ese lapso.
3. Cuando se prepara el frotis, no usar el ansa como "cuchara". Sólo debe tocarse la superficie más externa de la mezcla de flotación; asegurarse de que el ansa no pasa debajo de la película de flotación.
4. Un procedimiento alternativo para preparar el frotis es agregar una pequeña cantidad de sulfato de cinc al tubo después de la centrifugación final para formar un menisco ligeramente convexo. Puede colocarse suavemente un cubreobjetos sobre la superficie del menisco y dejarlo sin mover durante 5 minutos. Sacar con cuidado el cubreobjetos y colocarlo sobre un portaobjetos para su examen.
5. Cuando se calibra la densidad del sulfato de cinc, hacer girar el higrómetro suavemente sin que toque las paredes del tubo. Leer el fondo del menisco y hacer la corrección correspondiente a la temperatura (agregar o restar 0.001 por cada grado por encima o por debajo de la temperatura de calibración del higrómetro, que suele ser 20 °C).

VII. Limitación del procedimiento

Ciertos parásitos, como *Giardia lamblia*, huevos de uncinarias y huevos de *Trichuris* pueden no concentrarse bien de muestras conservadas en PVA. Los ooquistes de *Isospora belli* no suelen aparecer en los concentrados. Por lo tanto, se recomienda enfáticamente el examen de preparados con tinciones permanentes.

Los quistes de protozoos y los huevos de helmintos con cáscaras delgadas pueden colapsarse por la exposición prolongada al medio de alta densidad de sulfato de cinc. Por lo tanto, los preparados deben hacerse lo más rápidamente posible después de que se detiene la centrifuga. Los huevos operculados pueden estallar, lo que hace que sedimenten. Por consiguiente, debe examinarse tanto la película superficial como el sedimento para asegurarse de no pasar por alto ninguna forma parasitaria.

Tanto con la técnica de sedimentación como con la de flotación, la identificación de especie puede no ser posible en todos los casos, según la claridad de las formas observadas. Casi siempre se necesitan frotis teñidos en forma permanente para hacer la identificación final, en especial cuando se intenta confirmar un diagnóstico de quistes de *Entamoeba histolytica*.

V. Bibliografía

- Bartlett MS, Harper K, Smith N, et al. Comparative evaluation of a modified zinc sulfate flotation technique. *J Clin Microbiol* 1977;7:524-528.
- García L. Examination of Fecal Specimens. En: *Diagnostic Medical Parasitology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001.
- Smith JW, Gutiérrez Y. Medical parasitology. En: Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 18ª ed. Filadelfia: Saunders, 1992.
- Young KH, Bullock SL, Melvin DM, et al. Ethyl acetate as substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol* 1979;10:852-853.

PROTOCOLO 22-2

TÉCNICA DE TINCIÓN TRICRÓMICA PARA FROTIS DE HECES

I. Principio

Como el índice de refracción de los quistes de protozoos y de algunos huevos de helmintos es cercano al del agua, se necesitan técnicas de tinción para estudiar los detalles de sus estructuras internas. Las tinciones permanentes también aumentan la detección de *Entamoeba histolytica* y de *Giardia lamblia*, dos de los protozoos encontrados con mayor frecuencia y más importantes. La técnica tricrómica de Wheatley, una modificación de la técnica original de Gomori, que utiliza cromótropo 2R y verde brillante SF como agentes colorantes primarios, es la coloración usada en la mayoría de los laboratorios de parasitología clínica. Los frotis de heces frescas deben fijarse; las muestras conservadas en alcohol polivinílico (PVA) ya están fijadas y no necesitan tratamiento adicional.

II. Reactivos

Cromótropo 2R	0,6 g
Verde brillante SF	0,3 g
Ácido fosfotúngstico	0,7 g
Ácido acético (glacial)	1,0 mL
Agua destilada	100 mL

Agregar 1,0 mL de ácido acético glacial a los componentes secos. Dejar reposar la mezcla durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente y luego agregar 100 mL de agua destilada. El colorante debe tener color púrpura. Si se almacena adecuadamente en frascos de vidrio o de plástico a temperatura ambiente, el vencimiento es a los 2 años.

Solución de alcohol yodado

Etanol al 70% más yodo.

Agregar a alcohol al 70% la suficiente cantidad de cristales de yodo como para hacer una solución madre oscura, concentrada. En el momento de usar, diluir la cantidad deseada de solución madre con alcohol al 70%, hasta obtener una solución de trabajo color vino de Oporto. La concentración exacta no es crítica.

III. Control de calidad

1. Se recomienda que se tiñan varios frotis de material que contenga microorganismos parasitarios de propiedades tintoriales conocidas, en paralelo con cada frotis problema. Si la tinción es de mala calidad, los frotis pueden ser muy gruesos o estar mal fijados, o tal vez no se haya eliminado el HgCl_2 residual debido a la utilización de una mezcla de alcohol yodado demasiado débil. Los frotis fijados adecuadamente producen un citoplasma de color verde azulado en los trofozoítos, con un leve tono violáceo. Los núcleos y las inclusiones son rojos, con tonos violáceos. Los preparados turbios pueden ser el resultado de una deshidratación incompleta, por no haber reemplazado las soluciones de alcoholes, que pueden haberse contaminado con agua. La calidad de la tinción puede mejorarse escurriendo los portaobjetos entre los cambios de un reactivo a otro.

IV. Procedimiento

1. Usar guantes cuando se manipulan muestras de heces.
2. Preparar dos frotis sobre portaobjetos de una pequeña porción de la muestra fresca de heces, usando palillos o un pincel.
3. Sumergir de inmediato los frotis en la solución fijadora de Schaudinn y dejar fijar durante por lo menos 30 minutos. Es preferible la fijación hasta el día siguiente.
4. Si la muestra es líquida, mezclar varias gotas de heces con tres o cuatro gotas de PVA sobre un portaobjetos y dejar secar varias horas en estufa de incubación a 37 °C.
5. Si la muestra se encuentra en PVA, colocar una porción de la mezcla sobre un trozo de papel absorbente para eliminar el PVA. Preparar frotis del material que queda en el papel como se describió antes.

V. Procedimiento de tinción

1. Después de fijar y secar adecuadamente los frotis, colocar los portaobjetos en alcohol etílico al 70% durante 3 minutos.
2. Colocar en solución de alcohol yodado de trabajo durante 2 a 5 minutos.
3. Lavar con dos cambios de alcohol etílico al 70%, uno de 5 minutos y el otro de 2 a 5 minutos.
4. Colocar en la solución colorante tricrómica durante 10 minutos.
5. Colocar en alcohol etílico al 90% acidificado durante 5 segundos.
6. Sumergir y sacar los portaobjetos varias veces en alcohol etílico al 100%.
7. Hacer dos cambios de alcohol etílico al 100%.
8. Eliminar el alcohol con dos cambios de xileno o tolueno, de 2 a 5 minutos cada uno.
9. Colocar medio de montaje y cubrir con un cubreobjetos número 1. Dejar secar toda la noche.
10. Examinar con objetivo de inmersión en aceite en busca de formas parasitarias.

PROTOCOLO 22-2

TÉCNICA DE TINCIÓN TRICRÓMICA PARA FROTIS DE HECES (*cont.*)

VI. Resultados

El citoplasma de los quistes y trofozoítos bien fijados y teñidos es azul verdoso, con manchas púrpura. La cromatina nuclear, los cuerpos cromatoides y los eritrocitos fagocitados aparecen rojos o rojo púrpura. El fondo es verde.

VII. Notas acerca del procedimiento

1. Si las muestras no están fijadas de manera adecuada, los protozoos pueden verse de un color rojo sucio.
2. La eliminación incompleta del cloruro mercurico (fijador de Schaudinn) puede producir el depósito de gránulos muy refringentes que pueden interferir en la detección de formas parasitarias. Hay que asegurarse de cambiar la solución de alcohol etílico al 70%-yodo a intervalos regulares para que esto no suceda.
3. Los frotis que tienen demasiado color verde pueden indicar una eliminación inadecuada del yodo por el alcohol al 70%. La prolongación del tiempo de los lavados con etanol al 70% y el cambio frecuente de la solución reducirá este problema.

VIII. Bibliografía

García L. Examination of Fecal Specimens. En: Diagnostic Medical Parasitology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001:759-764.

Gomori G. A rapid one-step trichrome stain. Am J Clin Pathol 1950;20:661-663.

Wheatley W. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. Am J Clin Pathol 1951;21:990-991.

PROTOCOLO 22-3

PREPARACIÓN DE FROTIS DE SANGRE DE GOTA FINA Y DE GOTA GRUESA

Preparación de una película delgada de sangre (gota fina)

I. Principio

El frotis de sangre de gota fina, preparado en forma similar a la que se usa para hacer fórmulas leucocitarias, permite la evaluación óptima de la morfología de cualquier forma parasitaria que pueda haber.

II. Muestra

El frotis de sangre puede prepararse de sangre fresca obtenida por punción digital o de una muestra con EDTA como anticoagulante obtenida por punción venosa.

III. Materiales

A. Equipo: ninguno.

B. Insumos

1. Portaobjetos de 25 × 75 mm, lavados con alcohol.
2. Marcador para vidrio.
3. Elementos para extracción de sangre.

C. Reactivos

1. Metanol absoluto para la coloración de Giemsa.

IV. Control de calidad

A. A simple vista, el frotis debe tener un aspecto uniforme, sin ondulaciones, suciedad ni rayas, con adelgazamiento gradual hasta formar un extremo redondeado, esfumado.

V. Procedimiento: frotis de gota fina

1. Sangre de punción digital:

Punzar la piel del costado del dedo con una lanceta afilada y eliminar con cuidado por absorción la primera gota de sangre. A continuación, tocar con un portaobjetos limpio la siguiente gota de sangre, aproximadamente a 1 cm de uno de sus extremos. Invertir el portaobjetos para que la sangre quede hacia arriba y colocar sobre una superficie horizontal.

2. Muestra obtenida por punción venosa:

Colocar un portaobjetos limpio sobre una superficie horizontal. Colocar con la punta de la aguja una pequeña gota de sangre sobre la superficie del portaobjetos, aproximadamente a 1 cm de uno de los extremos.

3. Con otro portaobjetos, colocado en un ángulo de 40° con respecto al portaobjetos donde está la gota de sangre, tocar la gota, esperar un momento hasta que la sangre se extienda hasta ambos bordes del portaobjetos superior y luego hacerlo avanzar con un movimiento continuo y rápido hasta el borde opuesto del portaobjetos inferior. El resultado es una película delgada, en forma de pluma, que se hace progresivamente más delgada.

PROTOCOLO 22-3

PREPARACIÓN DE FROTIS DE SANGRE DE GOTA FINA Y DE GOTA GRUESA (cont.)

4. Rotular el frotis y dejarlo secar al aire alrededor de 10 minutos.
5. Teñir el frotis con Giemsa o con Wright. Si se usa la coloración de Giemsa, primero debe fijarse el frotis con alcohol absoluto.
6. Notas acerca del procedimiento
 - a. Usar un lápiz de diamante para rotular el frotis.
 - b. Asegurarse de que los frotis están protegidos del polvo durante el secado.
7. Limitaciones del procedimiento
 - a. Las formas parasitarias pueden pasarse por alto en las infecciones leves. En esos casos, debe examinarse una gota gruesa.
 - b. Los frotis de sangre con anticoagulante deben prepararse antes de transcurrida una hora de la punción venosa. La morfología de las formas parasitarias y de los eritrocitos comienza a hacerse atípica después de ese lapso, por la acción directa del anticoagulante.

Preparación de la gota gruesa

I. Principio

La gota gruesa representa una muestra de sangre relativamente grande, que proporciona más oportunidades de aislar formas parasitarias en las infecciones leves. Los eritrocitos se lisan, lo que facilita la detección de formas parasitarias al hacer más transparente el fondo del preparado.

II. Muestra

El frotis de sangre puede prepararse de sangre fresca obtenida por punción digital o de una muestra con EDTA como anticoagulante obtenida por punción venosa. Pueden usarse muestras de sangre anticoaguladas con heparina o citrato de sodio si se sospecha la presencia de tripomastigotas o de microfilarias.

III. Materiales

A. Equipo: ninguno.

B. Insumos

1. Portaobjetos de 25 × 75 mm, lavados con alcohol.
2. Marcador para vidrio.
3. Elementos para extracción de sangre.
4. Diario.
5. Palillos de madera.

C. Reactivos

1. Alcohol metílico absoluto para la tinción de Giemsa.

IV. Control de calidad

- A. A simple vista, la gota gruesa debe tener el aspecto de una mancha redonda u ovalada de alrededor de 2 cm de diámetro. Debe tener el espesor suficiente como para que el texto del diario sea apenas visible a través de la gota, en estado líquido o ya seca.
- B. La distribución de la sangre debe ser pareja, sin crestas, suciedad ni rayas.

V. Procedimiento

1. Sangre de punción digital:

Punzar la piel del costado del dedo con una lanceta afilada y eliminar con cuidado por absorción la primera gota de sangre. A continuación, tocar con la parte media de un portaobjetos limpio una gota grande de sangre. Sin dejar de hacer contacto con la sangre, hacer girar el portaobjetos sobre el dedo para formar un círculo de un tamaño aproximado al de una moneda de 5 centavos de dólar. Retirar el portaobjetos y colocarlo sobre una superficie horizontal. El espesor debe ser el suficiente como para que el texto del diario sea apenas visible a través del portaobjetos. Si es demasiado grueso, distribuirlo en un círculo más grande con un palillo de madera hasta obtener el espesor correcto. Si es demasiado delgado, debe prepararse otro portaobjetos.

2. Muestra de punción venosa:

Poner un portaobjetos limpio sobre una superficie horizontal. Colocar con la punta de la aguja una gota grande de sangre sobre el portaobjetos.

3. Distribuir la sangre con la punta de un palillo de madera formando un círculo de un tamaño aproximado al de una moneda de 5 centavos de dólar, hasta lograr un espesor a través del cual sea apenas visible el texto de un diario.

4. Rotular el frotis y dejarlo secar al aire durante varias horas o durante toda la noche.

5. Teñir el frotis con Giemsa o Wright. Si se usa la tinción de Giemsa, no deben pasar más de 3 días de la preparación de la gota gruesa; si se usa Wright, lisar los eritrocitos por inmersión del preparado en agua amortiguada (pH 7,2) durante 10 minutos. Luego colocar el portaobjetos en posición vertical para dejarlo secar por goteo. No fijar la gota gruesa.

6. Notas acerca del procedimiento:

- a. Usar un lápiz de diamante para rotular el frotis.
- b. Asegurarse de que los frotis estén protegidos del polvo durante el secado.

PROTOCOLO 22-3

PREPARACIÓN DE FROTIS DE SANGRE DE GOTA FINA Y DE GOTA GRUESA (*cont.*)

7. Limitaciones del procedimiento

- La identificación de parásitos del paludismo puede ser difícil o imposible, incluso por observadores experimentados.
- Siempre debe examinarse un frotis de gota fina si se requiere una identificación definitiva basada en la morfología.
- Los frotis de sangre anticoagulada deben prepararse antes de transcurrida una hora de la punción venosa. La morfología de las formas parasitarias y de los eritrocitos comienza a hacerse atípica después de ese lapso, por la acción directa del anticoagulante.

VI. Bibliografía

- García L. Examination of Fecal Specimens. En: Diagnostic Medical Parasitology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001:759-764.
- García L. Parasitology. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 22-4

CALIBRACIÓN DEL OCULAR MICROMÉTRICO

I. Principio

Los oculares micrométricos están grabados con una escala fija, que habitualmente consta de 50 líneas paralelas. Según el aumento del juego de objetivos utilizados en un microscopio compuesto, cada división del micrómetro representa medidas diferentes. Por lo tanto, para cada juego de oculares y objetivos que se utilice, la escala del ocular se debe calibrar utilizando un micrómetro de platina grabado con una escala (las divisiones habituales son de 0.1 mm). Es importante recordar que la calibración de un juego determinado de oculares y objetivos no puede utilizarse con los componentes correspondientes de otro microscopio.

II. Muestra: no corresponde.

III. Materiales

A. Equipo

- Microscopio binocular con objetivos 10x, 40x y 100x. Pueden usarse objetivos con otros aumentos si es necesario.
- Los oculares deben ser 10x. Puede usarse un solo ocular para calibrar todos los microscopios del laboratorio.

B. Insumos

- Ocular micrométrico con escala lineal con divisiones cada 50 U. Se consiguen en varias empresas.
- Micrómetro de platina con divisiones de 0,1 y 0.01 mm.
- Aceite de inmersión.
- Papel para limpiar lentes.

C. Reactivos: no corresponde.

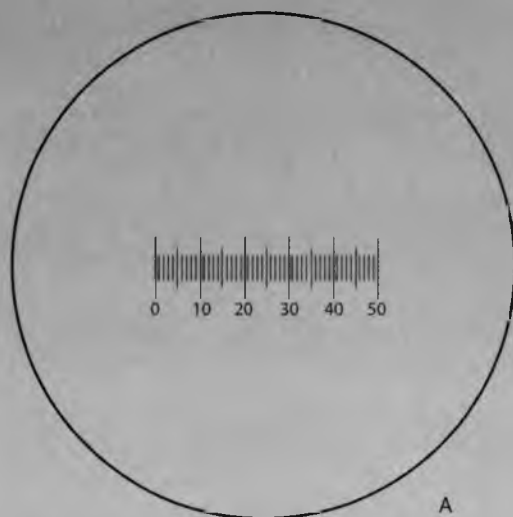
IV. Control de calidad

- Todos los microscopios usados para exámenes parasitológicos deben calibrarse nuevamente una vez por año, como mínimo.
- El diámetro de los eritrocitos puede usarse para controlar las calibraciones con diferentes aumentos.
- Pueden usarse partículas de látex o de poliestireno de diámetro estandarizado para controlar los cálculos y las mediciones. Se recomiendan las partículas de diámetros de 10 y 90 μm . Se consiguen en varias compañías de elementos de laboratorio.

V. Procedimiento

- Retirar el ocular del microscopio que se va a utilizar. Si se usa un microscopio binocular, lo habitual es retirar el ocular 10x derecho.
- Desenroscar la lente más próxima al ojo (lente superior) del ocular e insertar el micrómetro de tal forma que descansa sobre el diafragma que se encuentra en el interior del ocular. Colocar el micrómetro con el lado grabado hacia abajo. El micrómetro se manipula con papel para lentes a fin de evitar que se adhiera suciedad a su superficie.
- Colocar otra vez el ocular en su sitio. Cuando se mira a través del ocular, la escala micrométrica aparece como una serie de divisiones limitadas por líneas, como se muestra en A.

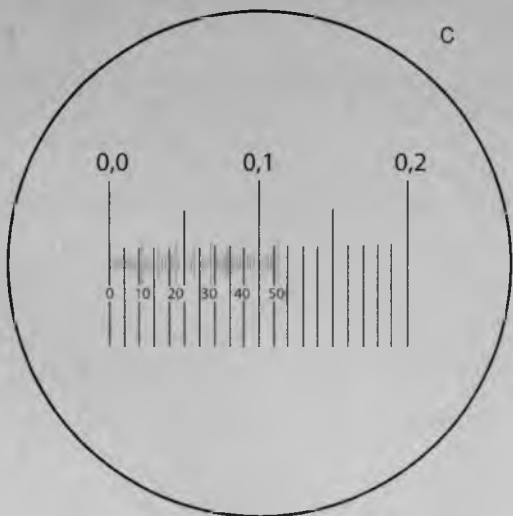
PROTOCOLO 22-4

CALIBRACIÓN DEL OCULAR MICROMÉTRICO (*cont.*)

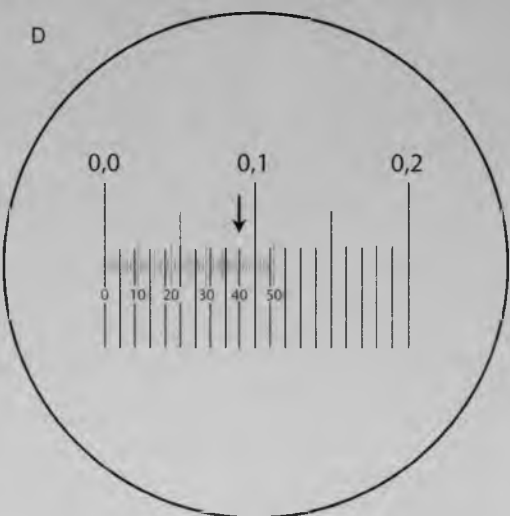
A



B



C



D

4. Colocar el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio por calibrar. Enfocar la escala micrométrica de platina, que aparece como una serie de líneas separadas por espacios de 0,1 y 0,01 mm, como se muestra en la imagen microscópica simulada en **B**.
5. Regular el micrómetro de la platina de tal manera que la línea del 0 del ocular micrométrico coincida exactamente con la línea del 0,0 de la escala micrométrica de la platina. Cuando se observa con gran aumento (450×), la superposición de ambas escalas aparece como se muestra en la imagen microscópica simulada en **C**.
6. Sin realizar más maniobras, mirar a lo largo de ambas escalas para encontrar el primer par de líneas que coincidan exactamente. En **D** (una imagen simulada con gran aumento, 450×), las líneas coincidentes se encuentran en la marca 40 de la escala ocular y en la marca de 0,09 mm de la escala micrométrica de platina (*flecha*).
7. El objeto de la calibración es determinar el ancho en micrones de cada división de la escala ocular, cuando se calibra en comparación con la escala micrométrica de platina. Hacer la calibración como sigue:
 - a. Como se ilustra en **D**, 40 unidades de la escala ocular equivalen a 0,09 mm de la escala micrométrica de platina.
 - b. Por lo tanto, cada división ocular equivale a $0,09 \text{ mm}/40$ o sea $0,00225 \text{ mm}$. Debido a que cada milímetro son $1\ 000 \mu\text{m}$, cada división del micrómetro ocular, para la calibración ilustrada en **D**, es igual a $0,00225 \times 1\ 000$ o sea, $2,25 \mu\text{m}$.

PROTOCOLO 22-4

PROTOCOLO 22-4 CALIBRACIÓN DEL OCULAR MICROMÉTRICO (cont.)

VI. Resultados

Así, de acuerdo con el procedimiento descrito, si un objeto observado con el microscopio ocupa 10 divisiones de la escala ocular, su medida será 2.25×10 o sea 22,5 μm . Este mismo cálculo se puede utilizar para otros aumentos. Una vez medido el número de líneas de ocular correspondientes al ancho y largo del microorganismo, según la lente del objetivo que se use, puede aplicarse el factor de multiplicación en micrones del ocular al número de líneas del ocular que abarca el ancho y la longitud del microorganismo que se está observando. Pueden compararse estas mediciones con los resultados publicados en los libros de texto para hacer una identificación final.

VII. Notas acerca del procedimiento

1. Como regla general, el factor del objetivo seco de gran aumento (40 $\times$) debe ser aproximadamente 2.5 veces el factor obtenido con el objetivo de inmersión (100 $\times$). En forma similar, el factor del objetivo de bajo aumento (10 $\times$) debe ser de alrededor de 10 veces el del objetivo de inmersión en aceite.
2. Los factores de multiplicación de cada objetivo deben consignarse en un cartel fijado a la base de cada microscopio que se use para exámenes parasitológicos.

VIII. Bibliografía

García L. Examination of Fecal Specimens. En: Diagnostic Medical Parasitology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001:759-764.

García L. Parasitology. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 22-5

PREPARADOS CON CINTA ADHESIVA DE CELULOSA PARA EXAMEN DE OXIUROS

I. Principio

Los huevos eliminados por las hembras adultas de *Enterobius vermicularis* se depositan en la piel perianal durante los periodos de migración extraintestinal. Estos huevos se adhieren a la superficie engomada de la cinta adhesiva. Cuando se pega la cinta a un portaobjetos de vidrio, el preparado puede examinarse con el microscopio.

II. Muestra

La muestra se obtiene de la piel perianal. La muestra óptima es la que se obtiene a la mañana temprano, antes de bañarse o de ir al baño. Deben obtenerse hasta 6 muestras matutinas en días sucesivos antes de considerar que el resultado es negativo.

III. Materiales

A. Equipo

1. Microscopio binocular con objetivos 10 $\times$, 40 $\times$ y 100 $\times$. Pueden usarse otros aumentos según sea necesario.
2. Los oculares deben ser 10 $\times$. Puede usarse un solo ocular para calibrar todos los microscopios del laboratorio.

B. Insumos

1. Cinta adhesiva de celulosa.
2. Bajalenguas.
3. Portaobjetos de vidrio de 25 $\times$ 75 mm.

C. Reactivos

1. Xileno o similar.

IV. Control de calidad

1. Todos los microscopios usados para parasitología deben calibrarse una vez por año como mínimo.
2. Puede ser de utilidad disponer de un libro de texto o atlas con microfotografías o ilustraciones de huevos de *E. vermicularis*, para confirmar los resultados.

V. Procedimiento

1. Hacer el preparado pegando un trozo de cinta adhesiva con la goma hacia abajo sobre un portaobjetos, aproximadamente a 1,5 cm de uno de los extremos. Plegar la cinta alrededor del borde y a todo lo largo del extremo opuesto y cortarla a nivel del extremo opuesto. Pegar un trozo de papel bajo este último extremo para que sirva como asa para despegar la cinta.

PROTOCOLO 22-5

PREPARADOS CON CINTA ADHESIVA DE CELULOSA PARA EXAMEN DE OXIUROS (cont.)

2. Para obtener la muestra de la piel perianal, tomar el trozo de papel y despegar la cinta del portaobjetos. Colocar el portaobjetos sobre un bajalenguas de tal forma que la cinta quede enrollada alrededor del extremo del bajalenguas con la superficie engomada hacia arriba en una extensión de alrededor de 2,5 cm. El bajalenguas se usa a continuación como soporte para presionar el lado engomado de la cinta en varias zonas de la piel perianal.
3. Una vez obtenida la muestra, pegar la cinta con el lado engomado hacia abajo sobre el portaobjetos. Etiquetar el portaobjetos con el nombre del paciente y la fecha de obtención.
4. Examinar el portaobjetos con el objetivo de bajo aumento (10×) del microscopio. Los huevos pueden hacerse más visibles despegando la cinta del portaobjetos, agregando una gota de xileno o tolueno y pegando nuevamente la cinta.

VI. Resultados

Los huevos de *E. vermicularis* miden alrededor de 50-60 µm × 20-30 µm y tienen una cáscara lisa, bastante gruesa y una forma ovalada aplanada en un lado, muy parecida a una pelota de rugby parcialmente inflada y aplastada. A veces se ven gusanos adultos en los preparados de cinta adhesiva. Los adultos miden alrededor de 1 cm de largo, tienen cola puntiaguda y dos alas transparentes a los lados del extremo anterior.

VII. Notas acerca del procedimiento

1. La persona que obtiene las muestras debe tomar precauciones, ya que los huevos son infecciosos si se ingieren. Pueden usarse guantes o lavarse con cuidado las manos después del procedimiento. En el comercio existe una paleta con una cubierta adhesiva engomada (BD Falcon®, Swube®, Pinworm Paddle. BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) que representa un dispositivo de obtención de muestras menos engorroso y más seguro.
2. Si se usó cinta opaca por error, el agregado de aceite de inmersión a la superficie facilitará el examen microscópico.

VIII. Limitaciones del procedimiento

1. Las hembras de *E. vermicularis* depositan huevos en forma irregular. Por lo tanto, deben obtenerse varias muestras en días diferentes antes de descartar la infección.

IX. Bibliografía

- García L. Examination of Fecal Specimens. En: Diagnostic Medical Parasitology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001:759-764.
- García L. Parasitology. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

PROTOCOLO 23-1

PRUEBA DE HEMADSORCIÓN

I. Principio

La prueba de hemadsorción es el método más sencillo para detectar la presencia de ortomixovirus o paramixovirus. La identificación del aislamiento también puede llevarse a cabo por inhibición de la hemadsorción, aunque la inhibición de la hemaglutinación (IHA) es menos engorrosa y más barata.

Entre los virus que producen aglutinación de eritrocitos, los ortomixovirus y los paramixovirus maduran en la membrana plasmática de las células infectadas. A medida que "brotan" de la membrana plasmática, insertan en la membrana hemaglutininas codificadas por ellos. La presencia de células infectadas en una monocapa puede detectarse por la adherencia de los eritrocitos a la monocapa. Como algunos virus simianos que pueden estar presentes en tejidos de mono también producen hemaglutininas, es importante incluir como controles monocapas sin infectar.

II. Materiales y reactivos

- A. Cultivos primarios de células de riñón de mono, infectados y control.
- B. Suspensión de eritrocitos frescos de cobayo, lavados, al 0,4% en medio sin suero.

III. Control de calidad

- A. Control positivo (virus hemaglutinante).
- B. Control negativo (monocapa no infectada).

IV. Procedimiento

1. Agregar 0,2 mL de eritrocitos de cobayo por cada 1 mL de medio.
2. Incubar en gradilla inclinada durante 1 hora a 4 °C.
3. Observar con el microscopio en busca de aglutinación en la fase líquida y de adherencia de los eritrocitos a la monocapa.
4. Incubar los cultivos 1 hora a más a 20 °C.
5. Observar nuevamente en busca de aglutinación y adherencia.

PROTOCOLO 23-1

PRUEBA DE HEMADSORCIÓN (cont.)

V. Resultados

A. Interpretación

Aglutinación de los eritrocitos en la fase líquida o adherencia de los eritrocitos a la monocapa. Si hay hemadsorción en el control negativo, la prueba no es válida. La elución de los eritrocitos a 20 °C sugiere la presencia de virus de parainfluenza 1 a 3.

VI. Bibliografía

Smith TF. Viruses. En: Washington JA, ed. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2ª ed. Nueva York: Springer-Verlag, 1985.

PROTOCOLO A-1

FÓRMULAS DE CONSERVANTES DE HECES USADOS HABITUALMENTE

I. Timerosal-yodo-formalina (MIF)

A. Solución I

Tintura de timerosal, 1:1 000, 40 mL

Formaldehído, solución acuosa al 10% (USP), 5 mL

Glicerol, 1 mL

Agua destilada, 50 mL

B. Solución II

Cristales de yoduro de potasio (KI), 10 g.

Cristales de yodo (agregar después de que se disuelve el KI), 5 g.

Agua destilada, 100 mL.

La fecha de vencimiento de ambas soluciones es de muchos meses si se almacenan a temperatura ambiente en frascos color caramelo. Combinar en un frasco pequeño 9,4 mL de la solución I con 0,6 mL de la solución II inmediatamente antes de usar. Agregar el equivalente de alrededor de un cuarto de cucharadita de heces recién emitidas y mezclar bien con una varilla de madera. Dejar que la suspensión sedimente durante 24 horas; luego, extraer con una pipeta una fracción de la capa media de color naranja pálido y de la capa inferior, de color más intenso, para preparar frotis.

II. LV-PVA

A. Fórmula

Alcohol polivinílico, 10 g.

Alcohol etílico al 95%, 62,5 mL.

Cloruro mercuríco, solución acuosa saturada, 125 mL.

Glicerina, 3 mL.

Los componentes líquidos se mezclan en un vaso de precipitado de 500 mL y se agrega el alcohol polivinílico (PVA) en polvo, sin mezclar. Cubrir el vaso con papel o película transparente y dejar humedecer el PVA durante la noche. Calentar con suavidad la mezcla a 75 °C y agitar con delicadeza durante 30 segundos hasta que se obtiene una suspensión algo lechosa.

III. Acetato de sodio-ácido acético-formalina (SAF)

A. Fórmula

Formaldehído (solución al 37-40%), 0,6 mL.

Ácido acético glacial, 0,3 mL.

Acetato de sodio, 225 mg.

Agua destilada, 13,88 mL.

Disolver el acetato de sodio en el agua destilada, agregar lentamente el ácido acético glacial y la solución de formalina, mezclar y guardar. La fecha de vencimiento es de varios meses.

IV. Fijador de Schaudinn (cloruro mercuríco en alcohol etílico y ácido acético glacial)

A. Fórmula

Cloruro mercuríco, solución acuosa saturada (Hg Cl_2), 110 g

Agua destilada, 1 000 mL

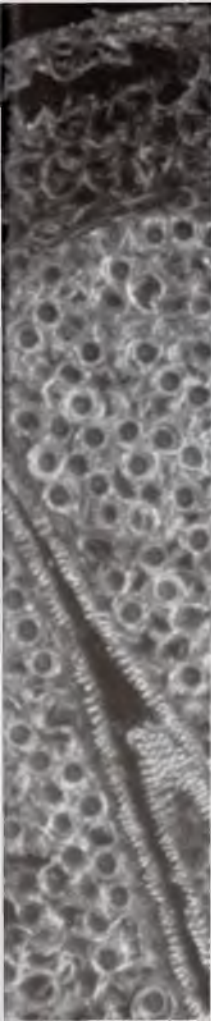
Colocar en una probeta dentro de un baño de agua de modo que hierva hasta que el cloruro mercuríco se disuelva; luego dejar reposar varias horas hasta que se formen cristales.

V. Fijador de Schaudinn (solución concentrada)

Cloruro mercuríco, solución acuosa saturada, 600 mL.

Alcohol etílico al 95%, 300 mL.

Agregar 5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de solución madre inmediatamente antes de usar.

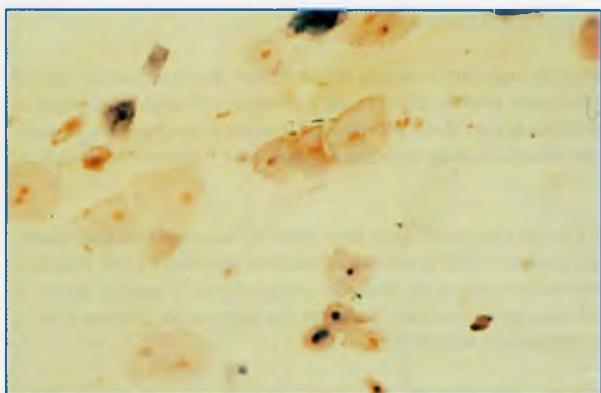


Láminas en color

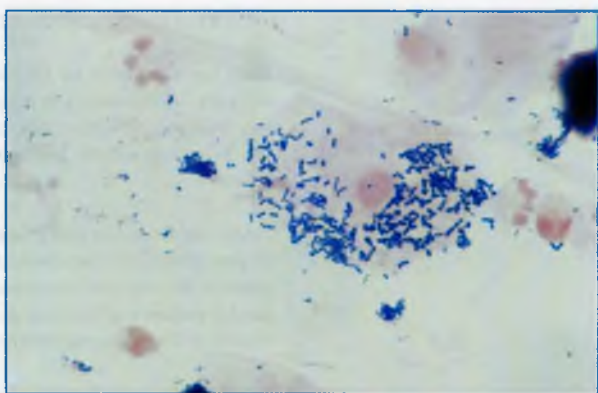
EVALUACIÓN POR TINCIÓN DE GRAM DE FROTIS DE ESPUTO

La calidad de las muestras de esputo se puede evaluar mediante recuento del número relativo de células epiteliales pavimentosas y neutrófilos segmentados por campo de bajo aumento en un frotis con tinción de Gram. La presencia de células epiteliales pavimentosas indica contaminación con secreciones orofaríngeas. Por el contrario, la neumonía bacteriana produce grandes cantidades de neutrófilos segmentados que pueden detectarse en las muestras de esputo. Las siguientes son microfotografías de frotis de muestras de esputo con tinción de Gram que ilustran la presencia relativa de varios componentes celulares.

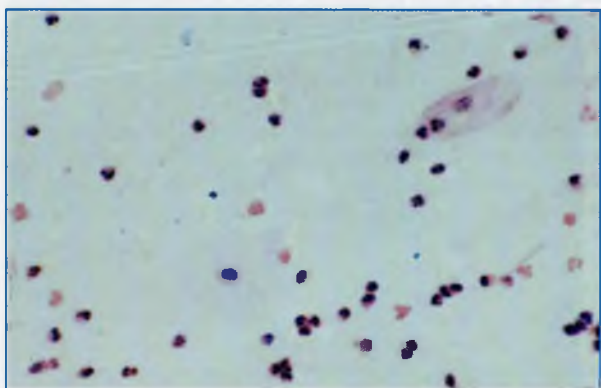
- A. Vista de un campo de bajo aumento de un frotis de esputo con tinción de Gram que revela la presencia de un campo cubierto de células epiteliales pavimentosas y la ausencia de neutrófilos segmentados. Esta muestra representa saliva, daría una calificación de baja calidad y no es aceptable para el cultivo.
- B. La célula epitelial pavimentosa que se muestra aquí se encuentra altamente colonizada por bacterias gram-positivas. El sobrecrecimiento de bacterias en las muestras de esputo suele indicar una demora en el envío de la muestra al laboratorio y que cualquier resultado semicuantitativo será de escaso valor.
- C. Este frotis de esputo coloreado con tinción de Gram muestra una mezcla de células epiteliales pavimentosas y neutrófilos segmentados. La presencia de neutrófilos segmentados indica que existe un foco infeccioso en algún lugar de las vías respiratorias; sin embargo, la presencia de células epiteliales pavimentosas indica contaminación con las secreciones de las vías respiratorias altas. Este tipo de frotis de esputo es difícil de interpretar porque las infecciones respiratorias altas no pueden distinguirse de las infecciones de las vías respiratorias bajas.
- D. Campo cubierto de neutrófilos y ausencia virtual de células epiteliales pavimentosas. Esta es una muestra de esputo de alta calidad, con buena probabilidad de producir resultados significativos.
- E. Vista de un campo con gran aumento de la muestra en D. que revela neutrófilos segmentados dispersos contra un fondo de hebras de moco teñido de rosado.
- F. Frotis de una muestra de esputo inducido teñido con Diff-Quik, que muestra varias células epiteliales cilíndricas ciliadas. Estas células tienen su origen en las vías respiratorias bajas y cuando están presentes en un frotis de esputo, como aparece aquí, indican una muestra de alta calidad a partir de la cual se pueden obtener resultados valiosos.
- G. Vista con campo de gran aumento de una muestra de esputo con tinción de Gram que ilustra la morfología de una célula epitelial cilíndrica ciliada. Nótese los cilios claros en la parte superior del extremo terminal brillante de esta célula epitelial cilíndrica eosinófila teñida.
- H. Tinción con azul de toluidina de una muestra de esputo inducido que muestra la presencia de células inflamatorias mononucleares compatibles con macrófagos alveolares. Como las células epiteliales cilíndricas, los macrófagos alveolares tienen su origen en lo profundo de las vías respiratorias bajas, y su presencia en las muestras de esputo incrementa la importancia de cualquier especie bacteriana que se aisle.



A



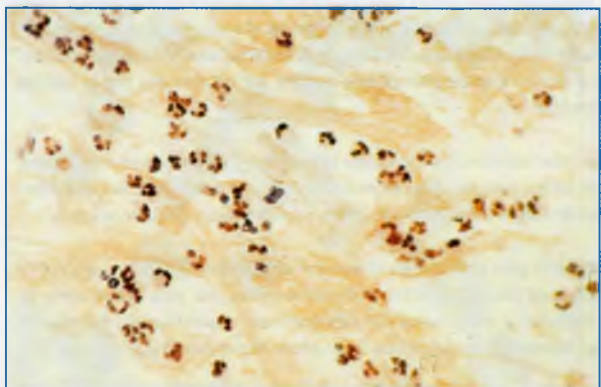
B



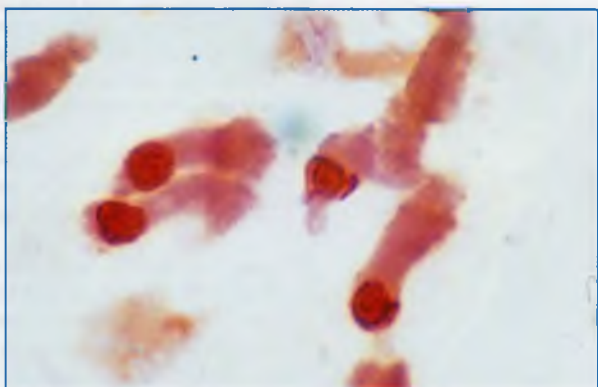
C



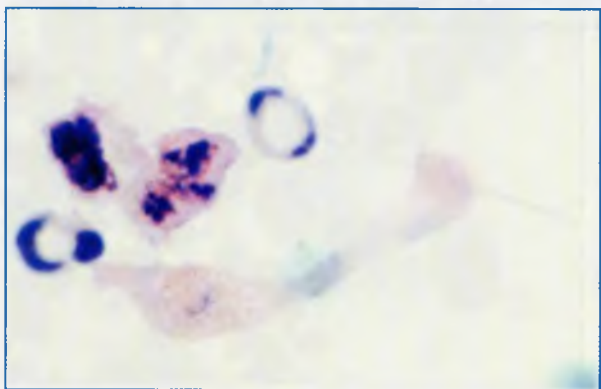
D



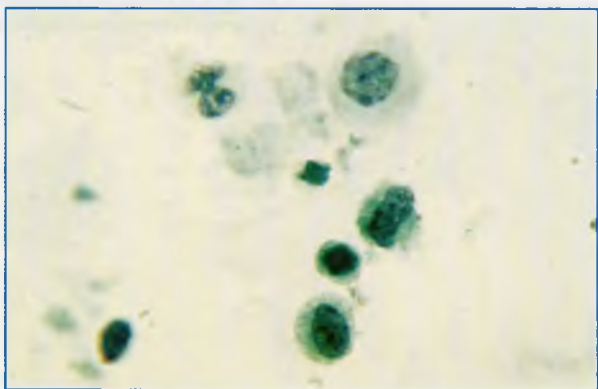
E



F



G

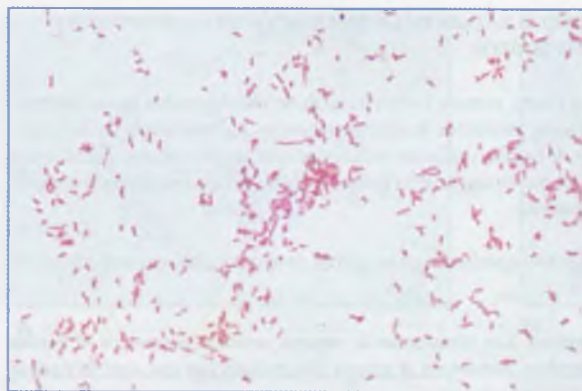


H

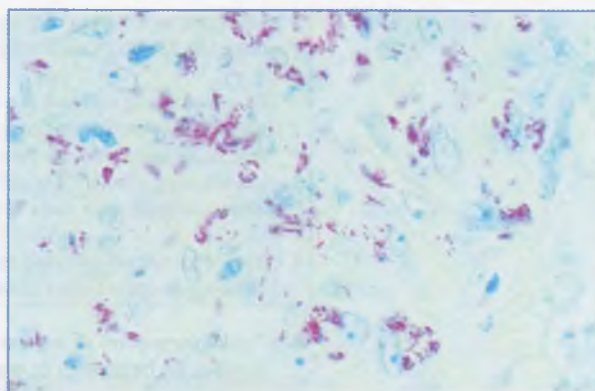
DIVERSAS COLORACIONES UTILIZADAS EN MICROBIOLOGÍA

Dado que muchos de los microorganismos de importancia médica tienen índices de refracción cercanos al del agua, las tinciones son necesarias para hacer posible su detección y estudio. A lo largo del tiempo, se han creado diversas tinciones, cada una diseñada para destacar orgánulos internos o componentes específicos de la pared celular. Las siguientes son ilustraciones de tinciones seleccionadas y algunas de sus aplicaciones.

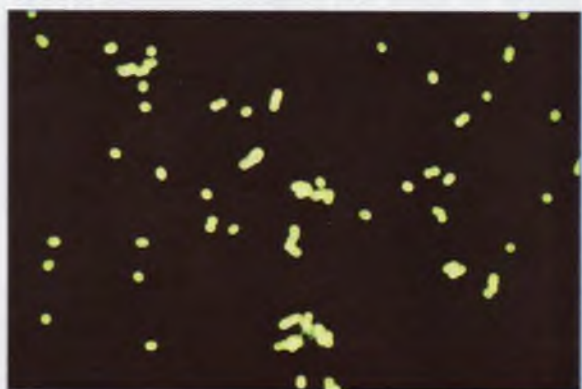
- A. *Tinción de Gram*. La más común de las tinciones utilizadas en el laboratorio de microbiología está diseñada para diferenciar entre las bacterias que pueden retener el colorante violeta de genciana (cristal violeta) y aparecer de color azul intenso-negro luego de la decoloración (bacterias grampositivas) y aquellas que no lo pueden retener y se colorean de rojo (bacterias gramnegativas). Se ilustra una preparación coloreada con la tinción de Gram que muestra bacilos gramnegativos teñidos de rojo.
- B. *Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes*. Esta tinción se utiliza para observar una variedad de microorganismos ácido-alcohol resistentes, como las especies de *Nocardia* en muestras de esputo y los ovocitos de *Cryptosporidium* en muestras fecales. Aquí se observan cúmulos de bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos de rojo en una muestra de una biopsia hepática de un paciente con SIDA. Los microorganismos se tiñen de rojo con la coloración para bacilos ácido-alcohol resistentes; los que aquí se muestran fueron identificados como pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*.
- C. *Fluorescencia directa*. Los colorantes fluorescentes (rodamina y auramina) reaccionan directamente con la pared celular de las micobacterias. También se dispone de anticuerpos conjugados con fluoresceína para detectar una variedad de agentes microbianos usando la prueba directa con anticuerpos fluorescentes. Aquí se muestran micobacterias con fluorescencia amarillo verdosa en un esputo concentrado de un paciente con tuberculosis pulmonar.
- D. *Naranja de acridina*. Esta tinción fluorescente rápida se usa para observar formas bacterianas en frotis directos y preparados con líquidos biológicos. Se utiliza sobre todo para la detección de bacterias gramnegativas en los hemocultivos positivos, los cuales pueden perderse con la tinción de Gram por la intensa tinción roja de los detritos del fondo. Aquí se muestra una bacteria larga en forma de bastón con un característico resplandor naranja, cuando se observa con un microscopio de fluorescencia.
- E. *Azul de metileno*. Esta tinción rápida e inespecífica se utiliza para mostrar la presencia de bacterias y otros microorganismos en frotis directos. Aquí se muestran bacilos que han tomado la tinción azul. Una importante aplicación es la detección de bacterias en frotis directos de líquido cefalorraquídeo en casos de sospecha de meningitis aguda, sobre todo de especies gramnegativas, que pueden ser oscurecidas por la tinción roja que toma el material proteico del fondo.
- F. *Blanco de calcoflúor*. Este agente blanqueador autofluorescente tiene la propiedad de acoplarse con la parte de hidratos de carbono de la pared celular de los hongos. Aquí se muestran hifas de color amarillo verde brillante en un preparado teñido con blanco de calcoflúor observado con un microscopio de fluorescencia.
- G. *Wright-Giemsa*. Esta coloración suele utilizarse para observar los elementos celulares en frotis de sangre periférica y de médula ósea. En microbiología, esta tinción se utiliza con mayor frecuencia para la detección de parásitos intraeritrocíticos (plasmodio, babesia) y exoeritrocíticos (tripanosoma, microfilaria), inclusiones de clamidias y, como se muestra aquí, las formas intracelulares de la levadura *Histoplasma capsulatum*.
- H. *Ácido peryódico de Schiff (PAS)*. Esta tinción general se utiliza para mostrar las paredes celulares ricas en polisacáridos. Tiene aplicaciones específicas en la detección de hongos en cortes de tejidos y frotis. Aquí se reconoce el cuerpo de fructificación de las especies *Aspergillus* en el material aspirado de una bola fúngica pulmonar (aspergiloma), rodeada de las esporas de *Aspergillus* teñidas de rojo.



A



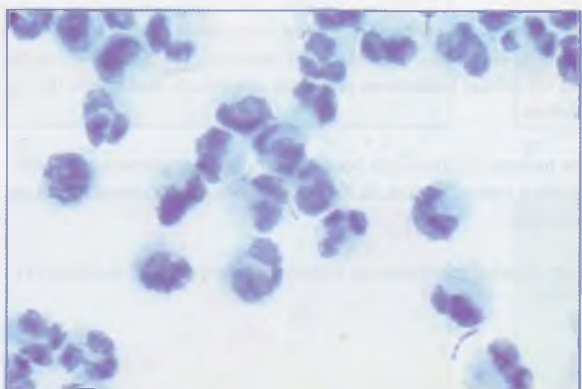
B



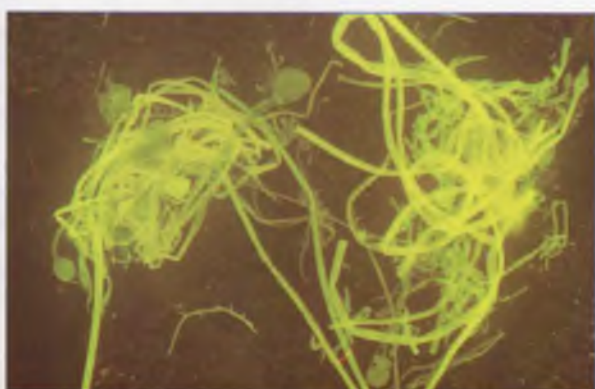
C



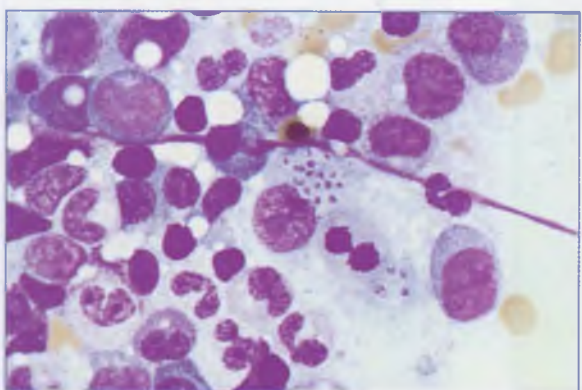
D



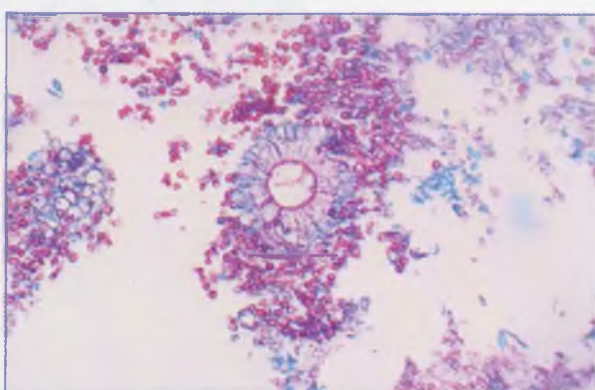
E



F



G

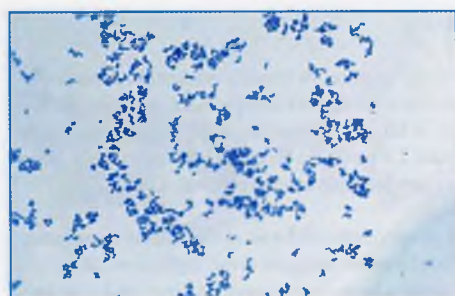


H

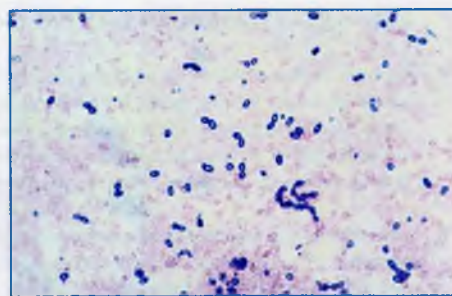
IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE BACTERIAS BASADA EN LA OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR EN PREPARACIONES DE FROTIS TEÑIDOS

La coloración de bacterias con tinción de Gram, sumada a otras técnicas de tinción, es una de las determinaciones más importantes en la identificación presuntiva de microorganismos. La morfología de las bacterias, su organización y sus características de tinción suelen ser suficientemente distintivas para permitir una identificación presuntiva en un frotis teñido con Gram. En esta lámina se incluyen las características microscópicas indicativas de varios grupos de bacterias.

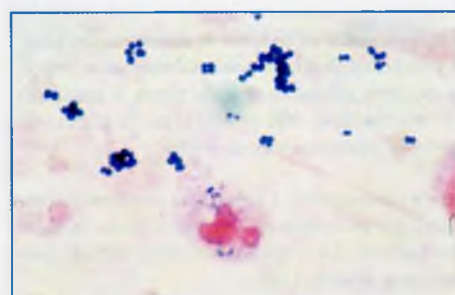
- A. Bacilos gramnegativos relativamente delgados organizados en un patrón de letras chinas, que sugiere una de las bacterias corineformes (difteroides).
- B. Bacilos formadores de esporas grampositivos. Los formadores de esporas aerobios pertenecen al género *Bacillus*; los formadores de esporas anaerobios pertenecen al género *Clostridium*. Las que aquí se ilustran son bacterias formadoras de esporas de *Bacillus sphaericus*.
- C. Tinción de Gram directa de un exudado purulento que muestra cocos grampositivos organizados en pequeños grupos o cúmulos, característicos de las especies de *Staphylococcus*.
- D. Frotis directo de un exudado necrótico obtenido proveniente de un paciente con mionecrosis. Los diminutos cocos grampositivos que se observan en esta microfotografía son estreptococos.
- E. Tinción de Gram directa de un frotis de esputo purulento en el que se observan diplococos grampositivos, característicos de *Streptococcus pneumoniae*.
- F. Exudados purulentos obtenidos de la pared torácica de un paciente con empiema supurativo agudo. Contra el fondo de neutrófilos segmentados se encuentran numerosos bacilos ramificados grampositivos. Las especies de *Actinomyces* y las especies de *Nocardia* pueden causar un cuadro similar a éste; sin embargo, en este caso, un cultivo puro de especies de *Bifidobacterium* se aisló a partir de un cultivo anaerobio.
- G. Preparación con tinción de Gram de un frotis directo de sedimento de orina obtenido de un paciente con cistitis aguda. Nótese los numerosos bacilos gramnegativos en medio de un fondo de neutrófilos segmentados. Se aisló *Escherichia coli* en un cultivo puro.
- H. Preparación con tinción de Gram de un frotis directo de sedimento de orina obtenido de un exudado uretral de un hombre sexualmente activo, que muestra diplococos gramnegativos intracelulares característicos de *Neisseria gonorrhoeae*. En esta fotografía las células bacterianas presentan una tinción más pálida que la observada por el examen microscópico directo.
- I. Microfotografía de un frotis de esputo que muestra un fondo con pocos neutrófilos segmentados y un infiltrado difuso con muchos bacilos gramnegativos cortos, algunos de los cuales parecen estar rodeados por un halo. En el cultivo creció *Klebsiella pneumoniae*.
- J. Microfotografía de filamentos delicados ramificados grampositivos sugestivos de especies de *Actinomyces*. En el cultivo creció *Propionibacterium acnes*.



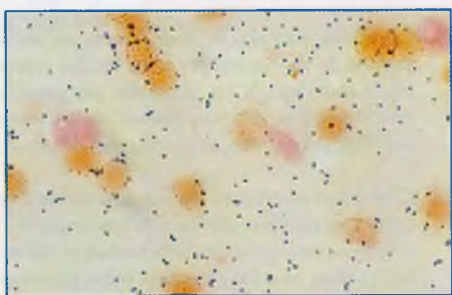
A



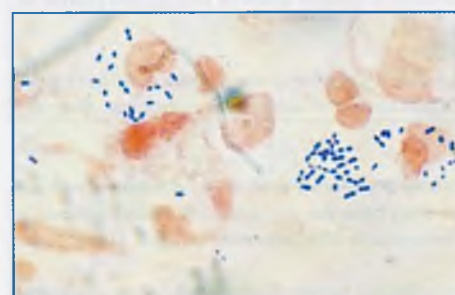
B



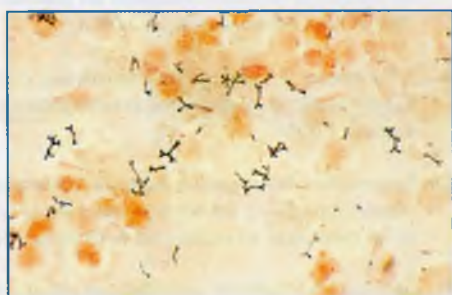
C



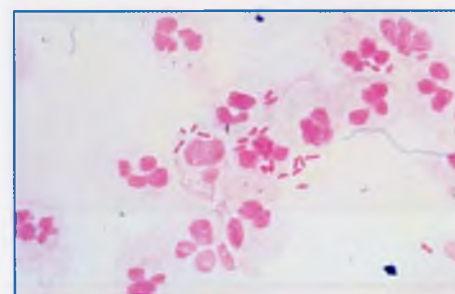
D



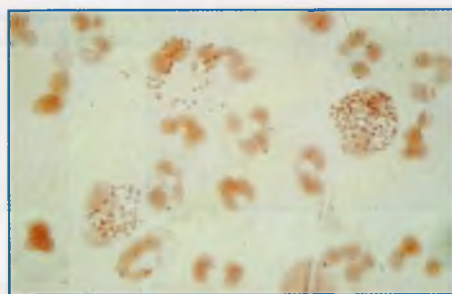
E



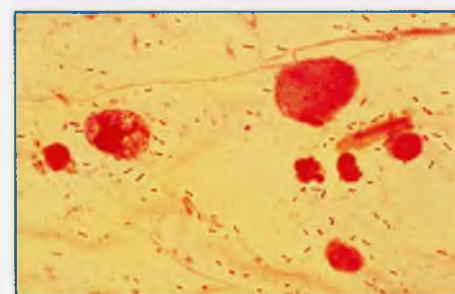
F



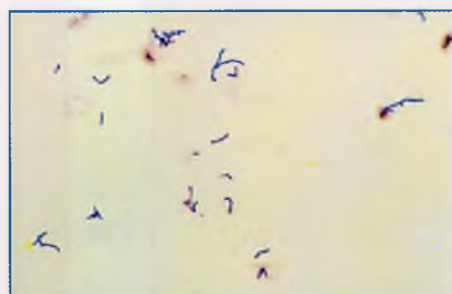
G



H



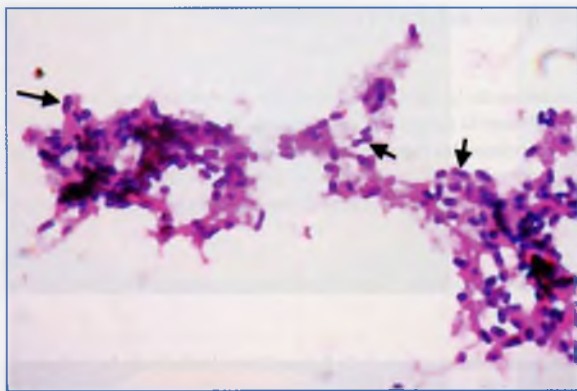
I



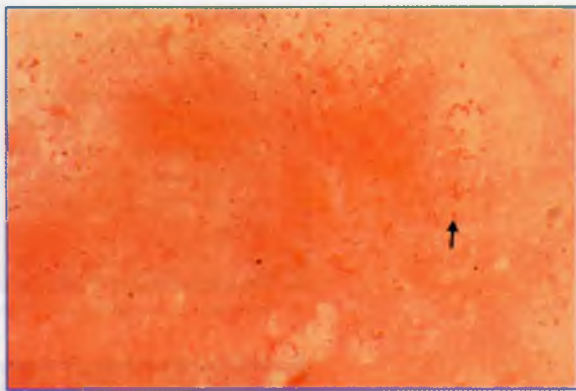
J

DIFICULTADES Y ARTEFACTOS EN LA TINCIÓN DE GRAM

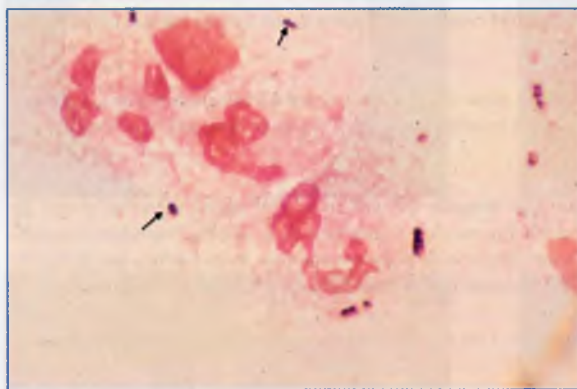
- A. Especies de *Acinetobacter* en un hemocultivo. Este género de cocobacilos tiende a retener el colorante violeta de genciana. De este modo, los frotis con tinción de Gram pueden ser interpretados en forma errónea como cocos gramnegativos, cocos grampositivos (*flecha*) o bacilos grampositivos. El microscopista debe evaluar el patrón de todas las bacterias presentes en el frotis. La presencia de células que se tiñen de violeta es un indicio de que la verdadera reacción puede ser gramnegativa. Aumento original, 1 000×.
- B. Los estafilococos sobrecolorados de una muestra genital se interpretan en forma errónea como cocos gramnegativos. A pesar de que los gonococos y los estafilococos pueden aparecer como diplococos, salvo una rara excepción (*flecha*) la forma de “habichuela” de los gonococos no se encuentra presente aquí y las bacterias no son intracelulares. Es importante no sugerir la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* a menos que la morfología sea característica. Aumento original, 1 000×.
- C. Las células alargadas de *Streptococcus pneumoniae* (*flechas*) presentes en un frotis de esputo pueden interpretarse de manera errónea como bacilos grampositivos y en consecuencia se puede subestimar su importancia como uno de los principales patógenos respiratorios. Otras células en el frotis tienen la apariencia característica en forma de “lanceta” de los neumococos. El microscopista debe evaluar el patrón global y no confundirse por ocasionales imágenes de estructuras engañosas. Aumento original, 1 000×.
- D. *Clostridium perfringens* cambia de color fácilmente y parece gramnegativo. La presencia ocasional de bacterias grampositivas (*flecha*) y la apariencia de “contenedor” que no se asemeja a un típico bacilo entérico, proporcionan los indicios de la verdadera naturaleza de las bacterias. Las especies de *Bacillus* también pueden cambiar de color y aparecer como gramnegativas. Aumento original, 1 000×.
- E. Los restos de la tinción de Gram parecen cocos grampositivos. El tamaño pequeño y la variación en tamaño sugieren la verdadera naturaleza del material. Los artefactos a menudo aparecen refringentes cuando se varía el foco. Aumento original, 1 000×.
- F. Los bastones y los conos de la retina parecen cocos grampositivos y bacilos en una muestra de humor vítreo. El sitio anatómico y su apariencia refringente sugieren la verdadera naturaleza de las estructuras. Aumento original, 1 000×.
- G. Los conidios de *Aspergillus fumigatus* mimetizan a los cocos grampositivos en una muestra de esputo. El tamaño agrandado y los bordes ásperos de los conidios si están presentes, sugieren la verdadera naturaleza de las estructuras. El examen del frotis puede revelar la presencia de hifas. Aumento original, 1 000×.
- H. Los cilios exfoliados de una célula del aparato respiratorio (*flecha*) pueden asemejarse a los bacilos gramnegativos. Puede sugerirse como un bacilo teñido pálidamente, como *Fusobacterium nucleatum*. Sin embargo, cuando se inspeccionan más de cerca, las estructuras no contienen los detalles morfológicos de una bacteria. Si se continúa la búsqueda se encuentran casi siempre células intactas con sus cilios pegados. Magnificación original, 1 000× (imagen aumentada).



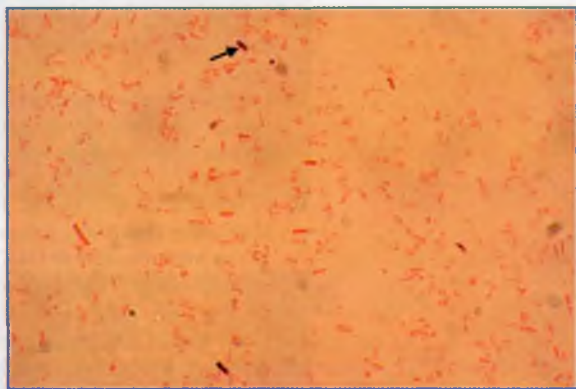
A



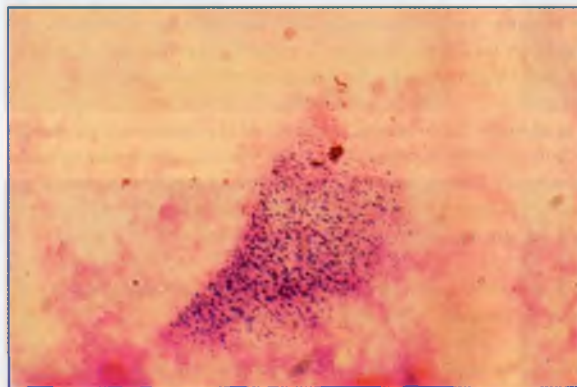
B



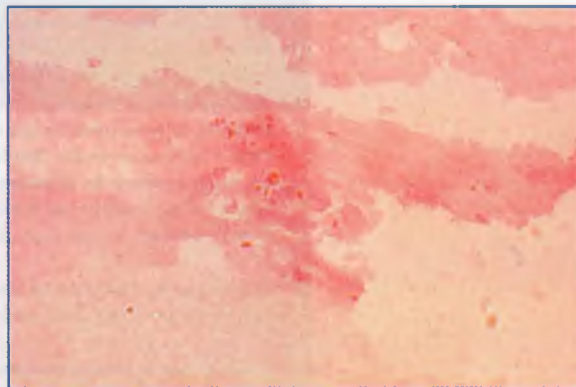
C



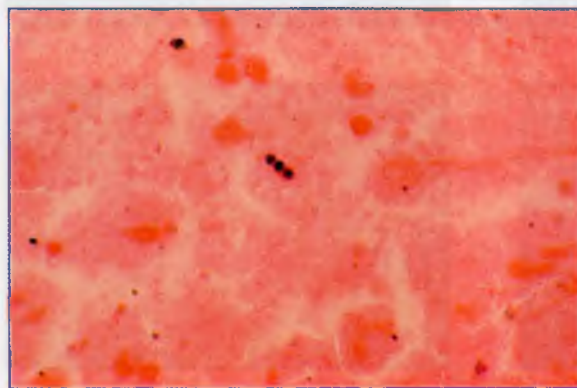
D



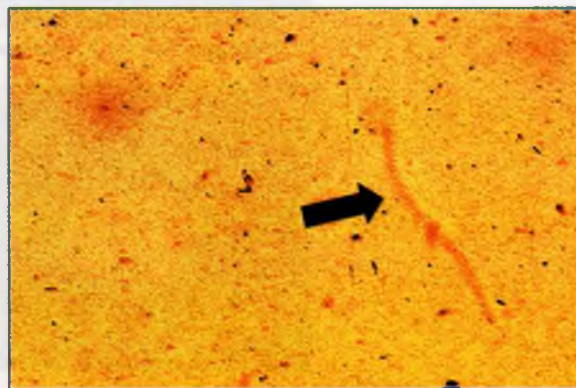
E



F



G



H

IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE LAS BACTERIAS BASADA EN LA OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS

Los microbiólogos utilizan diversas características de las colonias bacterianas que crecen sobre la superficie de los medios de cultivo de agar para establecer la identificación presuntiva del grupo o del género del microorganismo aislado o como guía para seleccionar las pruebas diferenciales que permitan determinar la identificación definitiva de la especie. Por lo general, los criterios que se consideran son tamaño, forma, consistencia, color y pigmentación de las colonias, así como la presencia de reacciones de hemólisis en agar sangre.

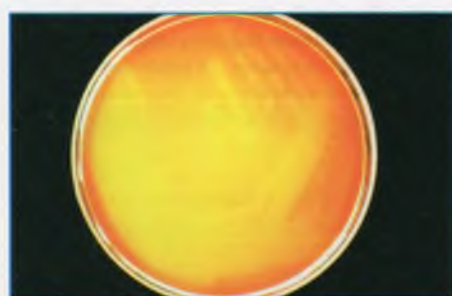
- A. Placa de agar sangre sobre la cual crecen colonias redondas, blancoamarillentas, completas, convexas, no hemolíticas de especies de *Staphylococcus*.
- B. Colonias que crecen sobre agar sangre y muestran diferentes zonas de β -hemólisis alrededor de las colonias. La relación entre el tamaño de las colonias y las zonas de hemólisis se utiliza para diferenciar ciertas especies. Aquí se muestran especies de *Streptococcus* que, por lo general, tienen una relación baja entre el tamaño de las colonias y las zonas de hemólisis, en contraste con las especies de *Staphylococcus*, con una relación que habitualmente es mayor. Aquí se muestran especies de *Streptococcus*, en las cuales el tamaño relativo de las colonias suele ser mayor.
- C. Las placas de agar sangre muestran el cambio de color del agar al tono verdoso característico de la α -hemólisis. El crecimiento en esta placa corresponde a colonias pequeñas y claras de *Streptococcus viridans* con grandes zonas de α -hemólisis.
- D. Se observan colonias opacas, gris apagado, algo húmedas que crecen en agar sangre (*derecha*) o agar de MacConkey (*izquierda*), y sugieren corresponder a uno de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. El crecimiento en agar de MacConkey muestra ausencia de pigmentación roja, lo cual indica que el microorganismo no es fermentador de lactosa. Las bacterias que se muestran aquí son especies de *Salmonella*.
- E. Colonias secas y rugosas de especies de *Bacillus*. Con *Pseudomonas stutzeri* se observan colonias rugosas de aspecto similar.
- F. Colonias pigmentadas de amarillo en agar sangre. La pigmentación es una característica importante para la identificación diferencial de muchas especies bacterianas, sobre todo aquellas que pertenecen a varios grupos de bacilos no fermentadores. Las colonias que se muestran aquí corresponden a especies de *Flavobacterium* luego de 48 horas de incubación, las últimas 24 horas, a temperatura ambiente. La intensidad de la pigmentación a menudo se intensifica luego de una incubación adicional a esa temperatura.
- G. Distintas colonias mucosas que crecen en agar sangre. La consistencia mucosa de la colonia suele ser secundaria a la producción de cápsulas, un mecanismo de protección utilizado por muchas especies bacterianas en defensa contra la fagocitosis. *Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans* se encuentran entre las especies microbianas recubiertas más comunes que producen colonias mucosas. La colonia que se muestra aquí es *Streptococcus pneumoniae*.
- H. Colonias grises, semitranslúcidas de *Eikenella corrodens* que crece en agar sangre. Nótese la apariencia de halo alrededor de las colonias, lo cual ilustra el "poceado" característico de la especie.
- I. Colonias grises, lisas, semitransparentes de *Capnocytophaga ochracea*. Nótese la propagación en forma de rocío de las colonias, característica de las especies de *Capnocytophaga*.
- J. Colonia blanca, seca, calcárea de especies de *Nocardia*. Las especies de *Streptomyces* producen colonias de apariencia similar. Esta identificación presuntiva puede confirmarse si se detecta el olor a "sótano enmohecido" característico de estas especies.



A



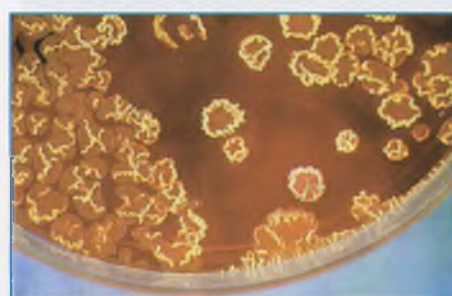
B



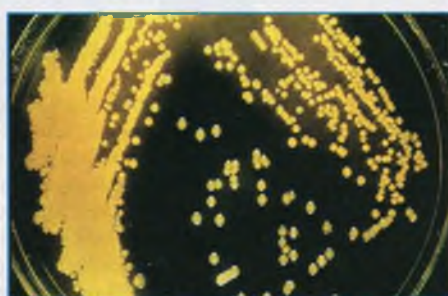
C



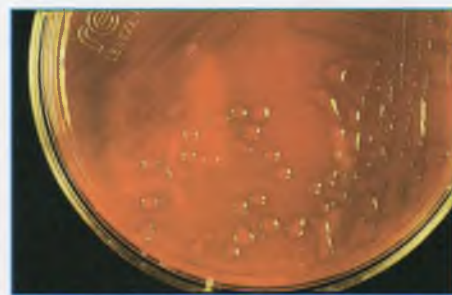
D



E



F



G



H



I

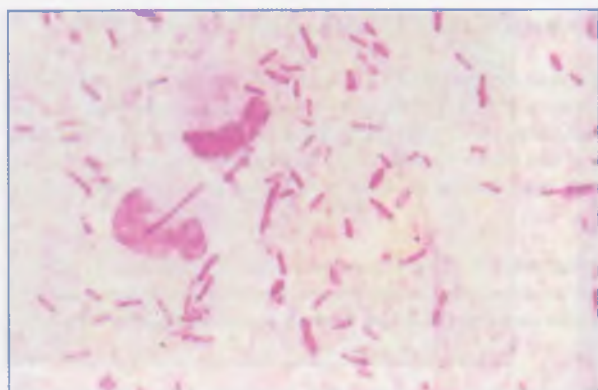


J

IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *ENTEROBACTERIACEAE*

La identificación presuntiva de *Enterobacteriaceae* se basa en el aspecto de las colonias que crecen en los medios de aislamiento primario y en una evaluación de ciertas reacciones bioquímicas. Por definición, para que un microorganismo sea clasificado como *Enterobacteriaceae* debe fermentar la glucosa, produciendo ácido o ácido y gas; reducir nitratos a nitritos y no mostrar ninguna actividad de citocromo oxidasa.

- A. Tinción de Gram de un frotis de esputo que muestra los bacilos gramnegativos pletóricos y cortos característicos de los miembros de *Enterobacteriaceae*. También se muestran dos leucocitos polimorfonucleares, lo que sugiere un proceso infeccioso continuo en este paciente. En este caso el cultivo confirmó que el microorganismo era *K. pneumoniae*.
- B. Cultivo mixto que muestra el crecimiento a las 24 horas en agar sangre de dos morfotipos de bacilos gramnegativos grandes y un tercer morfotipo de un microorganismo más pequeño del que se puede sospechar que es una especie grampositiva. Un morfotipo se puede observar como colonias blancas, grandes y brillantes, mientras que el otro aparece como grandes colonias grises con bordes irregulares. Se puede sospechar que ambos tipos de colonias contienen bacilos gramnegativos típicos de los miembros de *Enterobacteriaceae*. También se presentan muchas colonias completas, blancas y pequeñas, típicas de uno de los cocos grampositivos.
- C. Colonias rosadas, grandes, mucoides y brillantes en agar de MacConkey típicas de muchas especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. Sólo sobre la base de su apariencia, se puede sospechar que estas colonias constituyen una especie de *Enterobacteriaceae*.
- D. Patrón en forma de enjambre de una cepa móvil de especie de *Proteus* en una placa de agar chocolate.
- E. Serie de tubos con agar hierro de Kigler (KIA) "en pico de flauta" (agar inclinado) que muestra varios patrones de reacción. El tubo del extremo izquierdo ilustra una porción inclinada ácida (amarilla) y un extremo ácido (amarillo), lo que indica tanto fermentación de glucosa como de lactosa. También obsérvese el espacio en la parte inferior del tubo y la división en el agar en el medio del tubo que indica la producción de gas (CO_2) por parte del microorganismo. Las cantidades abundantes de CO_2 , como se observan aquí, suelen ser producidas sólo por microorganismos pertenecientes a la tribu V (*Klebsiellae*). El segundo tubo desde la izquierda ilustra una reacción ácida/ácida pero sin presencia de gas, típica del tipo de reacción que se ve con *E. coli*. El tercer tubo de la izquierda muestra un agar inclinado alcalino (rojo)/profundidad ácida característicos de un no fermentador de lactosa. El cuarto tubo ilustra un agar inclinado rojo/profundidad negra, que indica la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S). Cuando se observa este tipo de reacción con un microorganismo oxidasa negativo, se presume que la porción profunda del tubo es ácida (amarillo), lo que indica fermentación de glucosa aun cuando el color amarillo está enmascarado debido a la producción de H_2S . La reacción en el quinto tubo (*extremo derecho*) rojo/rojo es típica de los bacilos gramnegativos no fermentadores que no fermentan lactosa ni glucosa.
- F. Tres tubos de medios de cultivo violeta que contienen tubos de Durham para demostrar la formación de gas. Los dos tubos de la derecha muestran ácido a partir de glucosa (color amarillo), comparados con el control negativo de la izquierda. El tubo del extremo derecho muestra la colección de gas dentro del tubo de Durham, característica de un microorganismo que produce tanto ácido como gas a partir de glucosa.
- G. Prueba de citocromo oxidasa que muestra una reacción color violeta positiva (*izquierda*) comparada con una reacción negativa (*derecha*; no se observó ningún color azul dentro de los 10 segundos; véase protocolo 1-5). Cualquier microorganismo que da una reacción positiva puede ser excluido de la familia *Enterobacteriaceae*.
- H. Medios de prueba de nitrato que contienen tubos de Durham para demostrar la formación de gas nitrógeno. El tubo de la izquierda muestra una reacción positiva (roja) después del agregado de α -naftilamina y ácido sulfánico. El microorganismo de prueba ha reducido los nitratos en el medio a nitritos, los cuales reaccionaron con los reactivos para formar el pigmento rojo *p*-sulfobenceno-azo- α -naftilamina (véase protocolo 6-2). El tubo del medio también muestra una reacción de nitrato positiva, pero en este caso todo el nitrato fue reducido primero a nitrito y luego reducido a su vez a gas nitrógeno, indicado por la colección de gas dentro del tubo de Durham. Como no hay nitrito en el tubo, no hay color rojo cuando se agregan reactivos. El tubo del extremo derecho no muestra ningún color rojo ni gas y muestra una prueba negativa para la reducción de nitrato.



A



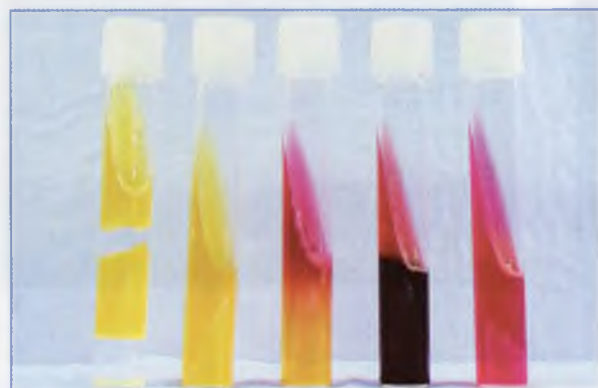
B



C



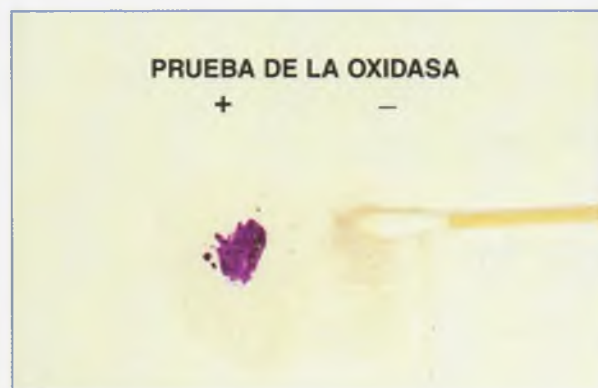
D



E



F



G

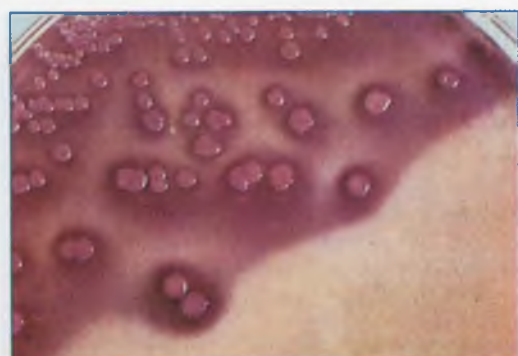


H

ASPECTO DE LAS COLONIAS DE *ENTEROBACTERIACEAE* EN AGARES DE MACCONKEY Y EMB

El agar de MacConkey y el agar eosina azul de metileno (EMB) son dos medios de aislamiento primario de uso frecuente para la diferenciación presuntiva de los miembros de *Enterobacteriaceae* fermentadores y no fermentadores de lactosa. En agar de MacConkey, las colonias que fermentan la lactosa aparecen rojas debido a la conversión ácida del indicador, el rojo neutro. En agar EMB, los fermentadores ávidos de lactosa producen un brillo metálico verde cuando la producción del ácido es suficiente como para reducir el pH hasta aproximadamente 4,5 o menos.

- A. Superficie de agar de MacConkey con crecimiento de 24 horas de colonias rojas, fermentadoras de lactosa. El color rojo difuso en el agar que rodea las colonias es causado por microorganismos que fermentan con avidez la lactosa, con producción de grandes cantidades de ácidos mixtos y precipitación de las sales biliares en el medio (p. ej., *Escherichia coli*).
- B. Superficie de agar de MacConkey que muestra tanto colonias rojas, fermentadoras de lactosa, como colonias claras más pequeñas, que no fermentan la lactosa.
- C y D. Superficie de placas de agar EMB que muestran el brillo verde producido por los miembros de *Enterobacteriaceae* ávidos fermentadores de lactosa (o sacarosa). La mayoría de las cepas de *E. coli* producen colonias con este aspecto de agar EMB y, como *E. coli* se encuentra entre las cepas más frecuentes de muestras clínicas, el aspecto de estas colonias puede servir a menudo para su identificación presuntiva. Sin embargo, se deben evaluar las características distintas de la producción de un brillo verde en EMB antes de poder identificar en forma definida a un microorganismo como *E. coli*, ya que otras enterobacterias que fermentan la lactosa pueden tener un aspecto similar.
- E y F. Superficie de placas de agar EMB que muestran un cultivo mixto de *E. coli* (colonias brillantes verdes) y especies de *Shigella*. La mayoría de las especies de *Shigella* no fermentan lactosa y, por lo tanto, producen colonias semitranslúcidas y no pigmentadas en agar EMB. Otras especies incapaces de fermentar lactosa producen colonias de aspecto similar a las ilustradas en estas fotografías.



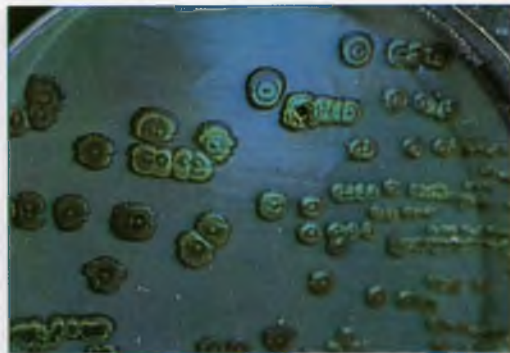
A



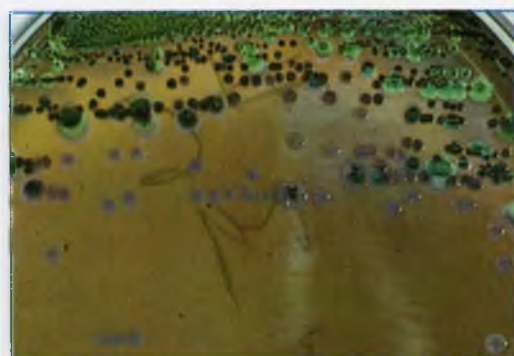
B



C



D



E

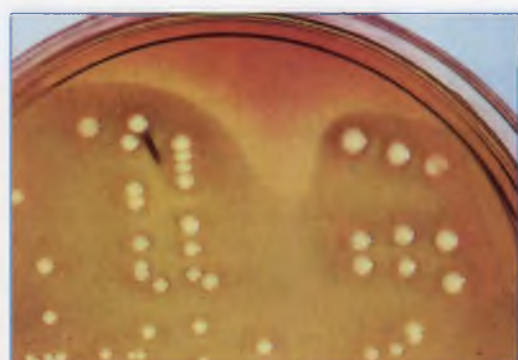


F

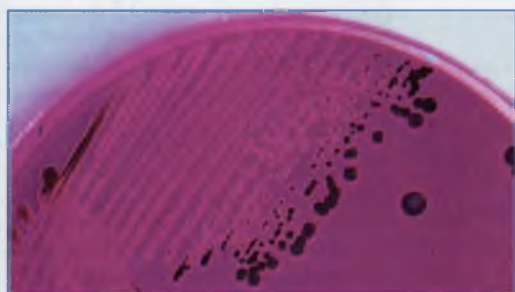
ASPECTO DE *ENTEROBACTERIACEAE* EN PLACAS DE AGAR XLD Y HE

En los laboratorios de microbiología clínica se utilizan varios tipos de medios más selectivos que los agares de MacConkey o EMB para la recuperación de ciertos miembros de *Enterobacteriaceae*. Se utilizan más a menudo agares de xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y entérico de Hektoen (HE); sólo se utilizan medios altamente selectivos como agar sulfato de bismuto para aplicaciones especiales. Estos medios no sólo tienen la capacidad de separar los fermentadores de lactosa de los no fermentadores sino que también pueden detectar microorganismos productores de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

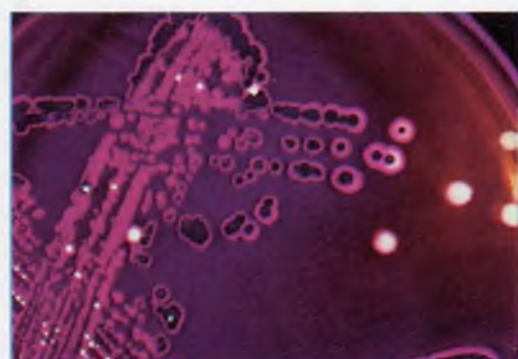
- A. Superficie de agar XLD que muestra la conversión amarilla del medio por las colonias de *E. coli* productoras de ácido.
- B. Colonias no fermentadoras de lactosa (sin conversión ácida del medio) de especies de *Salmonella* sobre la superficie de agar XLD. Obsérvese la pigmentación negra de algunas de las colonias, lo que indica la producción de H_2S .
- C. Fotografía que muestra una placa de agar XLD inoculada con una mezcla 50/50 de especies de *E. coli* y *Salmonella*. Obsérvese el crecimiento preponderante de las especies de *Salmonella* (colonias rojas) comparado con las pocas colonias amarillas fermentadoras de lactosa que han sido inhibidas en forma eficaz. El halo rosado definido que rodea a las colonias de *Salmonella* indica la descarboxilación de lisina, una característica útil para diferenciar las especies de *Salmonella* (positivas) de las colonias de especies de *Proteus* que producen H_2S .
- D. Placa de agar XLD inoculada con una cepa productora de H_2S de una especie de *Proteus*. Obsérvese la ausencia de un halo rosado claro alrededor de las colonias, lo que indica la ausencia de descarboxilación de lisina (compárese con las colonias que se muestran en el panel C).
- E. Superficie de agar HE que muestra la producción de ácido por colonias de *E. coli*.
- F. Superficie de agar HE que muestra las colonias verdes pálidas (incoloras) de miembros no fermentadores de lactosa de las enterobacterias.



A



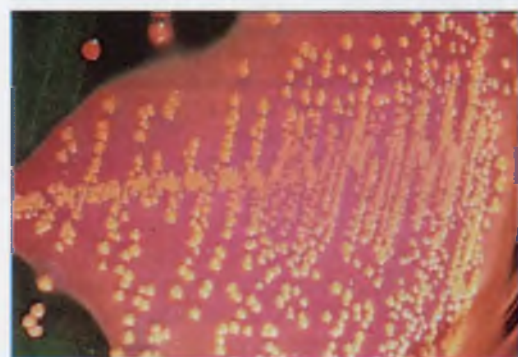
B



C



D



E



F

growth in the presence of the antibiotic. The results of the experiment are shown in Figure 1.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

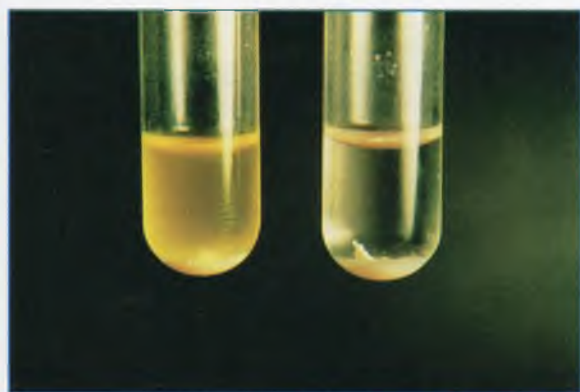
The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

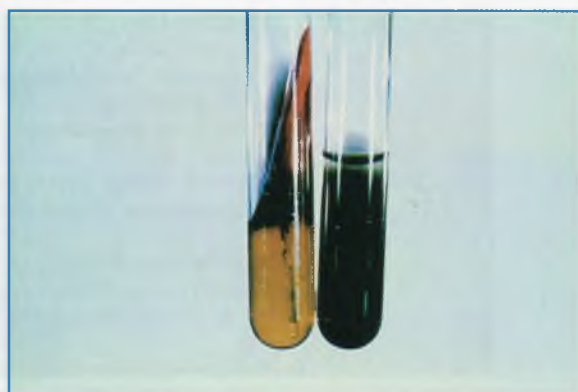
The results of the experiment show that the growth of the bacteria is inhibited in the presence of the antibiotic.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE *ENTEROBACTERIACEAE*

- A.** Prueba de *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) que muestra una reacción positiva (amarilla) (*izquierda*) comparada con el control negativo (*derecha*). Una reacción positiva indica que el microorganismo es capaz de producir β -galactosidasa, enzima requerida para la degradación inicial de lactosa, liberando el *orto*-nitrofenol de color amarillo.
- B.** Tubo de agar semisólido SIM (sulfuro indol motilidad) (*derecha*) y de agar hierro de Kligler (KIA) “en pico de flauta” (*izquierda*), que muestra las diferencias en sensibilidad para detectar sulfuro de hidrógeno (H_2S) por los diferentes medios. El delicado ennegrecimiento difuso en el tubo SIM es producido por un microorganismo móvil productor débil de H_2S (en este caso *S. typhi*). Obsérvese que el H_2S producido en el tubo KIA menos sensible aparece sólo en el medio del tubo, en la interfaz del agar inclinado y la profundidad, típico de *S. typhi* en este medio.
- C y D.** Cuatro tubos en los que se realizaron las pruebas de indol (I), rojo de metilo (RM), Voges-Proskauer (VP) y citrato (C). Cuando estas cuatro pruebas se realizan juntas constituyen las reacciones IMViC clásicas. La formación de indol a partir del triptófano está indicada por un color rojo con el agregado de reactivo de Kovac (*tubo de la extrema izquierda*, panel **C**). El desarrollo de un color rojo en el tubo de RM señala una caída en el pH hasta 4,4 o más bajo, que indica fermentadores fuertes de ácidos mixtos (*segundo tubo desde la izquierda*, panel **C**). Un color rojo en el tubo VP indica la presencia de acetoína (acetilmetilcarbinol) formada a partir del piruvato en la vía metabólica del butilenglicol (*tercer tubo desde la izquierda*, panel **D**). El crecimiento en el pico de flauta del agar citrato de Simmon y la conversión del indicador de azul de bromotimol a un color azul alcalino indica que el microorganismo puede utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono (*tubo más a la derecha*, panel **D**). **C** muestra las reacciones para *E. coli* (+ + - -). El panel **D** muestra las reacciones para *Klebsiella/Enterobacter* (- - + +).
- E.** Los dos tubos de la izquierda muestran reacciones de fenilalanina desaminasa negativa (amarillo claro) y positiva (verde oscuro). El color verde es producido por la reacción entre el reactivo $FeCl_3$ y el ácido fenilpirúvico en el medio, resultante de la desaminación de fenilalanina (véase protocolo 6-8). Los tres tubos de la derecha son los picos de flauta del agar urea de Christensen. El tercero desde la derecha muestra una reacción positiva fuerte (color rojo en todo el medio, que indica una reacción alcalina por la degradación de la urea), comparado con el control negativo de la extrema derecha (color totalmente amarillo). La reacción en el segundo tubo desde la derecha (color rojo sólo en el agar inclinado) es producida por microorganismos como especies de *Klebsiella* y algunas especies de *Enterobacter* que son productores débiles de ureasa.
- F.** Cuatro tubos que contienen medio de descarboxilasa de Møller cubierto con una capa de vaselina para lograr un medioambiente anaerobio (véase protocolo 6-7). *De izquierda a derecha*: tubo de control de crecimiento desprovisto de aminoácidos (el crecimiento está indicado por la conversión a un color amarillo debido a la fermentación de glucosa en el medio), arginina, lisina y ornitina. El indicador violeta de bromocresol es amarillo a un pH ácido y violeta a un pH alcalino. Por lo tanto, cualquier tubo que aparezca violeta indica un pH alcalino, reacción producida por los microorganismos que pueden descarboxilar el aminoácido contenido en el medio. El microorganismo que se muestra aquí es arginina negativo y ornitina positivo y es la reacción típica observada con *E. aerogenes*.
- G.** El agar lisina hierro (LIA) se utiliza para diferenciar los microorganismos entéricos sobre la base de su capacidad para descarboxilar o desaminar lisina y formar H_2S . Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen una reacción alcalina (violeta) en el extremo del tubo (*tubo intermedio*). Los microorganismos que desaminan la lisina producen un agar inclinado rojo sobre una profundidad ácida (amarilla) (*tubo más a la izquierda*). Las bacterias que generan H_2S producen ennegrecimiento del medio principalmente en el centro y la profundidad del tubo (*también se observa en el tubo del extremo izquierdo*). El tubo del extremo izquierdo es lisina desaminasa positivo y lisina descarboxilasa negativo. El tubo intermedio es lisina desaminasa negativo y lisina descarboxilasa positivo. El tubo del extremo derecho es negativo tanto para lisina desaminasa como para lisina descarboxilasa. (Profundidad rojiza pero no amarilla).
- H.** Tubos de medio de motilidad. Los microorganismos móviles muestran un crecimiento difuso lejos de la línea de inoculación (*tubo de la izquierda*); los microorganismos inmóviles sólo muestran crecimiento a lo largo de la línea de corte (*tubo de la derecha*). También se encuentra disponible un medio de motilidad al que se agrega cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). El crecimiento de microorganismos capaces de reducir el TTC aparece rojo a lo largo de la línea de corte y en el área a la que han migrado las células, lo que facilita la diferenciación entre bacterias móviles e inmóviles (véase lámina en color 7-1E). (Fotografía cortesía de Health and Education Resources, Bethesda, MD).



A



B



C



D



E



F



G



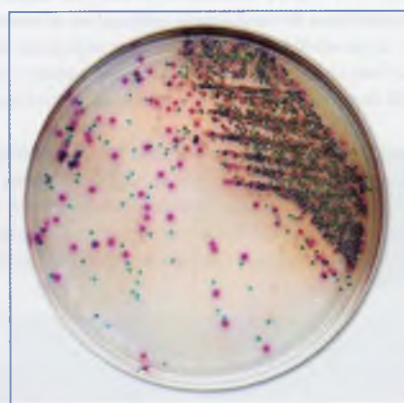
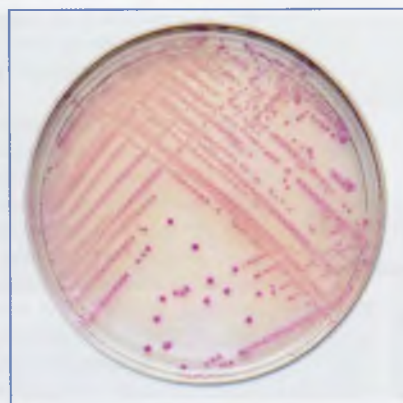
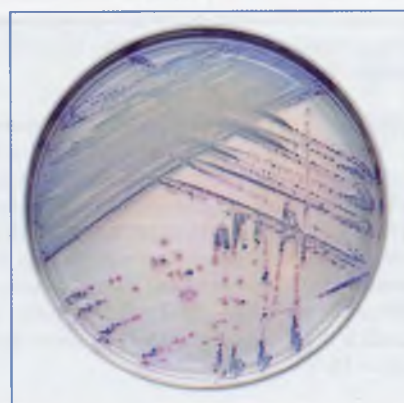
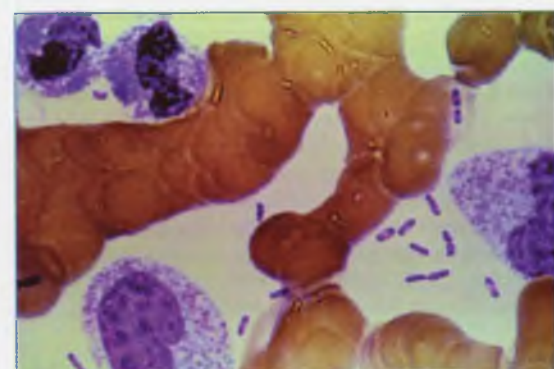
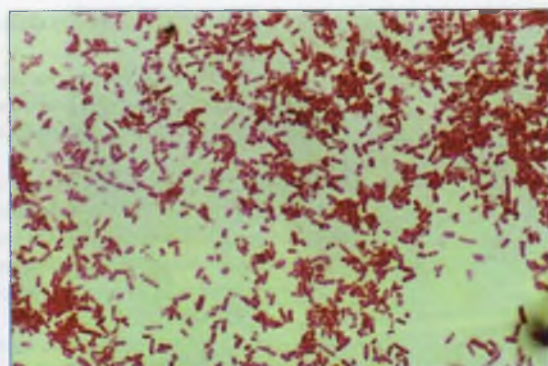
H

PESTE HUMANA

- A. La diseminación hematógena de *Y. pestis* desde la puerta de entrada a otros órganos y tejidos puede producir coagulación intravascular y shock endotóxico, que genera pequeñas hemorragias sobre la piel. (CDC. Public Health Image Library).
- B. Tinción de Gram de *Y. pestis* que muestra bacilos gramnegativos cortos y pletóricos con tinción bipolar. Los microorganismos aparecen rosados en los extremos polares con un área blanca o sin tinción en el centro.
- C. Frotis de sangre periférica con tinción de Wright que muestra un aspecto en “imperdible” de *Y. pestis*. Las bacterias se tiñen de azul oscuro, los leucocitos, de azul claro con núcleos de tinción violeta y los eritrocitos, de color ocre claro. (CDC. Public Health Image Library).
- D. Colonias de *Y. pestis* en una placa de agar sangre a 72 horas. *Yersinia pestis* crece bien en la mayoría de los medios de laboratorio convencionales, después de 48-72 horas, que muestran una morfología en “huevo frito” irregular y elevada opaca blanco grisácea a levemente amarillenta; como alternativa las colonias pueden tener una superficie brillante con aspecto de “cobre repujado”. (CDC. Public Health Image Library).

AGAR CROMOGÉNICO

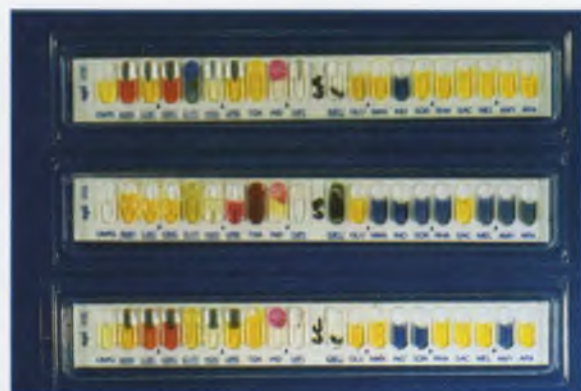
- E. BBL® CHROMagar® O157 está ideado para uso como placa primaria para coprocultivos cuando se realiza un cribado de *E. coli* O157. Distingue *E. coli* O157 (colonias malva) de *E. coli* no O157 (colonias azules). También inhibe la mayoría de las cepas de *Proteus*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* utilizando agentes selectivos. (Cortesía de BD Diagnostic Systems).
- F y G. El medio BBL® CHROMagar® Orientation es un medio diferencial no selectivo para la identificación presuntiva de bacterias aisladas en muestras clínicas primarias. Permite el aislamiento y la identificación presuntiva tanto de patógenos grampositivos como gramnegativos con una única placa. Es útil para la identificación y la enumeración de patógenos urinarios. Identifica a *E. coli* (colonias rosadas) y *Enterococcus* (colonias azules o turquesas, pequeñas) de la placa primaria. El cuadro F muestra agar Orientation con un cultivo puro de *E. coli*. El cuadro G muestra una mezcla mixta de *E. coli* y *Enterococcus* junto con algunas colonias de especies de *Proteus* (beige con halo pardo). (Cortesía de BD Diagnostic Systems).
- H. BBL® CHROMagar® Salmonella está ideado para uso en el cribado de *Salmonella* de muestras clínicas o industriales. Detecta *Salmonella* con una reacción cromogénica altamente específica (colonias violetas con halo violeta), mientras reduce la interferencia de otras colonias productoras de sulfuro de hidrógeno como especies de *Proteus* y *Citrobacter*. (Cortesía de BD Diagnostic Systems).



SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN COMERCIALES

En la actualidad se comercializan algunos sistemas de identificación que contienen reactivos estables y medios diseñados para determinar características bioquímicas. Estos productos varían desde aquellos que se inoculan y se leen en forma manual hasta los que son totalmente automáticos.

- A. Bandas API 20E que muestran el método de inoculación y la aparición de una banda luego de inoculación e incubación. Se transfiere una suspensión del microorganismo por evaluar con una pipeta en cada uno de los 20 compartimentos de medios. Las reacciones de color se leen después de 18 a 24 horas de incubación a 35 °C. El fabricante provee planillas para registrar la interpretación visual de las reacciones de color, que son luego convertidas en un número biotípico de siete dígitos.
- B. El sistema de identificación BBL Crystal Enteric/Nonfermenter contiene una tapa con 30 sustratos deshidratados sobre los extremos de las pinzas de plástico. Se prepara y agrega una suspensión de prueba a 30 pocillos en la unidad base. Se alinea luego la tapa con la base y se ajusta en el lugar, donde el inóculo de prueba rehidrata los sustratos desecados e inicia reacciones de prueba. Después de la incubación, los paneles se leen de arriba hacia abajo utilizando el transiluminador de BBL Crystal. Se examinan los pocillos para detectar cambios de color y se genera un número de perfil de 10 dígitos que se ingresa a un ordenador personal en el cual se ha instalado el libro de códigos de BBL Crystal Electronic, para obtener la identificación.
- C. El panel REMAL Rapid ONE (Oxidase Negative Enterobacteriaceae) tiene 19 sustratos para la identificación de más de 70 microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El sistema consiste en una bandeja plástica con 18 pocillos de reacción. Los pocillos de reacción contienen reactivos deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. La prueba 18 es bifuncional y contiene dos pruebas separadas en el mismo pocillo. Cada prueba es interpretada visualmente para detectar cambios de color después de 4 horas de incubación a 35 °C. Se puntúan los resultados de 19 pruebas más oxidada en las cajas apropiadas del formulario de comunicación y se genera un código de siete dígitos similar al que se muestra en A. El número de biocódigo se ingresa en una PC en la cual se ha instalado el ERIC (Electronic Rapid Compendium), para obtener la identificación.
- D. El sistema Biolog GN Microplate consiste en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene 95 sustratos de carbono y un indicador redox y colorante de tetrazolio. Si las bacterias inoculadas utilizan un sustrato de carbono, el colorante incoloro se reduce en forma irreversible y forma un color violeta. Con el uso de la pantalla de un ordenador, se codifican las celdas violetas como positivas y las celdas incoloras como negativas. El ordenador compara luego "la huella metabólica" del microorganismo inoculado con las de la base de datos y genera la identificación más probable.
- E y F. En el panel de identificación para gramnegativos MicroScan, se inoculan los pocillos de microtitulación con una suspensión concentrada del microorganismo por identificar y se incuban a 35 °C durante 15 a 18 horas. Los paneles pueden interpretarse visualmente (fig. E), después de lo cual los resultados bioquímicos son convertidos en un número biotípico de siete u ocho dígitos que se consulta en un libro de códigos provisto por el fabricante. También se puede utilizar una lectora automática de bandejas, autoSCAN-4, System junto con información LabPro. Algunas bandejas incluyen antibióticos para realizar tanto pruebas de sensibilidad por microdilución como la identificación bacteriana en el mismo panel. Los mismos paneles pueden utilizarse, además, con el WalkAway, System completamente automático (fig. F). El instrumento procesa tanto el panel rápido como el panel convencional de toda la noche en un sistema y se encuentra disponible en modelos de capacidad de 40 y 96 paneles. (Cortesía de Dade Behring).
- G. El VITEK®2 es un nuevo sistema de bioMérieux que realiza los análisis de identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad utilizando un inóculo estandarizado. El VITEK 2 caracteriza al AES (Advanced Expert System, sistema experto avanzado) que integra las tecnologías de inteligencia artificial en el instrumento VITEK 2. AES interpreta los resultados de la prueba de sensibilidad a los antibióticos utilizando una base de datos de conocimiento altamente desarrollado. Esta base contiene la mayoría de los mecanismos de resistencia conocidos (alrededor de 2 000 fenotipos, 20 000 distribuciones de CIM). (Cortesía de bioMérieux).
- H. El sistema microbiológico automatizado para identificación y pruebas de sensibilidad BD PHOENIX® ofrece pruebas de identificación y sensibilidad completamente automáticas sin que se necesite ninguna prueba *off-line*, rótulos manuscritos ni agregados de reactivos. El panel de pruebas sellado nunca se mueve una vez que está colocado en el interior, de modo que no puede ser desalojado, atascarse, romperse ni perder mientras esté en el instrumento. El PHOENIX viene con un software integrado combinado con el BD EpiCenter®. (Cortesía de BD Diagnostic Systems).



A



B



C



D



E



F



G



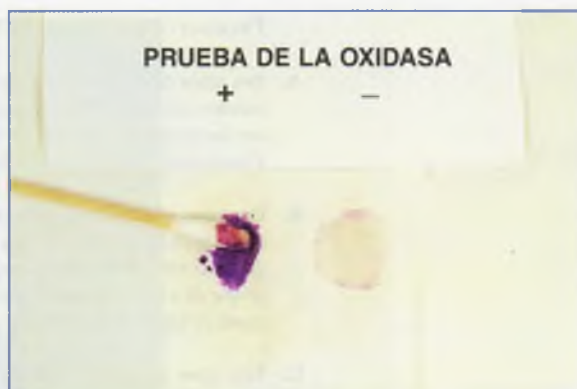
H

CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES PARA DISTINGUIR LOS BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES

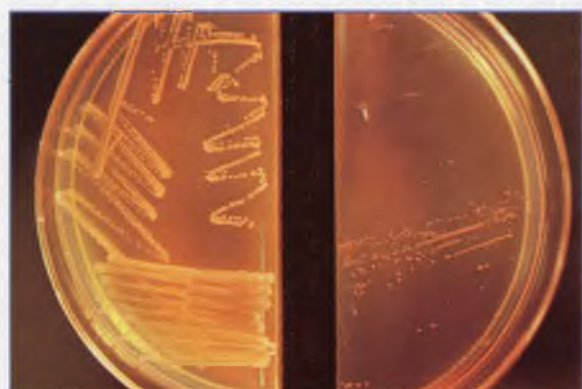
- A. Detección de fermentación. El tubo con agar hierro de Kligler (KIA) de la derecha muestra una reacción característica con el agar “en pico de flauta” alcalino y la profundidad alcalina para un microorganismo no fermentador; el tubo a la izquierda muestra una reacción con el pico de flauta alcalino y la profundidad ácida que indica la fermentación de dextrosa pero la falta de fermentación de lactosa (características de las especies lactosa-negativas de las enterobacterias). La falta de producción de ácido en KIA o en agar triple azúcar-hierro (TSI) indica la incapacidad de las bacterias no fermentadoras para utilizar la lactosa o dextrosa en KIA (o la lactosa, dextrosa o sacarosa en TSI).
- B. Prueba de citocromo oxidasa. La formación de un color azul dentro de los 10 segundos después del extendido de una colonia de prueba en papel de filtro saturado con el reactivo oxidasa (dihidrocloreto de tetrametil-*p*-fenilenediamina) indica actividad de la citocromo oxidasa, característica útil para identificar a muchas especies de no fermentadores. Todos los miembros de las enterobacterias son citocromo oxidasa-negativos.
- C. La falta de crecimiento en agar de MacConkey o el crecimiento inhibido en agar de MacConkey es un indicio de que un bacilo gramnegativo puede ser un no fermentador. Aunque muchas especies de no fermentadores son capaces de crecer en agar de MacConkey, la falta de crecimiento en este medio, como se muestra del lado derecho de este marco dividido, excluye a las enterobacterias, todos cuyos miembros crecen bien en agar de MacConkey (*lado izquierdo*).
- D. Utilización oxidativa de glucosa. Se muestran aquí dos tubos de medio oxidativo-fermentativo (OF) de Hugh-Leifson. El tubo de la derecha está abierto a la atmósfera, mientras el tubo de la izquierda está cubierto con vaselina para excluir la exposición a oxígeno atmosférico. Se observa ácido (color amarillo) sólo en la porción superior del tubo abierto, lo que indica que el microorganismo es capaz de oxidar glucosa pero incapaz de fermentarla.
- E. Tubos de medio de motilidad B que contienen cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). A menudo es difícil observar motilidad con las bacterias no fermentadoras dado que los microorganismos tienden a crecer sólo en la porción superior (la más aerobia) del tubo. El agregado de tetrazolio ayuda a detectar motilidad porque los microorganismos capaces de reducir TTC aparecen rojos a lo largo de la línea de corte y en el área en la cual las células han migrado, lo que hace más fácil diferenciar entre las bacterias móviles (*izquierda*) e inmóviles (*derecha*).
- F. Placa de agar sangre inoculada con una bacteria productora de pigmento amarillo. La producción de pigmento es una característica diferencial importante para la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores. El microorganismo que se muestra aquí es *Sphingomonas paucimobilis*.
- G. Tubos de agar de Flo y Tech inoculados con *Pseudomonas aeruginosa* visualizados bajo luz visible. Estos medios se utilizan para aumentar la producción de dos pigmentos: pioverdina (fluoresceína), que aparece como un pigmento difusible amarillo en agar de Flo (*izquierda*) en luz visible, y piocianina, que aparece como un pigmento azul-turquesa en agar de Tech (*derecha*) en luz visible. Aunque tres especies de bacilos no fermentadores producen pioverdina (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*), sólo una especie (*P. aeruginosa*) produce piocianina.
- H. Tubos de agar de Flo y Tech inoculados con *Pseudomonas aeruginosa* visualizados bajo luz ultravioleta (UV) utilizando una lámpara de Wood. Obsérvese que el tubo de agar de Flo (*a la izquierda*) fluoresce bajo luz UV, mientras que el tubo de agar de Tech (*a la derecha*) no lo hace. Sólo el pigmento de pioverdina, que aumenta haciendo crecer el microorganismo en agar de Tech, fluoresce bajo luz UV.



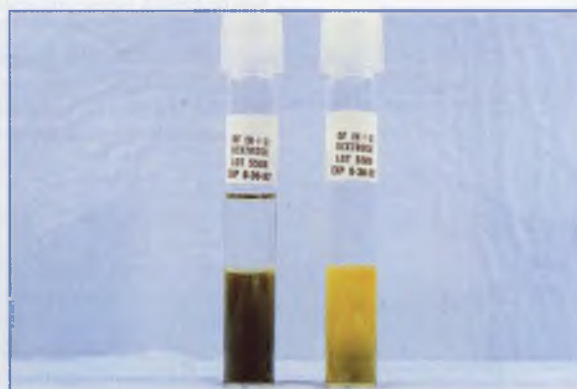
A



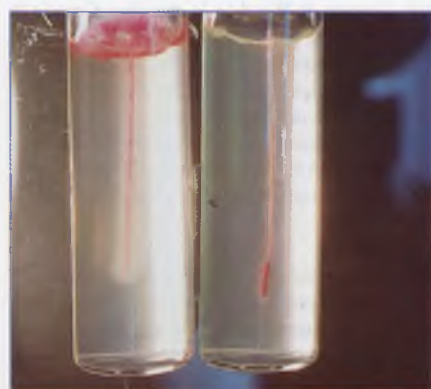
B



C



D



E



F



G



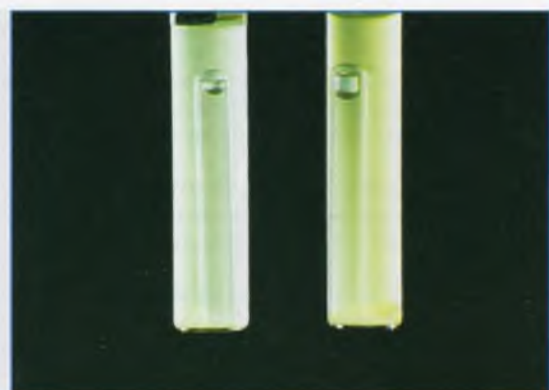
H

PRUEBAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES

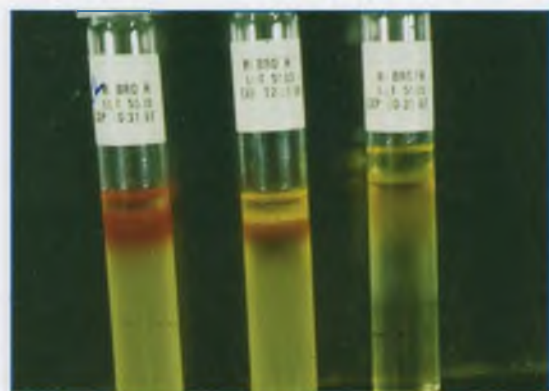
- A. Dos tubos de urea de Christensen que muestran el color rojo fucsia de una prueba positiva (*derecha*) comparados con un control negativo (*izquierda*). Se observa una reacción de ureasa positiva rápida (< 4 horas) con las siguientes especies de bacilos no fermentadores: *Bergeyella zoohelcum*, *Bordetella bronchiseptica*, *Cupriavidus pauculus* y *Oligella ureolytica*.
- B. Dos tubos que muestran reducción de nitrato (*izquierda*) y reducción de nitrito (*derecha*). Ambos tubos contienen un tubo de Durham para demostrar la formación de gas nitrógeno. Obsérvese que se ha formado más gas en el tubo de la derecha lo que indica que se forma cuantitativamente más gas nitrógeno a partir de nitrito que de nitrato durante el mismo período de incubación. La producción de gas tanto a partir de nitrato como de nitrito es típica del grupo *Pseudomonas stutzeri* y *Alcaligenes denitrificans*.
- C. Tres tubos de caldo de infusión de corazón que muestran una reacción de indol positiva (*izquierda*), una reacción de indol anaranjada (*centro*) y una reacción de indol negativa (*derecha*). Las reacciones que se muestran aquí se obtuvieron utilizando el método de extracción de xileno seguido por el agregado de reactivo de Ehrlich (véase protocolo 1-4). Una reacción de indol positiva se nota por la aparición de una banda roja en la interfaz del caldo de triptófano y la capa de xileno. Los bacilos no fermentativos indol-positivos incluyen: *Balneatrix*, *Bergeyella*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Weeksella* y algunos grupos sin nombre de los CDC. Se observa una reacción de indol anaranjada peculiar (*tubo central*) con *Delftia acidovorans* que se debe a la formación de ácido antranílico a partir del triptófano por esta bacteria. Se produce un pigmento anaranjado con el agregado de reactivo de Ehrlich o de Kovac. La reacción puede tardar en desarrollarse más de 1 hora luego del agregado de los reactivos.
- D. Cuatro tubos de medio de descarboxilasa de Møller cubierto con una capa de vaselina. Lectura de izquierda a derecha: lisina, arginina, ornitina y tubo de control desprovisto de aminoácido. Con los bacilos no fermentadores, las pruebas negativas conservan el mismo color que los tubos no inoculados originales, mientras que las reacciones de descarboxilación positivas aparecen violetas más oscuras debido a la formación de aminas alcalinas que producen un pH más alcalino en el tubo. La reacción de lisina descarboxilasa positiva ilustrada aquí ocurre sólo con dos especies de bacilos no fermentadores: *Stenotrophomonas maltophilia* y complejo *Burkholderia cepacia*.
- E. Imagen dividida que muestra dos tubos de agar-esculina observados bajo luz visible (*a la izquierda*) y los dos mismos tubos observados bajo la luz ultravioleta de una lámpara de Wood (*a la derecha*). Cuando la esculina es hidrolizada por un microorganismo, el glucósido esculina se convierte en esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro (citrato férrico) en el medio para formar un pardo oscuro de complejo negro (*segundo tubo desde la izquierda*). Puede ser difícil discernir la formación de un pardo oscuro de pigmento negro si el microorganismo propiamente dicho produce un pigmento pardo o de color profundo. El tubo brillantemente fluorescente del recuadro derecho (*segundo tubo desde el extremo derecho*) muestra la reacción observada con una reacción de esculina negativa. El tubo en el extremo derecho muestra una atenuación pronunciada de la fluorescencia, sobre todo en la porción inclinada, lo que indica que el microorganismo de prueba es capaz de hidrolizar la esculina.
- F. Placa de agar sangre que demuestra el aspecto típico de *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 horas de incubación a 35 °C. Las colonias son grandes con una periferia que se extiende y a menudo son beta-hemolíticas. Las colonias de la parte más importante del crecimiento parecen tener un brillo metálico y un aspecto descamado que a veces se describe como morfología en piel de caimán. En los casos típicos, las colonias semejantes a ésta producen un olor similar a las uvas dulces.
- G. Placa de agar de MacConkey que muestra el crecimiento de dos tipos de colonias. Las colonias violetas oscuras son lactosa positivas y tienen el aspecto típico de *E. coli*. Las colonias lactosa negativas están produciendo un pigmento difusible azul turquesa que se observa mejor en el área de mayor crecimiento. Este es el aspecto típico de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* que están produciendo piocianina.
- H. Placa de agar de MacConkey que demuestra crecimiento de una variedad mucóide de *Pseudomonas aeruginosa* típica de las cepas aisladas del esputo de pacientes con fibrosis quística. Las colonias pueden ser extremadamente mucoides y líquidas. Se pueden ver distintas variantes de colonias que es la presentación típica para estas variantes mucoides de *P. aeruginosa*. Obsérvese que en el área de crecimiento más importante parece que se está desarrollando algo de pigmento de piocianina.



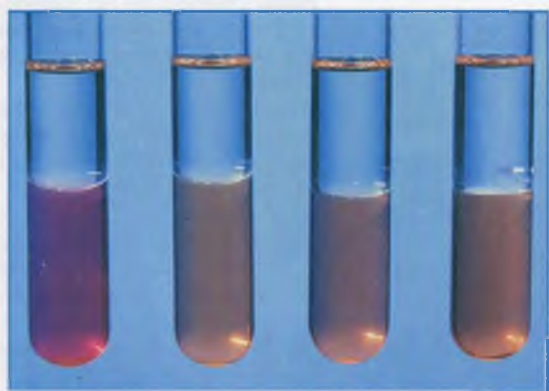
A



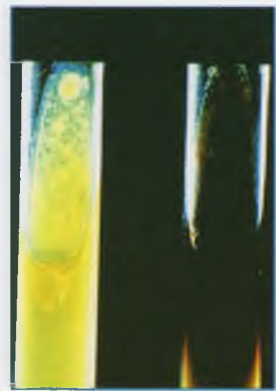
B



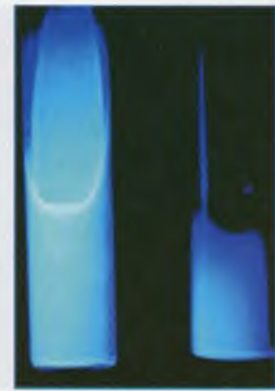
C



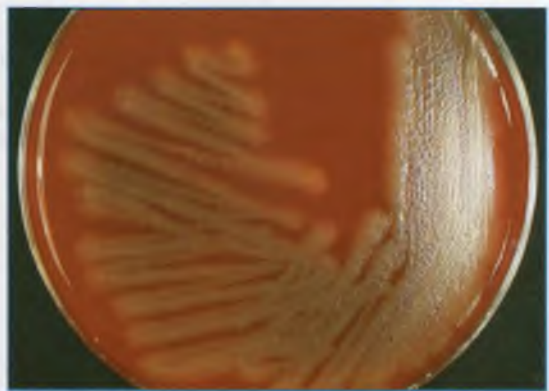
D



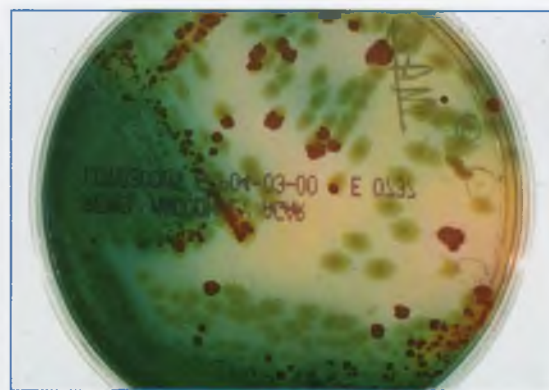
E1



E2



F



G

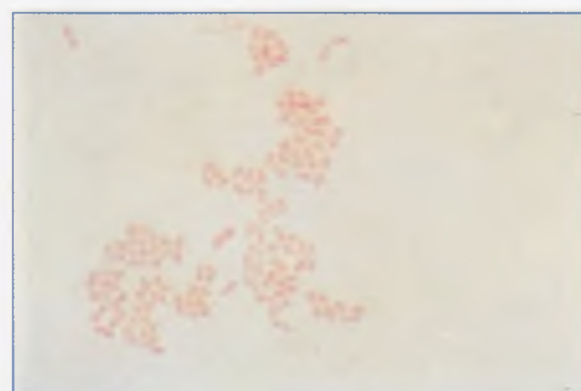
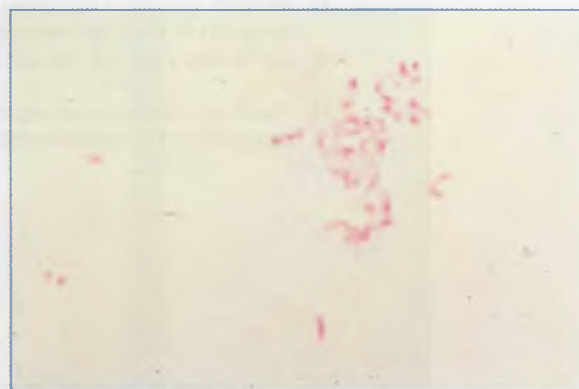
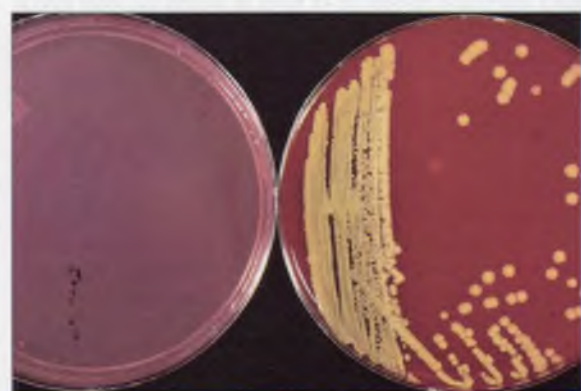
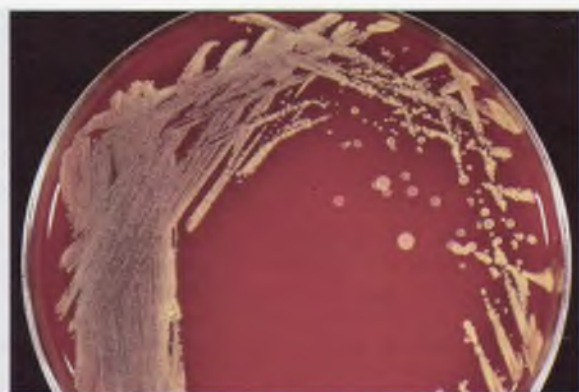


H

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS Y MICROSCÓPICA DE ALGUNOS BACILOS NO FERMENTADORES

Algunas especies de bacilos gramnegativos no fermentadores tienen rasgos característicos que pueden observarse en medios de crecimiento o en preparados con tinción de Gram. El conocimiento de estas funciones puede ser un auxiliar para la identificación correcta de una especie.

- A. *Pseudomonas stutzeri* en medio de agar sangre. Obsérvense las colonias arrugadas y secas características típicas de esta especie. Se debe pensar inmediatamente en *P. stutzeri* cuando un bacilo no fermentador oxidasa positivo produce este tipo de colonia en agar sangre.
- B. Placa de agar sangre que muestra el aspecto amarillo, seco y arrugado de *Pseudomonas luteola*. Las colonias a menudo son adherentes al agar y difíciles de extraer. La morfología de las colonias se asemeja a la de *Pseudomonas oryzae* y *Pseudomonas stutzeri*. Tanto *P. luteola* como *P. oryzae* son oxidasa negativos, mientras que *P. stutzeri* es oxidasa positivo.
- C. Agar de MacConkey (izquierda) y BAP (derecha) inoculados con un cultivo puro de *Brevundimonas vesicularis*. Obsérvese que este microorganismo no crece en agar de MacConkey y aparece como colonias ligeramente rugosas de color amarillo intenso en BAP. Este microorganismo también es sensible a la vancomicina y resistente a la polimixina B, otras características que pueden ayudar a su identificación.
- D. Placa de agar sangre que ilustra el crecimiento de *Stenotrophomonas maltophilia*. El pigmento amarillo mate es característico de esta especie pero a veces puede ser difícil visualizarlo. Las colonias también pueden aparecer de color ocre oscuro a lavanda con la incubación continua, sobre todo si se las deja a temperatura ambiente.
- E. Especies de *Methylobacterium* que crecen en agar dextrosa de Sabouraud. Las colonias aparecen secas y muestran una pigmentación rosada profunda o coral. Estas colonias absorben la luz ultravioleta y aparecen oscuras cuando se mantienen bajo la luz de Wood.
- F. Tinción de Gram de especies de *Methylobacterium* que muestran bacilos gramnegativos característicos que contienen vacuolas.
- G. Tinción de Gram de especies de *Roseomonas* que muestran formas cocoides gramnegativas, con tinción pálida característica, algunas con contenido de vacuolas.
- H. Especies de *Roseomonas* que crecen en agar-dextrosa de Sabouraud. Se presentan como colonias rosadas claras, mucoides y casi líquidas. Al igual que las especies de *Methylobacterium*, las especies de *Roseomonas* crecen mejor en agar de Sabouraud; sin embargo, no absorben la luz ultravioleta ni aparecen oscuras cuando se mantienen bajo una lámpara de Wood.



MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS Y MICROSCÓPICA DE ALGUNOS BACILOS NO FERMENTADORES
(CONTINUACIÓN)

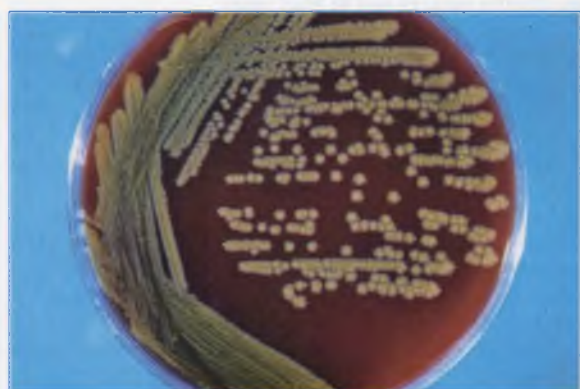
- A. Placa de agar sangre que muestra el crecimiento de *Alcaligenes faecalis* después de 48 horas de incubación a 35 °C. Las colonias son blancas y brillantes; en los cultivos más viejos las colonias tienden a propagarse en el borde externo de las colonias y tornan verde el agar. Esta especie produce un olor frutal típico que a veces se describe como similar al de las manzanas verdes.
- B. Placa de agar de MacConkey que muestra el crecimiento de *Rhizobium radiobacter*. Aun cuando estas bacterias son no fermentadoras, oxidan rápidamente la lactosa y, en consecuencia, aparecen como colonias de color rosado y extremadamente mucoides en agar de MacConkey. Estos microorganismos pueden confundirse con facilidad con un fermentador lactosa-positivo; sin embargo, son oxidasa positivos, lo que excluye automáticamente a cualquier miembro de las enterobacterias.
- C. Placa de agar sangre que muestra el crecimiento de *Chryseomonas indologenes*. Las colonias tienen un color amarillo intenso a anaranjado después de 48 horas de incubación sobre todo si son incubadas a 30 °C. Las colonias tienen un aspecto amarillo intenso a anaranjado después de 48 horas de incubación sobre todo si son incubadas a 30 °C. Fenotípicamente, estos microorganismos son difíciles de distinguir de *Chryseomonas gleum* y algunos laboratorios deciden informar estas cepas como *C. indologenes/gleum*.
- D. Placa de agar sangre que muestra el crecimiento característico de *Myroides odoratus*. Las colonias son amarillas y extendidas. La mayoría de las cepas muestran un olor frutal característico similar al de *Alcaligenes faecalis*.
- E y F. Una prueba útil para distinguir entre las especies de *Neisseria* y las especies de *Moraxella* es hacer crecer a los microorganismos en agar sangre alrededor de un disco de penicilina. Ambos microorganismos son sensibles a la penicilina y demostrarán una zona de inhibición alrededor del disco (E). Después de la incubación durante toda la noche, se puede realizar una tinción de Gram en las colonias tomadas del borde de las zonas de inhibición. Las especies de *Neisseria* son cocos verdaderos y en presencia de concentraciones subinhibidoras de penicilina se siguen tiñendo como diplococos gramnegativos (lado izquierdo, F). Las especies de *Moraxella* son cocobacilos y en presencia de concentraciones subinhibidoras de penicilina forman células extrañas con forma de bastones (lado derecho, F).
- G. Placas de agar sangre (izquierda) y agar de MacConkey que muestran el crecimiento de *Paracoccus yeei* (grupo EO-2 de los CDC) después de 72 horas de incubación a 30 °C. Las colonias aparecen blancas y tienen un aspecto mucoso. En agar de MacConkey tienen un color ligeramente rosado.
- H. Tinción de Gram de *Paracoccus yeei* (grupo EO-2 de los CDC) preparada del cultivo en caldo. Estos microorganismos se tiñen periféricamente y dan el aspecto de células con "forma de O".



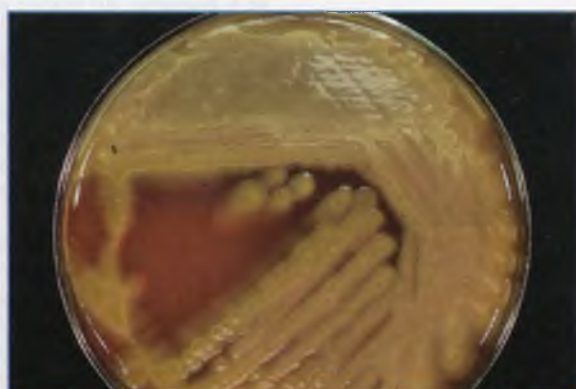
A



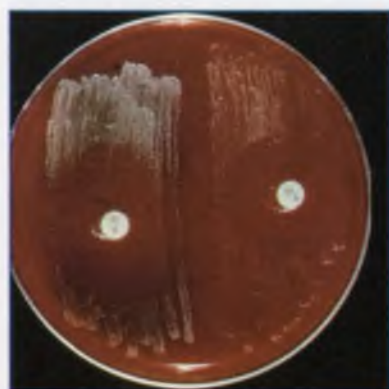
B



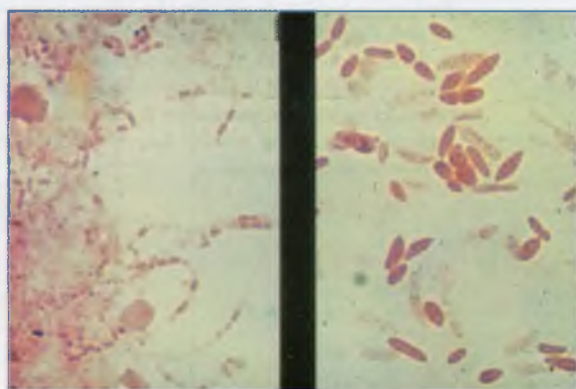
C



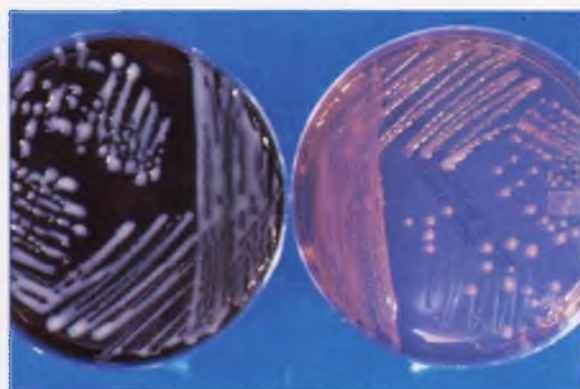
D



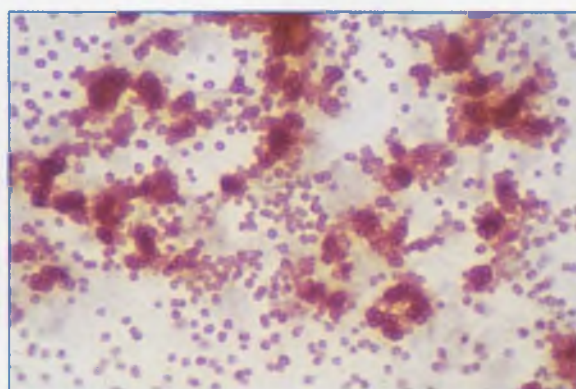
E



F



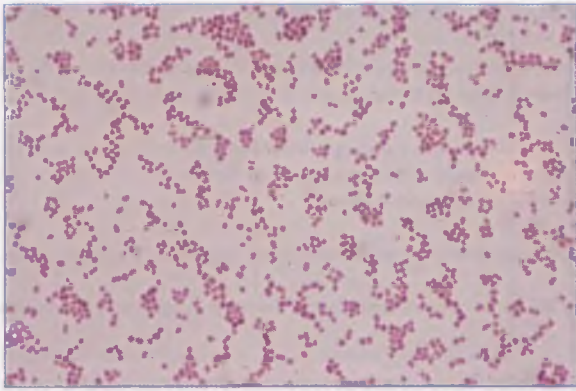
G



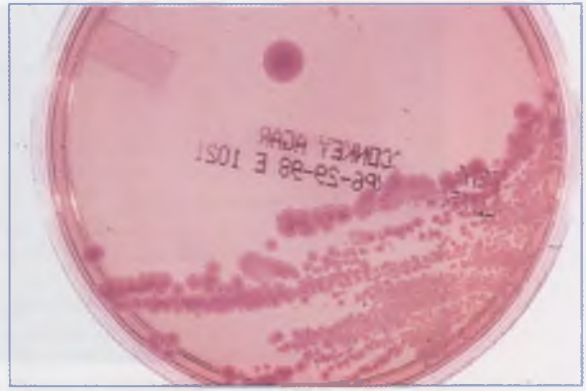
H

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS Y MICROSCÓPICA DE ALGUNOS BACILOS NO FERMENTADORES (CONTINUACIÓN)

- A. Tinción de Gram que muestra cocobacilos gramnegativos. Las especies de *Acinetobacter* y *Moraxella* son los bacilos no fermentadores que tienen característicamente esta morfología de tinción. El frotis que se muestra aquí se hizo de un cultivo en caldo de *A. baumannii*. Las especies de *Acinetobacter* tienden a retener el violeta de genciana (cristal violeta) y pueden aparecer como grampositivas en algunos preparados con tinción de Gram, sobre todo los tomados directamente de frascos de hemocultivo positivos.
- B. *Acinetobacter baumannii* en agar de MacConkey que muestra un color rosado a lavanda claro típico de esta especie. A menudo se puede observar una pigmentación rosada, particularmente notable en las colonias que crecen en agar EMB, donde se describe como color "azul aciano".
- C. Algunos acinetobacteres que oxidan la glucosa pueden producir un cambio de color pardo singular del agar-infusión de corazón con tirosina o el agar sangre en el que se incorpora glucosa. Este fenómeno también se puede observar en los agares de MacConkey y de Mueller-Hinton. Aquí se muestra un aislamiento clínico de *A. baumannii* que produce un pigmento difusible pardo en agar de MacConkey.
- D. Tiras de API 20 NE que muestran las reacciones a las 24 horas (*arriba*) y a las 48 horas (*abajo*). Obsérvese que las ocho primeras pruebas (lectura de izquierda a derecha) son reacciones colorimétricas convencionales, mientras que las 12 pruebas restantes son reacciones de asimilación de carbono que se leen como positivas si hay turbidez y negativas en ausencia de turbidez. Los que utilicen este sistema deben observar que la tira es incubada a 30 °C y no a los 35 °C habituales utilizados para la mayoría de los otros equipos de identificación comerciales. (Fotografiado por Leon J. LeBeau, University of Illinois en Chicago).
- E. Sistema Remel Uni-N/F que ilustra la placa circular que contiene 11 pocillos periféricos sellados de forma independiente y un pocillo central que contiene medio para detectar la producción de indol y sulfuro de hidrógeno. El tubo GNF estrangulado (*segundo tubo desde la izquierda*) se utiliza para la detección de fermentación de glucosa y gas nitrógeno (debajo del estrangulamiento) y la producción de fluoresceína sobre la porción inclinada (por encima del estrangulamiento). El tubo 42P no estrangulado (*primer tubo desde la izquierda*) se utiliza para evaluar el crecimiento a 42 °C y la producción de pigmento de pirocianina.
- F. El sistema Remel RapID NF Plus consiste en una bandeja de plástico que contiene 10 pocillos de reacción. Siete de los pocillos de reacción (4 a 10) son bifuncionales y contienen dos pruebas separadas en la misma cavidad. Este sistema es inoculado con una suspensión importante del microorganismo de prueba e incubado durante 4 horas a 35 °C. Luego de la incubación, las pruebas bifuncionales se puntúan primero antes del agregado del reactivo, lo que proporciona el resultado de la primera prueba (*hilera superior*). Las mismas cavidades se puntúan nuevamente después del agregado del reactivo para proporcionar el resultado de la segunda prueba (*hilera inferior*). Las reacciones obtenidas con estas 17 pruebas más oxidasa proporcionan 18 puntuaciones de prueba.



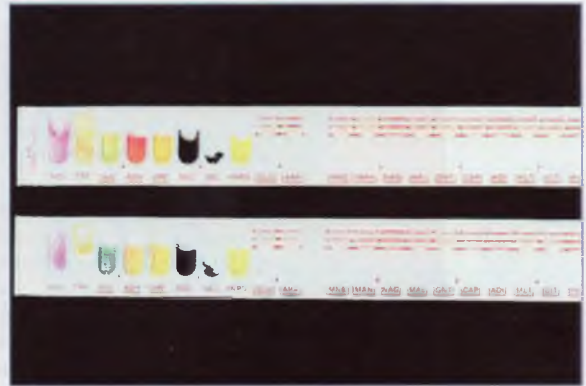
A



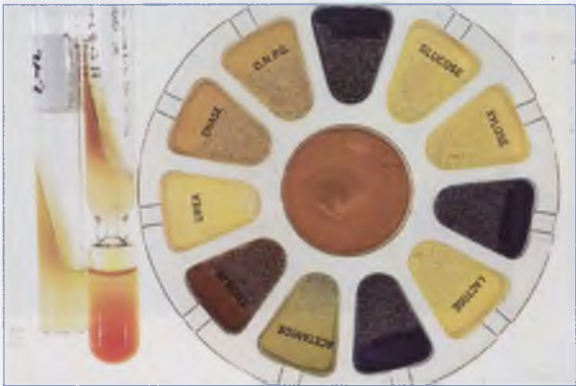
B



C



D



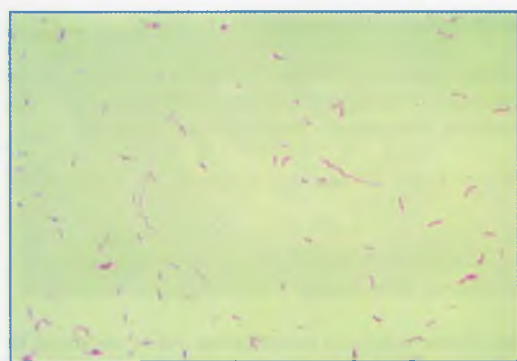
E



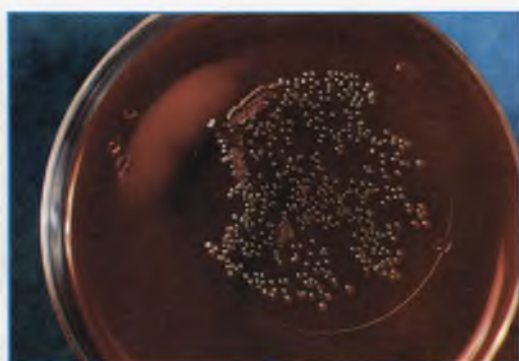
F

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER*

- A. Tinción de *Campylobacter jejuni* que muestra bacilos gramnegativos pleomorfos con formas cortas, curvas y espiraladas. Obsérvese que algunas células se unen y adoptan formas en alas de gaviotas y en "S".
- B. *C. jejuni* que crece en placa de agar para *Brucella* no selectivo luego del aislamiento de las heces utilizando la técnica de filtro de membrana (descrita en el texto). Obsérvese que el crecimiento ha ocurrido sólo en el área de la placa subyacente al lugar donde se ha colocado el filtro.
- C. Vista cercana de *C. jejuni* en agar sangre, que muestra colonias elevadas, blanco grisáceas y algo mucoides.
- D. Crecimiento de *C. jejuni* en agar Campy BAP que muestra la tendencia del microorganismo a crecer a lo largo de las líneas de siembra en estría.
- E. Tubos que muestran la reacción de hipurato rápida. Se desarrolla un color violeta con el agregado de ninhidrina cuando el hipurato ha sido hidrolizado para formar glicina y ácido benzoico (*tubo positivo a la izquierda comparado con el control negativo a la derecha*). De las especies de *Campylobacter*, sólo *C. jejuni* da una reacción de hipurato positiva.
- F. Placa de agar sangre para *Brucella* que muestra el crecimiento de *C. jejuni* alrededor de los discos de cefalotina y ácido nalidíxico. Obsérvese que con *C. jejuni* se forma una zona de inhibición alrededor del disco de ácido nalidíxico (*derecha*), que indica que esta especie es sensible al ácido nalidíxico pero resistente a la cefalotina. Esta prueba es fácil de realizar y permite la identificación presuntiva de *C. jejuni*.
- G. Reacciones del pico de flauta en agar-triple azúcar-hierro (TSI) que muestran las reacciones de sulfuro de hidrógeno (H_2S) de varias especies. El tubo del extremo izquierdo muestra la ausencia de H_2S característica de *C. jejuni*, *C. fetus* subespecie *fetus* y *C. fetus* subespecie *venerealis*. Los tubos 2, 4 y 5 (*lectura desde la izquierda*) muestran una reacción fuerte en la profundidad, característica de *C. sputorum* biovariedad *bubulus*, *C. sputorum* biovariedad *fecalis* o *C. sputorum* biovariedad *sputorum*. El tubo 3 muestra una reacción fuerte del agar inclinado, característica de *C. mucosalis*. Leyenda: "Reacciones diferentes en los picos de flauta de agar TSI. Crecimiento en atmósfera para campilobacterias. Especies de *Campylobacter*".
- H. Corte tisular con tinción argéntica de mucosa gástrica superficial que demuestra agrupamientos de bacilos que se tiñen de negro azulado a lo largo del revestimiento epitelial, compatibles con las formas bacilares de *Helicobacter pylori*. Cuando se observa en un preparado con tinción de Gram, las células individuales son largas, gruesas y curvas.



A



B



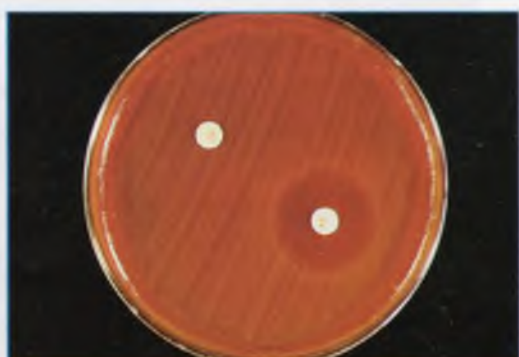
C



D



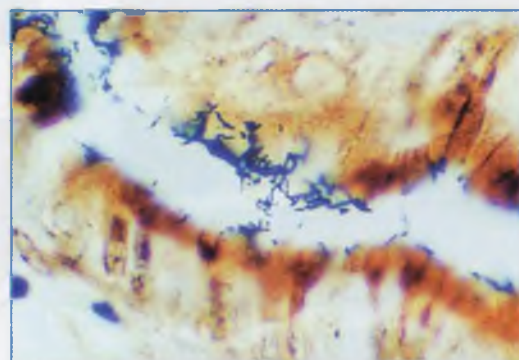
E



F



G



H

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE *VIBRIO CHOLERA*E Y OTRAS ESPECIES DE *VIBRIO*

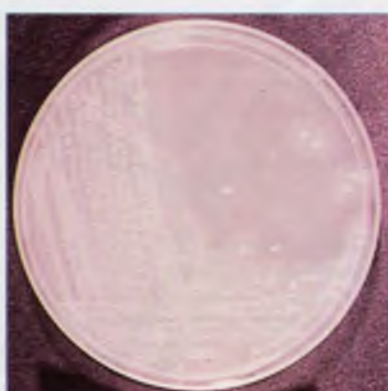
- A. Aspecto de *Vibrio cholerae* en agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS). Las colonias amarillas son el resultado de la utilización de citrato y la formación de ácido a partir de la utilización de la sacarosa en el medio. La aparición de colonias amarillas en este medio es prácticamente diagnóstico de *V. cholerae*.
- B. Colonias de *V. parahaemolyticus* que crecen en agar TCBS que muestran el aspecto gris verdoso semi-translúcido característico.
- C. Agar gelatina con colonias opacas blancas de *V. cholerae*. Obsérvese la opalescencia del agar adyacente a las colonias, que indica la hidrólisis y la desnaturalización de la gelatina.
- D. Tinción de Gram de *V. vulnificus* que muestra las células bacterianas gramnegativas con la morfología en bacilos curvos típica de las especies de *Vibrio*.
- E. Prueba de la cuerda positiva con *V. cholerae*. Cuando se mezclan colonias de *V. cholerae* en una gota de desoxicolato de sodio al 0,5%, producen una suspensión viscosa que puede ser transformada en una cuerda cuando se eleva el ansa inoculadora lentamente desde el costado.
- F. Prueba de aglutinación en portaobjetos positiva para *V. cholerae* utilizando antisuero O polivalente.
- G. Placa de agar sangre que muestra las colonias intensamente β -hemolíticas relativamente grandes del biotipo El Tor de *V. cholerae*.
- H. Prueba de aglutinación de eritrocitos de pollo. Las cepas clásicas de *V. cholerae* no aglutinan los eritrocitos de pollo (*arriba*), a diferencia del biotipo El Tor (*abajo*), que puede aglutinarlos.



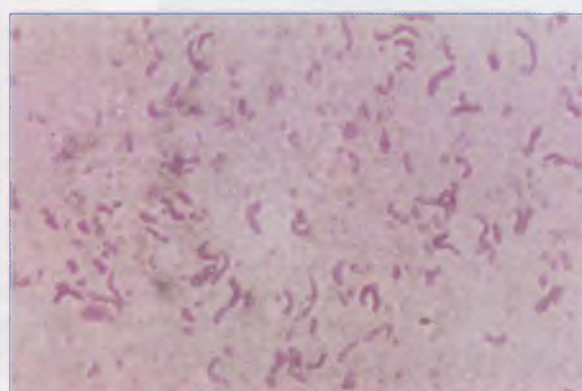
A



B



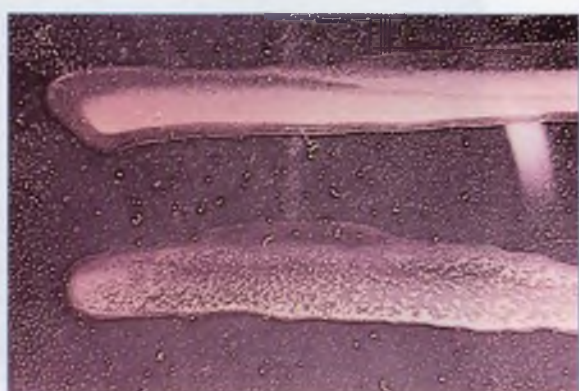
C



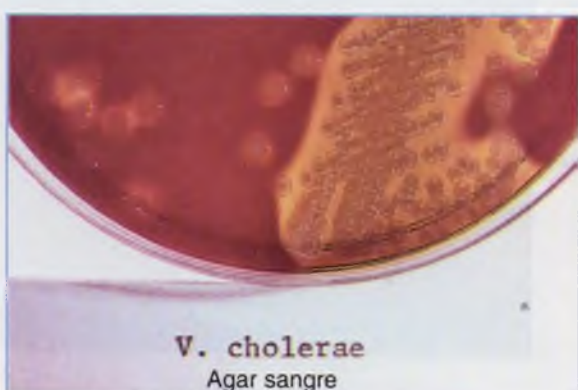
D



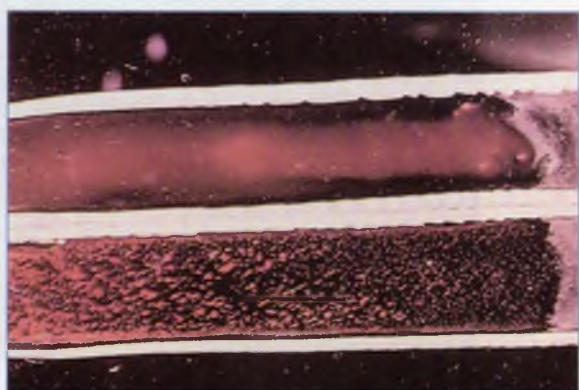
E



F



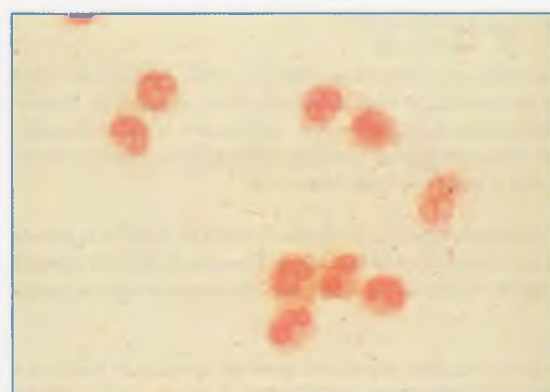
G



H

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *HAEMOPHILUS*

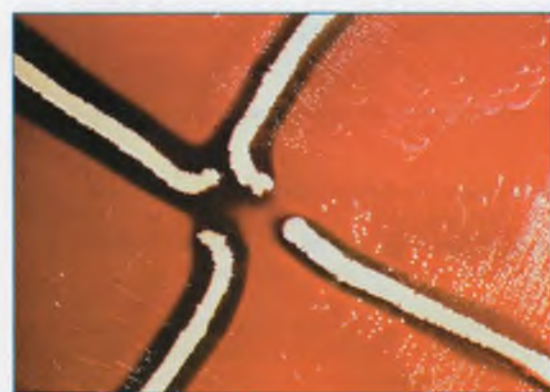
- A. Frotis con tinción de Gram de líquido cefalorraquídeo centrifugado que muestra células polimorfonucleares y bacilos gramnegativos dispersos de *Haemophilus influenzae*. Estos microorganismos característicamente aparecen como cocobacilos pequeños que se tiñen poco en las tinciones de Gram de las muestras clínicas. En ocasiones, se observan bacilos más largos y filamentosos.
- B. Crecimiento de colonias grises, lisas y húmedas de *H. influenzae* tipo b en agar chocolate después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Este medio contiene hematina (factor X) y está enriquecido con otros factores, como NAD (factor V), que permiten el crecimiento de *Haemophilus* y otros microorganismos con requerimientos nutricionales especiales.
- C. Crecimiento satélite de *Haemophilus* alrededor de estrías de *Staphylococcus aureus* en agar sangre de carnero. El factor X o hemina es aportado por eritrocitos de carnero lisados que rodean a la estría de estafilococo, mientras que los propios estafilococos proporcionan el factor V o NAD. Estos factores permiten que las pequeñas colonias con forma de gota de *Haemophilus* crezcan adyacentes a la estría del estafilococo.
- D. Prueba de factores de crecimiento para la identificación de *H. influenzae*. Se inocula el microorganismo en una placa de agar tripticasa soja o agar infusión de encéfalo y corazón y se colocan discos que contienen factor X y factor V en proximidad uno de otro sobre la superficie de la placa inoculada. Después de la incubación en un medio enriquecido con CO₂ a 37 °C, se determinan los requerimientos de factores observando el patrón de crecimiento del microorganismo en relación con los dos discos. En este cuadro, se observa el crecimiento entre los discos de factor X y factor V, lo que indica que el microorganismo requiere tanto el factor X como el factor V exógenos para su crecimiento.
- E. Prueba de factor de crecimiento para *H. influenzae*. Se inocula el microorganismo como se describió para D, pero en esta fotografía se colocan tiras de papel de filtro impregnadas con el factor X, factor V y con ambos factores sobre la siembra del inóculo. Después de la incubación en un medio enriquecido con CO₂ a 35-37 °C, se observa crecimiento alrededor de la tirita del factor V y alrededor de la tirita del factor XV, pero no alrededor de la tirita del factor X. Este patrón de crecimiento indica que el microorganismo necesita sólo factor V para su crecimiento.
- F. Prueba de agar ALA-porfirina. Se trata de un método alternativo para determinar los requerimientos de factor X de las cepas de *Haemophilus*. El medio de agar contiene ácido δ -aminolevulínico (ALA). Se inoculan los microorganismos en el medio y, después de una incubación durante toda la noche a 35-37 °C en un medio enriquecido con CO₂, se observa el crecimiento bajo una luz de Wood (ultravioleta). Si el crecimiento de la colonia da fluorescencia "rojo ladrillo", el microorganismo es capaz de sintetizar factor X (hemina) a partir de ALA y no necesita factor X exógeno. Este cuadro muestra tanto el crecimiento de *H. influenzae* (izquierda), con su prueba de ALA-porfirina negativa (necesita hemina exógena para su crecimiento), como de *H. parainfluenzae* (derecha), con su prueba de ALA-porfirina positiva (sintetiza hemina a partir de ALA).
- G. Método del disco de ALA-porfirina. Este cuadro también muestra la prueba de ALA-porfirina, pero en este enfoque, se utiliza un disco impregnado con ácido δ -aminolevulínico. Se humedece el disco con agua y se frota algo del crecimiento de las colonias sobre la superficie del disco. Después de una incubación durante 4 horas a 35-37 °C, se observan los discos en la oscuridad bajo luz de Wood. Si el disco da fluorescencia "rojo ladrillo", el microorganismo es capaz de sintetizar su propio factor X. Si no se observa fluorescencia, el microorganismo requiere factor X exógeno. En este cuadro, *H. influenzae* (izquierda) no muestra fluorescencia (requiere factor X exógeno) mientras que *H. parainfluenzae* (derecha) muestra fluorescencia (sintetiza factor X a partir de ALA).
- H. Reacciones de reducción de nitrato y biotipificación para *H. influenzae* biotipo I. Las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* reducen el nitrato a nitrito y pueden agruparse en distintos tipos por sus reacciones en tres pruebas bioquímicas: producción de indol, ornitina descarboxilasa y ureasa. Este cuadro muestra las reacciones de nitrato y biotipificación de *H. influenzae* biotipo I. Las pruebas que se muestran (izquierda a derecha) son una prueba de reducción de nitrato positiva, producción de indol en caldo de triptona luego de la extracción con xileno (positiva), base de caldo descarboxilasa de Moeller (negativa), caldo de ornitina descarboxilasa de Moeller (positiva) y una porción inclinada de urea (positiva).



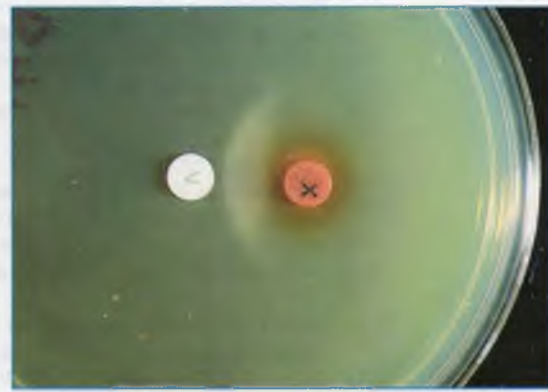
A



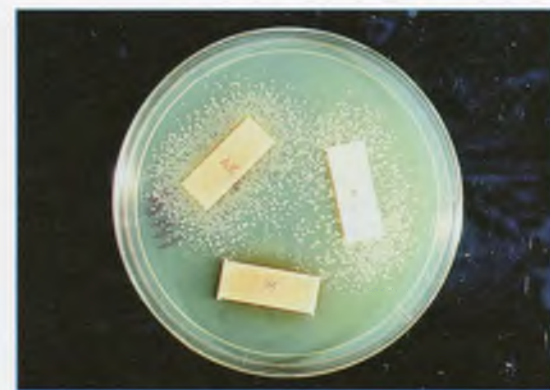
B



C



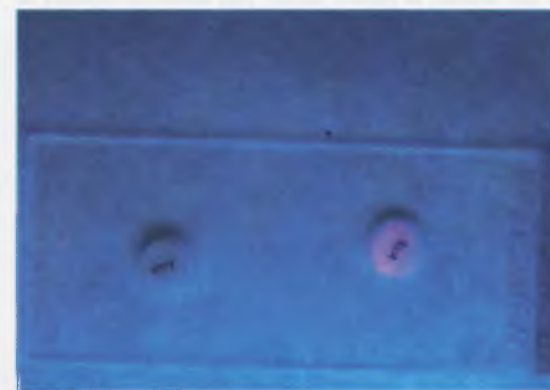
D



E



F



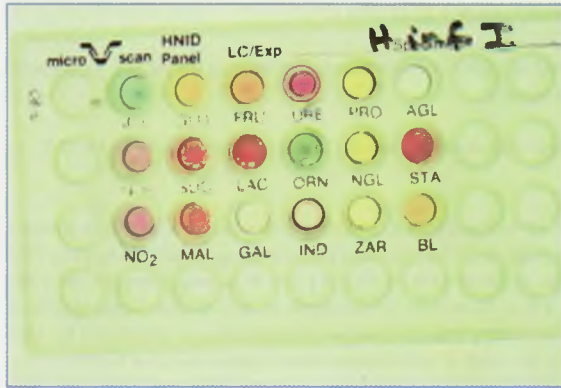
G



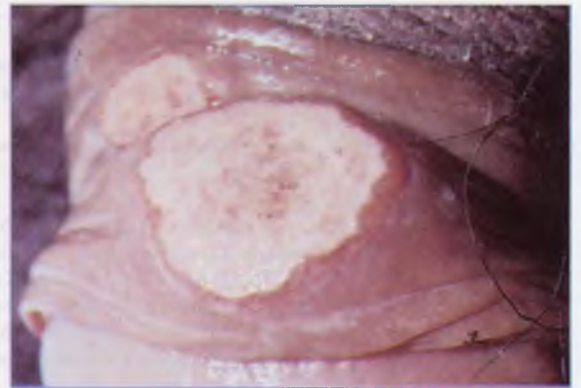
H

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *HAEMOPHILUS* (CONTINUACIÓN)

- A. Panel para identificación de *Haemophilus-Neisseria* MicroScan (HNID) (Dade-MicroScan, West Sacramento, CA). El sistema de formato de microtitulación manual identifica tanto especies de *Haemophilus* como de *Neisseria* y proporciona designaciones de biotipo para *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Esta figura muestra un panel inoculado con *H. influenzae* biotipo I (ureasa [URE] positivo, ornitina descarboxilasa [ODC] positivo e indol [IND] positivo). (Cortesía de Dade-MicroScan).
- B. Una lesión de chancroide sobre los genitales femeninos externos. Si bien las lesiones de chancroide pueden asemejarse a los chancros de la sífilis, suelen ser dolorosas y blandas, mientras que las de la sífilis primaria habitualmente son indoloras e induradas. El agente etiológico del chancroide, *Haemophilus ducreyi*, puede ser cultivado a partir de estas lesiones.
- C. Panel RapID NH (Remel) inoculado con *H. ducreyi*. El panel superior es antes del agregado de reactivos a las tres celdas bifuncionales de la cubeta (PO4/NO₂, ORN/NO₃ y URE/IND), mientras que el panel inferior es después del agregado de reactivos para el desarrollo de las reacciones de NO₂, NO₃ e IND. Las únicas reacciones positivas observadas con *H. ducreyi* en el panel RapID NH son la reacción de fosfatasa (arriba, octava reacción desde la izquierda [amarillo]) y la reacción de reducción de nitrato reductasa (abajo, novena reacción desde la izquierda [rojo]).
- D. Frotis con tinción de Gram en el que se observan *Haemophilus aphrophilus*, cocobacilos pequeños de coloración pálida.
- E. Crecimiento de *H. aphrophilus* en agar sangre de carnero (izquierda) y agar chocolate (derecha) después de 48 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. *H. aphrophilus* es la única especie de *Haemophilus* que no necesita los factores X o V exógenos y, en consecuencia, es capaz de crecer en agar sangre de carnero. Las colonias son característicamente pequeñas y tienen una ligera pigmentación amarillenta.
- F. *Haemophilus paraphrophilus* en agar sangre de carnero (izquierda) y agar chocolate (derecha) después de 48 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. *H. paraphrophilus* es bioquímicamente idéntico a *H. aphrophilus*, pero necesita el factor V para su crecimiento. En consecuencia, *H. paraphrophilus* crece en agar chocolate (derecha) pero no en agar sangre de carnero (izquierda).
- G. Pruebas bioquímicas para la identificación de *H. aphrophilus*. Los tubos que se muestran en esta fotografía (izquierda a derecha) incluyen caldo de nitrato, caldo de indol tripton, caldo de base de descarboxilasa de Moeller, caldo de lisina descarboxilasa de Moeller, caldo de ornitina descarboxilasa de Moeller y una porción inclinada de agar urea. Como se muestra aquí, *H. aphrophilus* es nitrato positivo, pero negativo para indol, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa y ureasa.
- H. Pruebas rápidas de utilización de hidratos de carbono para *H. aphrophilus*. En este procedimiento, se prepara una solución balanceada de sales-rojo fenol (BSS) en una serie de tubos en alícuotas de 0,10 mL. Se agrega una única gota de solución de hidratos de carbono esterilizada por filtro (0,20% p/v) a cada tubo. Se prepara una suspensión importante del microorganismo en la BSS sin agregar hidratos de carbono y se agrega una única gota de esta suspensión a cada uno de los tubos de BSS-hidrato de carbono. Después de 4 horas de incubación a 35-37 °C, se interpretan las reacciones. Con la producción de ácido, el indicador de rojo fenol vira de rojo a amarillo. En este marco, los tubos (izquierda a derecha) son la suspensión de microorganismos BSS (sin agregado de hidratos de carbono), BSS sin glucosa (G), maltosa (M), sacarosa (S), lactosa (L), manitol (MN), xilosa (X) y manosa (MA). Como puede observarse a partir de estas reacciones, *H. aphrophilus* produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y manosa, pero no de manitol o xilosa. Los detalles de este procedimiento, que también se pueden utilizar para identificar especies de *Neisseria*, se presentan en el protocolo 11-1.



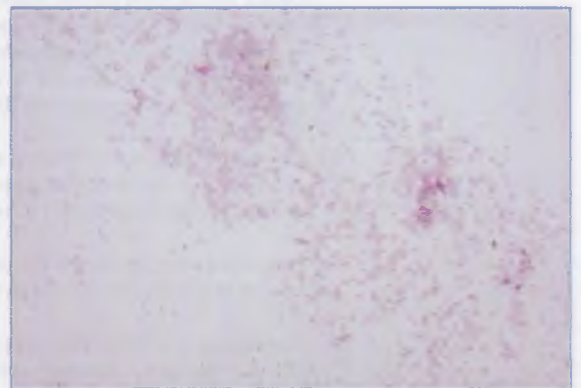
A



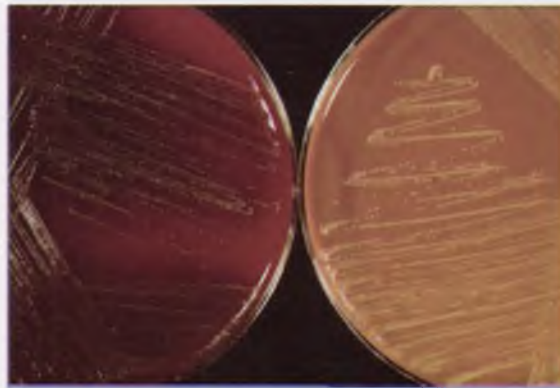
B



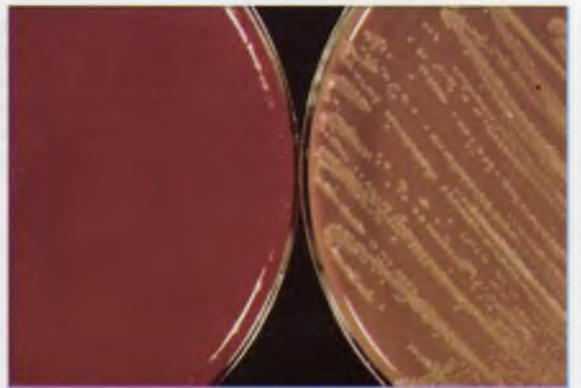
C



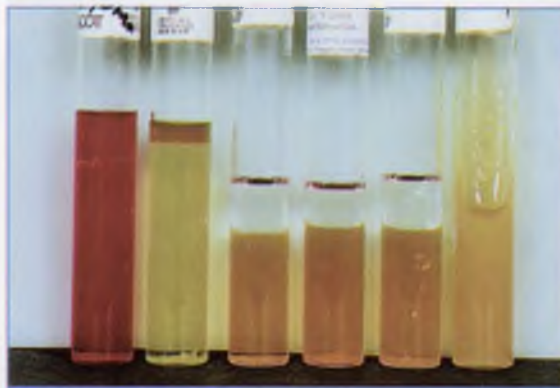
D



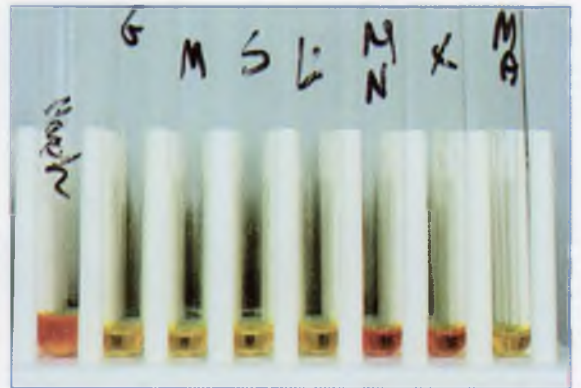
E



F



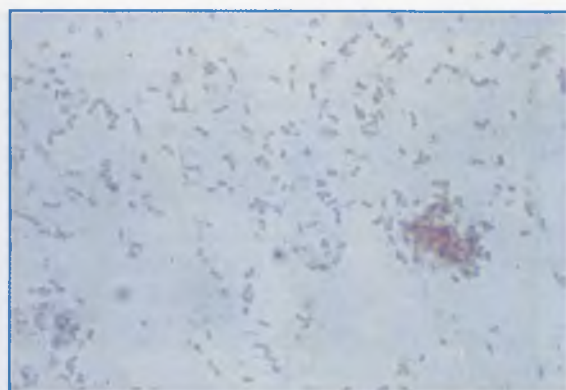
G



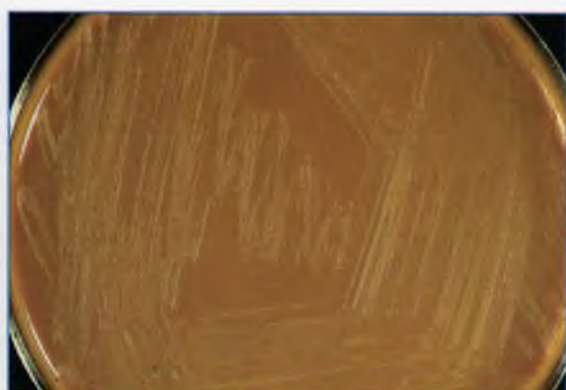
H

ESPECIES DE *ACTINOBACILLUS*, *CARDIOBACTERIUM* Y *EIKENELLA*

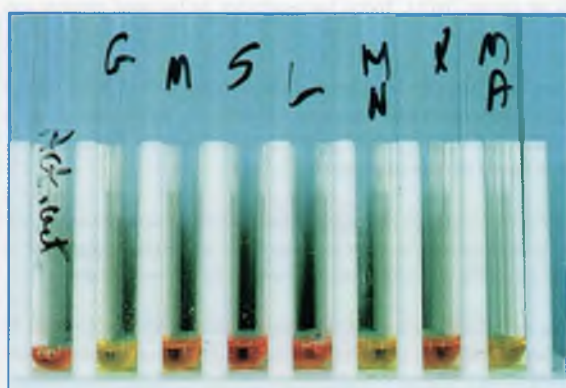
- A. Frotis con tinción de Gram de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que muestra los bacilos y cocobacilos gramnegativos de tinción pálida de esta especie.
- B. *A. actinomycetemcomitans* que crece en agar chocolate después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%.
- C. Pruebas rápidas de utilización de hidratos de carbono para *A. actinomycetemcomitans*. Como se muestra aquí, produce ácido a partir de glucosa (G), manitol (MN) y manosa (MA), pero no a partir de maltosa (M), sacarosa (S), lactosa (L) o xilosa (X). La falta de producción de ácido a partir de lactosa, junto con una prueba de catalasa positiva, ayuda a diferenciar a *A. actinomycetemcomitans* de *H. aphrophilus* (véase lámina en color 9-2H). Las reacciones de reducción de nitrato, lisina y ornitina descarboxilasa y ureasa son las mismas tanto para *A. actinomycetemcomitans* como para *H. aphrophilus* (véase lámina en color 9-2G).
- D. Extendido teñido con Gram de *Cardiobacterium hominis*. Estos microorganismos a menudo son gramvariables, pero se están tiñendo uniformemente como gramnegativos en esta fotografía. En general, las células de *C. hominis* son más largas que las otras bacterias HACEK y muestran un pleomorfismo variable (p. ej., células con extremos puntiagudos o tumefactos, células con forma de lágrima y pesa). También se aprecia en este cuadro la formación de una empalizada característica por parte de las células en las disposiciones en "cerca" y el agrupamiento de las células para formar rosetas compactas.
- E. Crecimiento de *C. hominis* en agar sangre de carnero después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Las colonias de este microorganismo son pequeñas, opacas y brillantes. Algunas cepas también pueden deprimir el agar, como *E. corrodens*.
- F. Frotis con tinción de Gram de *Eikenella corrodens*. Las células aparecen como bacilos gramnegativos "regulares" y no son cocobacilares ni pleomorfos como otros miembros de las bacterias HACEK.
- G. Crecimiento de *E. corrodens* en agar sangre de carnero después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. La luz incidente sobre la placa en esta fotografía demuestra la depresión de la superficie de agar que es característica de la mayoría de las cepas. También se pueden identificar cepas que no tienen depresión y se pueden observar en el mismo cultivo tanto cepas con depresión como sin ella.
- H. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. corrodens*. Los tubos que se muestran aquí son (de izquierda a derecha) caldo de nitrato, caldo de indol triptona, base de descarboxilasa de Moeller, caldo de lisina descarboxilasa de Moeller, caldo de ornitina descarboxilasa de Moeller y porción inclinada de urea. *E. corrodens* es nitrato positivo, ureasa negativo y es el único miembro HACEK que es tanto lisina como ornitina descarboxilasa positivo. *E. corrodens* también difiere de las otras bacterias HACEK en que no produce ácido a partir de hidratos de carbono de forma fermentativa ni oxidativa.



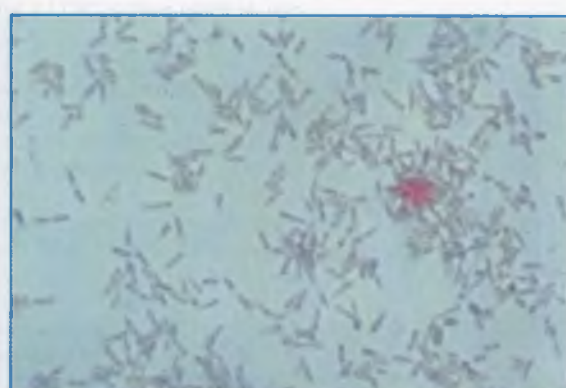
A



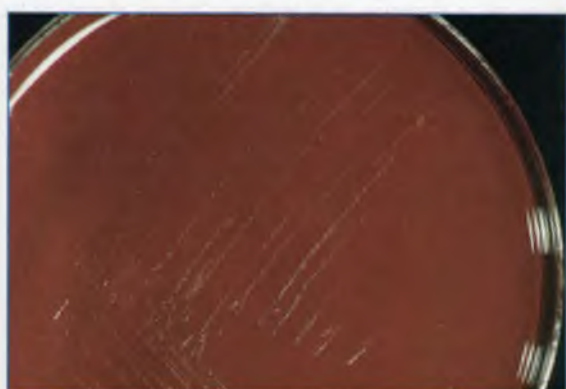
B



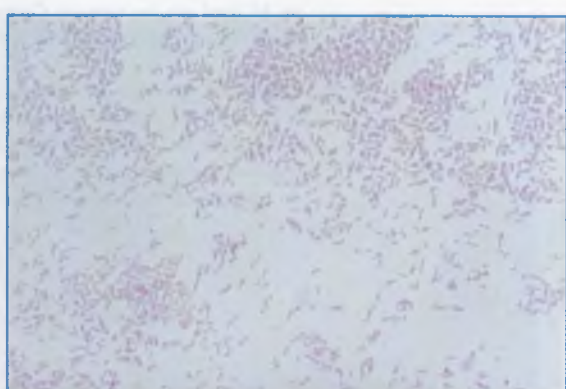
C



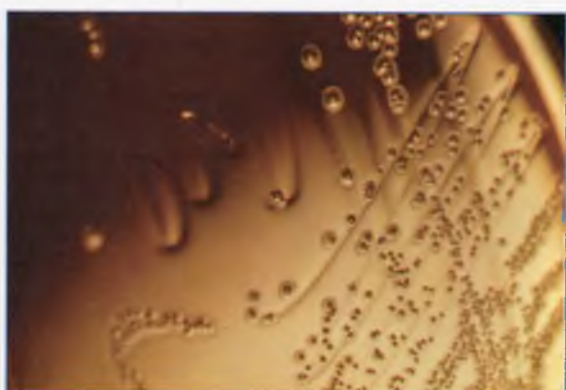
D



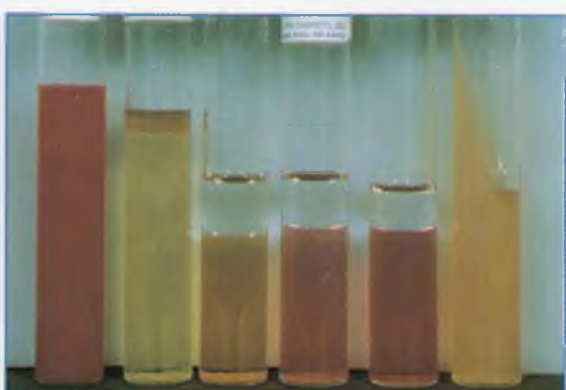
E



F



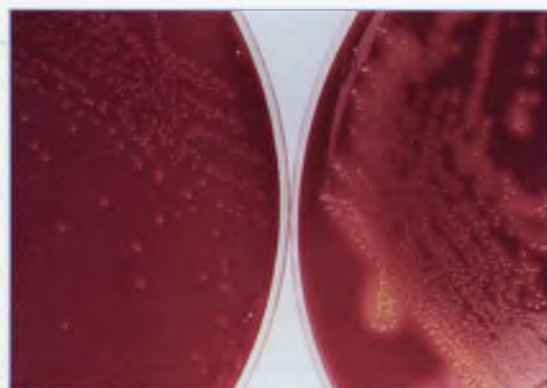
G



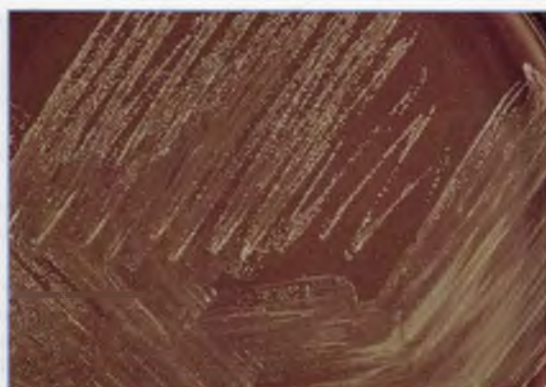
H

ESPECIES DE *KINGELLA*, *CAPNOCYTOPHAGA* Y *DYSGONOMONAS*

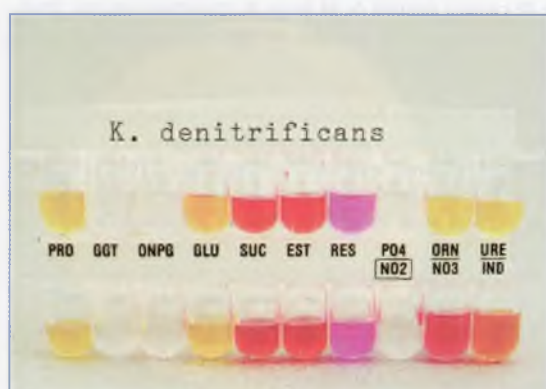
- A. *Kingella kingae* en agar sangre de carnero. La placa de la izquierda es después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7% mientras que la placa de la derecha es la misma cepa después de 48 horas de incubación. La β-hemólisis producida por este microorganismo puede ser evidente sólo por debajo e inmediatamente adyacente a la colonia después de 24 horas de incubación, pero después de 48 horas de incubación se la aprecia mejor.
- B. Colonias de *Kingella denitrificans* en agar chocolate después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Las colonias de este microorganismo se asemejan a los pequeños tipos de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*.
- C. Panel RapID NH (Remel) inoculado con *K. denitrificans*. En esta fotografía se muestran dos paneles idénticos. El panel superior es antes del agregado de los reactivos de nitrato e indol a los pocillos apropiados de la cubeta bifuncional. Las reacciones positivas en el panel para este microorganismo oxidasa positivo, catalasa negativo incluyen las pruebas de prolil aminopeptidasa (PRO), fermentación de glucosa (GLU) y reducción de nitrito positiva (NO₂) y reducción de nitrato (NO₃). Todos los resultados de las otras pruebas son negativos.
- D. Especies de *Capnocytophaga* aisladas en humanos después de 48 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7% en agar sangre de carnero. Esta fotografía muestra la morfología característica de las colonias de estos microorganismos e ilustra la banda de "motilidad deslizante" en la periferia de las colonias. Hacia los centros de las áreas de crecimiento, las colonias tienen un aspecto moteado.
- E. Frotis con tinción de Gram de especies de *Capnocytophaga* humanas. Estos microorganismos característicamente aparecen como bacilos fusiformes gramnegativos ligeramente curvos con extremos puntiagudos. A este respecto, estas bacterias se asemejan a la especie anaerobia estricta *Fusobacterium nucleatum*.
- F. Colonias de *Capnocytophaga canimorsus* en agar sangre de carnero después de 5 días de incubación a 35 °C en CO₂ al 5-7%. Las colonias de estas especies son íntegras, circulares, convexas y brillantes, como se muestran aquí.
- G. Frotis con tinción de Gram de *C. canimorsus*. Esta fotografía muestra las células fusiformes típicas del género. Al igual que las especies *Capnocytophaga* que se encuentran en la orofaringe humana, algunas de las células de esta especie también son ligeramente curvas.
- H. Colonias de *Dysgonomonas capnocytophagoides* (antes grupo DF-3 de los CDC). Este microorganismo crece como colonias puntiformes después de 24 horas de incubación que luego forman colonias más grandes, grises a blancas. Esta fotografía muestra un cultivo de 48 horas que crece en agar sangre de carnero después de la incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Se ha comunicado que el crecimiento de las colonias de este microorganismo tiene un olor característicamente "dulce".



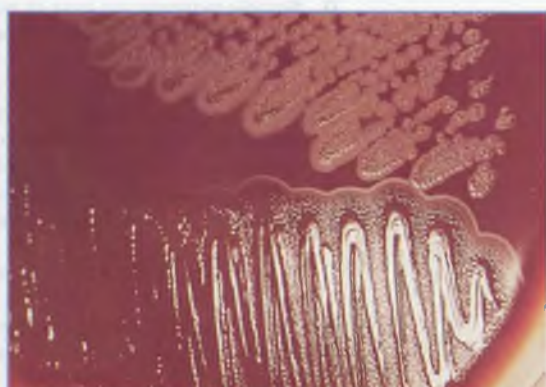
A



B



C



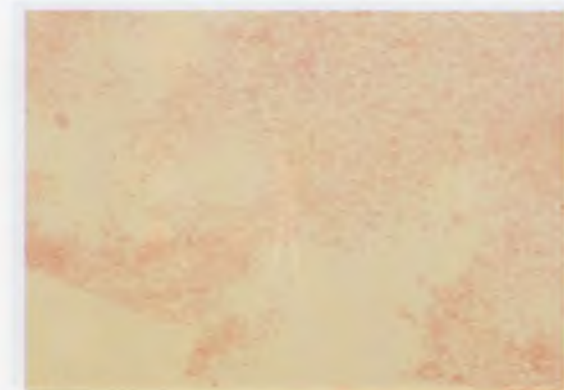
D



E



F



G



H

ESPECIES DE *PASTEURELLA*, *BRUCELLA* Y *BORDETELLA*

- A. Colonias de *Pasteurella multocida* que crecen en agar sangre de carnero después de 48 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. El microorganismo es no hemolítico y no crece en agar de MacConkey, EMB (eosina-azul de metileno) u otros medios entéricos selectivos/diferenciales. *P. multocida* se aísla más a menudo de heridas de mordedura de animales domésticos, sobre todo gatos y perros.
- B. Frotis con tinción de Gram de *P. multocida*, que muestra los cocobacilos gramnegativos pequeños característicos de esta especie y otras especies del género *Pasteurella*.
- C. Reacción de indol inmediata positiva de *P. multocida*. Se satura un trozo de papel de filtro con algunas gotas de reactivo de *p*-dimetilaminocinnamaldehído, se extrae el crecimiento de la colonia del microorganismo de la superficie de agar y se lo frota en el reactivo junto con un microorganismo control negativo. La aparición de un color turquesa en el papel de filtro es una prueba positiva, mientras que el microorganismo control negativo conduce a un color rosado pálido, como se muestra aquí. *P. multocida* también es oxidasa positivo.
- D. *Brucella melitensis* que crece en agar sangre de carnero después de 48 horas de crecimiento en una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5-7% a 35-37 °C. Las colonias son pequeñas, no pigmentadas, no hemolíticas, enteras y convexas.
- E. Prueba de anticuerpos inmunofluorescencia directa (IFD) para *Bordetella pertussis*. La prueba de IFD es un auxiliar importante del cultivo para la detección de *B. pertussis* en muestras nasofaríngeas. Esta fotografía muestra un preparado con IFD positiva, y los microorganismos aparecen como cocobacilos fluorescentes de color verde manzana. Como se muestra aquí, las bacterias pueden aparecer aisladas o en grupos, resultado de su atrapamiento en bandas mucosas. (Fotografía cortesía de Marty Roe, Children's Hospital, Denver, Co).
- F. Frotis con tinción de Gram de *B. pertussis*, que muestra la morfología cocobacilar pequeña característica.
- G. Crecimiento de *B. pertussis* en agar de Regan-Lowe sin (izquierda) y con (derecha) cefalexina incorporada en el medio. Las pequeñas colonias blancas presentes en ambas placas son colonias de *B. pertussis*, mientras que las colonias grandes en el medio que carece de cefalexina representan microorganismos contaminantes presentes en la muestra. El cultivo para *B. pertussis* debe incluir medios con antibióticos y sin ellos, dado que algunas cepas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* pueden ser inhibidas por la cefalexina.
- H. Colonias de *B. pertussis* en agar de Regan-Lowe después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Este medio contiene sangre de caballo (10% p/v) en una base de agar carbón. La alta concentración de sangre y la incorporación de carbón activado en el medio ayudan a neutralizar cualquier material tóxico que pueda estar presente en la muestra y a facilitar la recuperación de las bacterias.



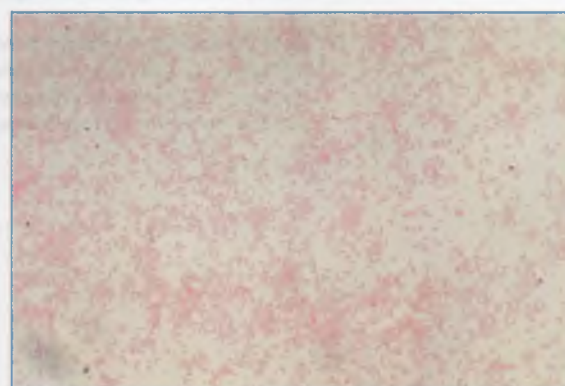
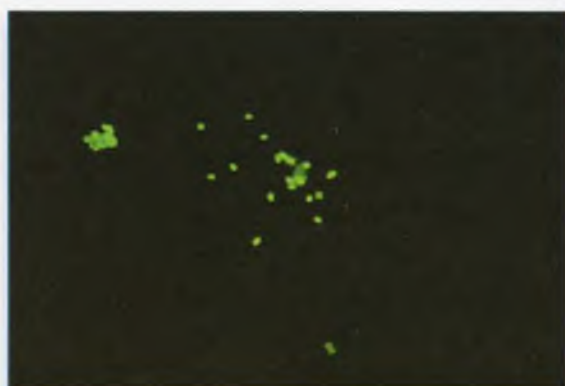
A

B



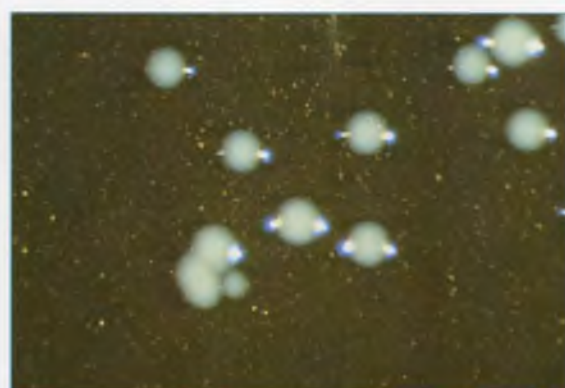
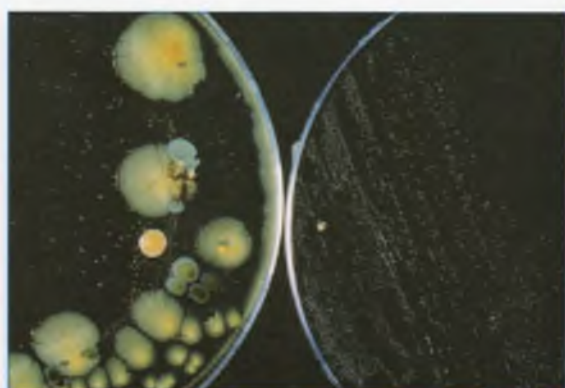
C

D



E

F

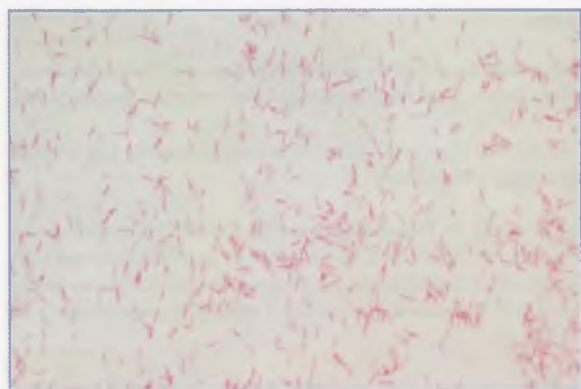


G

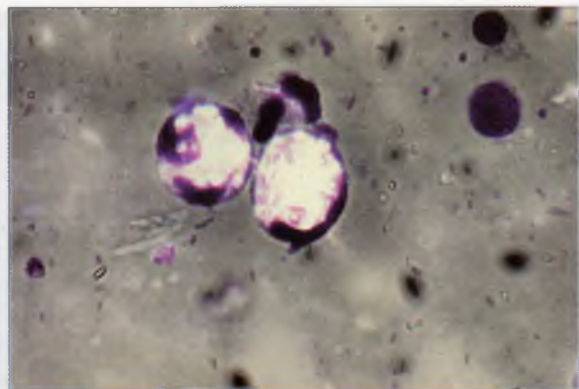
H

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEGIONELOSIS

- A. Tinción de Gram de cultivo de *Legionella pneumophila* que utiliza fucsina básica en lugar de safranina para la contratinción. Los microorganismos son bacilos delgados de distintas longitudes.
- B. Preparado por impronta de muestra de biopsia pulmonar a tórax abierto con tinción de Gram-Weigert que muestra pequeños bacilos intracelulares y extracelulares delgados (amplificación original, 100×; lente objetivo). Obsérvense los bacilos cortos y pletóricos en el macrófago más cercano al centro del portaobjetos. *L. pneumophila* serogrupo 1 fue el único microorganismo aislado en cultivo; una impronta tisular del pulmón fue DFA-positiva cuando se tiñe con el conjugado específico para este microorganismo.
- C. La proliferación importante en agar carbón-extracto de levadura con buffer (BCYEa) después de 3 días o más de incubación y la falta de crecimiento en agar sangre son características de las especies de *Legionella*.
- D. Vista con microscopio de disección de colonias de *L. pneumophila* en BCYEa. Obsérvense las estructuras internas de aspecto cristalino dentro de las colonias de 3-5 mm que tienen márgenes enteros (amplificación original aproximada 40×).
- E. Autofluorescencia azul-blanca de *L. bozemanii* en BCYEa; fotografiado bajo luz ultravioleta de onda larga. Otras especies que dan autofluorescencia son *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. anisa*, *L. tucsonensis*, *L. cherrii*, *L. parisiensis* y *L. steigerwaltii*. Esta característica está ausente en *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. feeleyi*, *L. longbeachae*, *L. oakridgensis* y muchas otras especies de *Legionella*.
- F. Tinción ácido-alcohol resistente de Kinyoun modificada de *L. micdadei* que crece en BCYEa. Algunas de las bacterias con forma de bastón en el preparado son ácido alcohol resistentes (rojas), mientras que algunas no lo son (azules); por lo tanto, son "parcialmente ácido-alcohol resistentes". Utilizando la tinción de Ziehl-Neelsen tradicional o una tinción de auramina-rodamina, no es probable que sean ácido-alcohol resistentes (véanse los detalles en el texto).
- G. Corte con parafina del tejido pulmonar de un paciente con enfermedad de los legionarios aguda. El corte muestra un área de consolidación. Exudados inflamatorios que consisten en fibrina, muchos neutrófilos, pocos macrófagos y algunos eritrocitos llenan los espacios y los conductos alveolares (tinción de hematoxilina y eosina; amplificación original aproximada 200×).
- H. Corte con parafina del pulmón de otro paciente diferente con una forma más crónica de enfermedad de los legionarios. Los alvéolos están llenos con macrófagos espumosos sobresalientes y el intersticio está edematizado. Una tinción de impregnación argéntica (p. ej., de Dieterle o de Warthin-Starry [no se muestra]) ayuda a detectar los microorganismos.



A



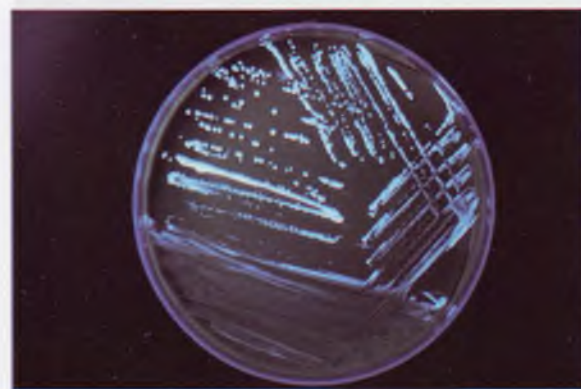
B



C



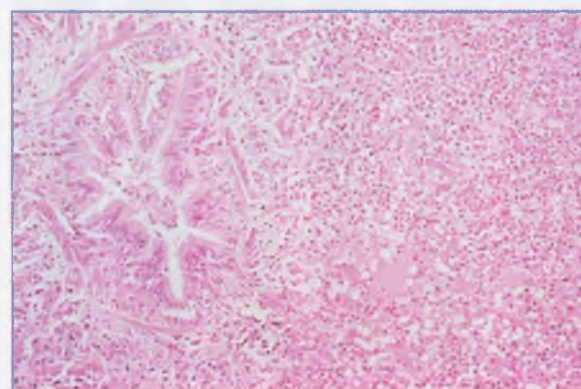
D



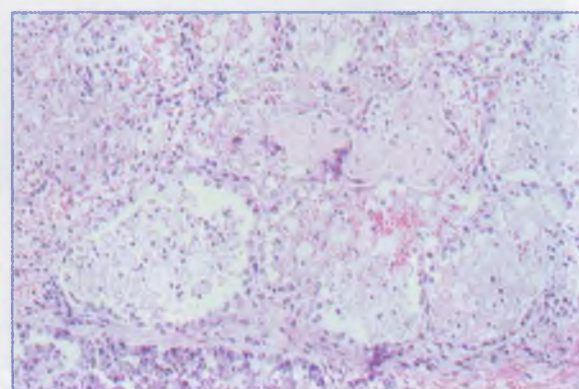
E



F



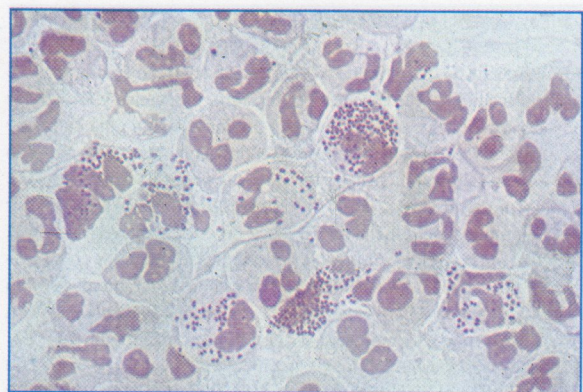
G



H

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *NEISSERIA*

- A. Frotis con tinción de Gram de una secreción uretral de un varón con uretritis gonocócica. Nótese la presencia de diplococos gramnegativos intracelulares dentro de los neutrófilos segmentados con una tinción pálida.
- B. Lesión cutánea de infección gonocócica diseminada en el dedo índice de la mano izquierda. Las lesiones cutáneas asociadas con ETS suelen ubicarse en las extremidades.
- C. Colonias típicas de *Neisseria gonorrhoeae* en medio de Thayer-Martin modificado (MTM) después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en 5-7% de CO₂. MTM es una fórmula a base de agar chocolate que contiene vancomicina, colistina y nistatina para inhibir el desarrollo de microorganismos grampositivos, gramnegativos y hongos, respectivamente. Las especies de *Neisseria* patógenas, en especial *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, crecen bien en el medio MTM.
- D. Vista de cerca de las colonias de *N. gonorrhoeae* que crecen en agar MTM después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en 5-7% de CO₂.
- E. Agar semisólido digerido de cistina y tripticasa (CTA) convencional para la identificación de especies de *Neisseria*. Esta fotografía muestra la batería típica de medios con hidratos de carbono usados para la identificación. Se incluyen (*de izquierda a derecha*) CTA-glucosa, CTA-maltosa, CTA-sacarosa y CTA-lactosa (el tubo CTA control sin hidrato de carbono no se muestra). El medio basal CTA contiene un indicador rojo fenol y un cambio en el color del medio de rojo a amarillo indica la producción de ácido a partir del hidrato de carbono correspondiente. En esta fotografía, el ácido se ha producido sólo de la glucosa e identifica el microorganismo como *N. gonorrhoeae*.
- F. Vista ampliada de colonias de *Neisseria meningitidis* que crecen en agar sangre de carnero después de 24 horas de incubación a 35-37 °C en 5-7% de CO₂.
- G. Prueba de utilización rápida de hidratos de carbono para la identificación de especies de *Neisseria* (véase protocolo 11-1). Esta prueba se realiza usando una solución de rojo de fenol salina equilibrada (BSS, 0,10 mL por tubo), con una sola gota de hidrato de carbono (20% p/v de solución acuosa, filtrada y esterilizada) agregada por cada tubo de prueba. Se prepara una suspensión densa del microorganismo en BSS sin hidrato de carbono y se agrega una sola gota de esta suspensión cargada a cada tubo con BSS-hidrato de carbono. Los tubos inoculados se incuban a 35 °C durante 4 horas. Esta fotografía muestra una serie de hidratos de carbono-BSS compuestos de (*de izquierda a derecha*) BSS sola (para la suspensión del microorganismo), BSS-glucosa, BSS-maltosa, BSS-fructosa, BSS-sacarosa y BSS-lactosa. Porque se ha producido ácido en los tubos BSS-glucosa y BSS-maltosa (cambio de color de rojo a amarillo), el microorganismo se identifica como *N. meningitidis*.
- H. GONOCHEK II® (EY Laboratories, San Mateo, CA). Tres sustratos cromogénicos están incluidos en un tubo de plástico único para detectar las enzimas glucosidasa y aminopeptidasa específicamente encontradas en *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *N. gonorrhoeae*. La hidrólisis de los sustratos en el tubo deriva en el volumen de inóculo pequeño que vira a varios colores. Los patrones de identificación observados son: azul (*arriba a la izquierda*), *N. lactamica* (hidrólisis de β-galactosidasa); amarillo (*arriba a la derecha*), *N. meningitidis* (hidrólisis de γ-glutamil-*p*-nitroanilida) y rojo (*abajo a la izquierda*), *N. gonorrhoeae* (hidrólisis de prolil-β-naftilamida). La falta de una reacción de color (*abajo a la derecha*) posterior a los 30 minutos de incubación identifica el microorganismo como *Moraxella catarrhalis*.



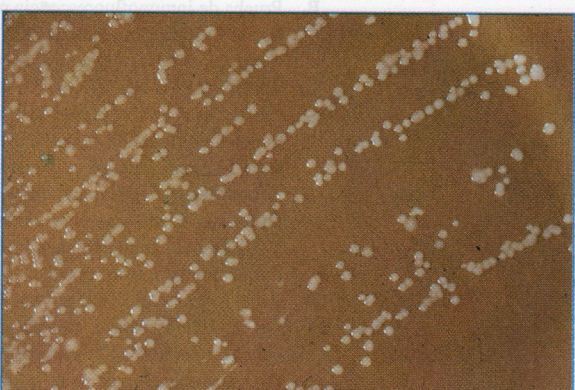
A



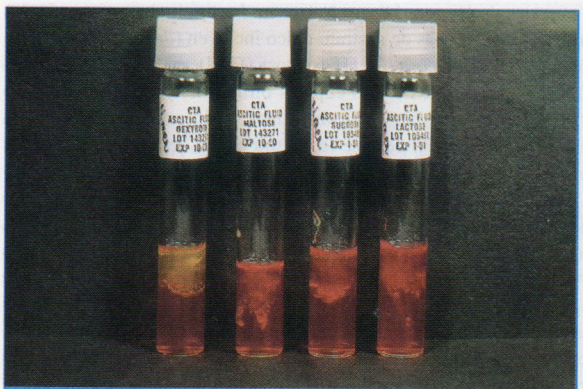
B



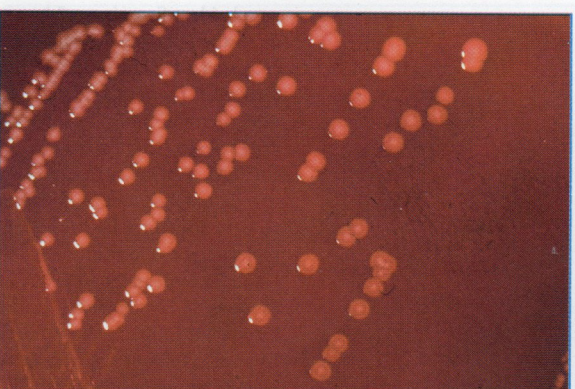
C



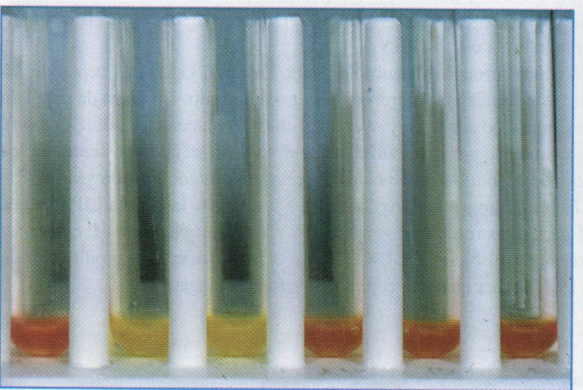
D



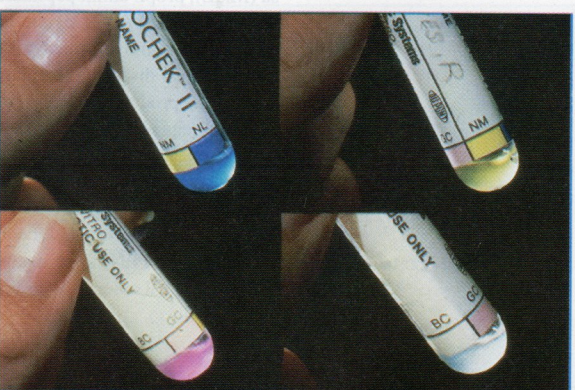
E



F



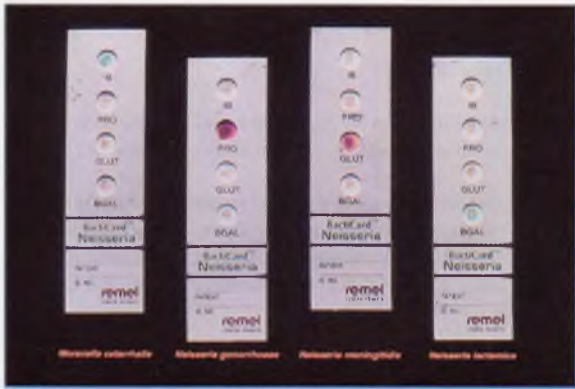
G



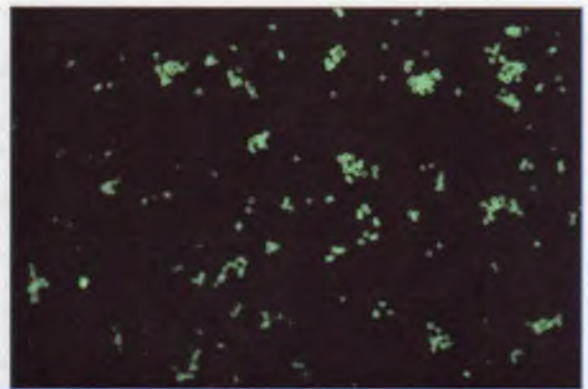
H

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *NEISSERIA* Y *MORAXELLA CATARRHALIS*

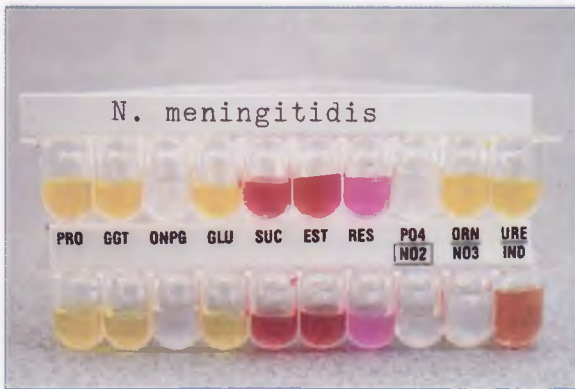
- A.** BactiCard *Neisseria*® (Remel Laboratorios, Lenexa KS). Esta tira de identificación contiene cuatro pruebas cromogénicas de enzima-sustrato para la identificación de las especies de *Neisseria* patógenas y *Moraxella catarrhalis*. Después de la hidratación de cada uno de los cuatro círculos de prueba con una gota de buffer se aplica el cultivo desarrollado en un medio selectivo o en un subcultivo en cada una de las cuatro áreas de la prueba. Si se observa un color azul verdoso en el área de la prueba IB (butirato esterasa) dentro de los 2 minutos (*la tira a la izquierda*), el microorganismo se identifica como *M. catarrhalis*. Si no desarrolla color en esa área, la tira se incuba durante unos 13 minutos adicionales. Si aparece un color azul verdoso en el área de prueba BGAL (β -galactosidasa) (*la tira más alejada a la derecha*) durante ese tiempo, el microorganismo se identifica como *N. lactamica*. Si no desarrolla reacción de color en esta área durante el período de incubación, se agrega una gota del reactivo que desarrolla color a las áreas de prueba PRO y GLUT. La aparición de color rojo en el área de prueba PRO (propil aminopeptidasa) identifica el aislamiento como *N. gonorrhoeae* (*segunda tira a partir de la izquierda*), mientras que la aparición de un color rojo en el área de prueba GLUT (γ -glutamil aminopeptidasa) identifica el aislamiento como *N. meningitidis* (*tercera tira a partir de la izquierda*).
- B.** Prueba de inmunofluorescencia para la confirmación del cultivo de *N. gonorrhoeae* (Microtrak® *N. gonorrhoeae* Culture Confirmation Kit, Wicklow, Irlanda). En una prueba positiva, se observan diplococos fluorescentes color verde manzana, como se observa en esta fotografía.
- C.** Sistema RapID NH® (Remel®). RapID NH es un sistema comercial de 4 horas para la identificación de especies de *Neisseria*, especies de *Haemophilus* y varias otras especies de bacterias gramnegativas con requerimientos nutricionales especiales. La fotografía muestra dos paneles duplicados inoculados con *N. meningitidis*. El panel superior es el sistema antes del agregado de los reactivos, mientras que el panel inferior es el sistema después de la adición de los reactivos a los últimos tres pocillos bifuncionales de prueba. Las reacciones que identifican el aislamiento como *N. meningitidis* son las reacciones prolil aminopeptidasa (PRO) y γ -glutamil aminopeptidasa (GLU) positivas, la reacción glucosa (GLU) positiva y la prueba de NO₂ (reducción de nitrito) positiva.
- D.** Panel MicroScan HNID® (Dade-MicroScan, West Sacramento, CA). MicroScan HNID es un panel de pruebas de 4 horas para la identificación de especies de *Haemophilus* y *Neisseria*. Las pruebas positivas en el panel observadas en la fotografía incluyen las pruebas de reducción de nitrato (NO₃), reducción de nitrito (NO₂), producción de ácido a partir de glucosa (GLU), sacarosa (SUC), maltosa (MAL), fructosa (FRU) y prolil aminopeptidasa (PRO). Estas características identifican este aislamiento como *N. mucosa*.
- E.** Panel API NH® (BioMérieux, Durham, NC). El API NH es un sistema de identificación en formato de tira para la identificación en 2 horas de las especies de *Haemophilus* y *Neisseria*. La tira incluye siete cúpulas de sustrato único y tres cúpulas bifuncionales. Las pruebas de sustrato único incluyen (*de izquierda a derecha*), una β -lactamasa (PEN), producción de ácido de glucosa (GLU), fructosa (FRU), maltosa (MAL), sacarosa (SUC), ornitina descarboxilasa (ODC) y ureasa (URE). Las cúpulas bifuncionales incluyen butirato esterasa más prolil aminopeptidasa (LIP/PRO A), fosfatasa alcalina más γ -glutamil aminopeptidasa (PAL/GGT) y β -galactosidasa más indol (β GAL/IND). Primero se lee la tira entera, incluidas las pruebas LIP, PAL y β GAL, y luego se agrega un reactivo que desarrolla color a los pocillos PRO y GGT, y el reactivo de indol se agrega al pocillo IND. Estas tres últimas cúpulas luego se releen para producir el cuarto número de un bicódigo de cuatro dígitos. Las cúpulas de los hidratos de carbono, LIP, PRO A, GGT y β GAL se destinan a la identificación de especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*, mientras que las cúpulas de los hidratos de carbono ODC, URE, PAL, β GAL e IND se usan para la identificación y biotipificación de especies de *Haemophilus*. En esta fotografía, las pruebas GLU y PRO A son positivas, lo que provee un bicódigo de 1001. La consulta con la base de datos NH proporciona una identificación de *N. gonorrhoeae*. El pocillo PEN es una cúpula de detección de β -lactamasa acidométrica que no se usa con propósitos de identificación. Aquí la prueba PEN es positiva, lo que indica que el aislamiento es β -lactamasa positivo.
- F.** API NH inoculada con *N. meningitidis*. Las pruebas positivas sobre la tira incluyen glucosa (GLU), maltosa (MAL), propil aminopeptidasa (PRO A) y GGT (γ -glutamil aminopeptidasa). Estas reacciones derivan en un bicódigo API de 5003, que provee una identificación de *N. meningitidis*. Este aislamiento es β -lactamasa negativo, como se indica por el color azul en la cúpula PEN.
- G.** La prueba en disco *M. cat* butirato (Carr-Scarborough Microbiologicals, Decatur, GA). Las cepas de *M. catarrhalis* producen una enzima butirato esterasa capaz de hidrolizar indoxil butirato. Un disco de papel de filtro impregnado con indoxil butirato se humedece con agua y se frota el cultivo con colonias sobre el disco. La enzima butirato esterasa hidroliza el compuesto y aparece un color azul verdoso en el disco dentro de los 2 minutos. Esta figura muestra tres discos de *M. cat* butirato positivos sobre un portaobjetos de vidrio.
- H.** API NH inoculado con *M. catarrhalis*. En esta fotografía, la única prueba positiva es la cúpula LIP (azul es una reacción positiva). El bicódigo API para estas reacciones es 0010, que lo identifica como *M. catarrhalis*. La cúpula PEN no se usa para determinar el bicódigo API, sino sólo para detectar la producción de β -lactamasa. El color azul en la cúpula PEN indica que esta cepa es β -lactamasa negativa.



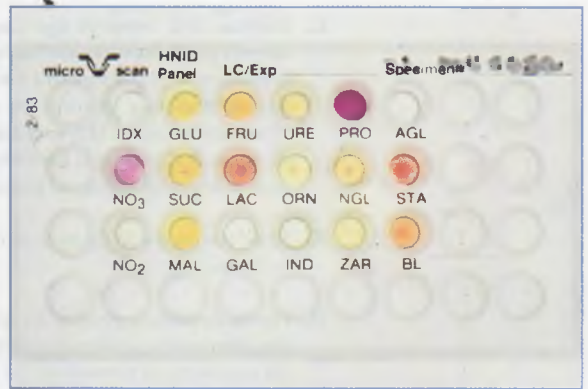
A



B



C



D



E



F



G



H

IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS Y ESPECIES RELACIONADAS

- A. Paciente adulto con celulitis estafilocócica en el labio superior.
- B. Paciente adulto con ampollas, lesiones vesiculares del impétigo estafilocócico facial. El cultivo del líquido serosanguinolento del interior de esas vesículas revela un gran número de *Staphylococcus aureus*.
- C. Recién nacido con síndrome estafilocócico de la piel escaldada. Este síndrome se observa en recién nacidos infectados con cepas de *S. aureus* que producen exfoliatinas (toxinas epidérmolíticas). Estas toxinas disuelven la matriz de mucopolisacáridos de la epidermis, lo que causa la rotura intraepitelial de las conexiones celulares en la capa granulosa. La formación de ampollas sucede en grandes áreas del cuerpo, con la descamación ulterior de las capas superficiales de la piel, como se muestra aquí.
- D. Frotis con tinción de Gram de una lesión de celulitis estafilocócica. Los microorganismos aparecen como pequeños cocos grampositivos extracelulares dispuestos en grupos junto a los leucocitos polimorfonucleares teñidos de rosado.
- E. Colonias de *S. aureus* en agar sangre de carnero. Esta fotografía muestra las colonias típicas de *S. aureus* después de 24 horas de incubación a 35-37 °C. Se observa una zona de β-hemólisis debida a la actividad hemolítica de la α-hemolisina estafilocócica que rodea las colonias. El área roja más oscura por fuera del área de hemólisis alrededor de cada colonia representa la acción de la β-hemolisina (o hemolisina "frío/calor"). Ésta es la β-hemolisina que interactúa con el factor CAMP producido por los estreptococos del grupo B que causa la hemólisis sinérgica observada en la prueba de CAMP para la identificación presumtiva de estreptococos del grupo B (cap. 13).
- F. Frotis con tinción de Gram de un cultivo en caldo de *S. aureus*, que muestra los típicos cocos grampositivos en forma de racimos.
- G. Prueba de catalasa positiva. La prueba de la catalasa diferencia estafilococos y micrococos de estreptococos, enterococos y bacterias similares a estreptococos (cap. 13). Esta prueba se realiza colocando una colonia crecida en un portaobjetos de vidrio y agregando una gota de peróxido de hidrógeno al 3% al inóculo. Un burbujeo inmediato y vigoroso debido a la producción de oxígeno gaseoso, como se muestra aquí, indica una prueba positiva. Los micrococos y los estafilococos son catalasa positivos, mientras que los estreptococos y los enterococos son catalasa negativos. *Rothia mucilaginosa*, otro microorganismo que crece como cocos grampositivos en grupos, es catalasa positivo débil o puede ser catalasa negativo.
- H. Colonias de *Micrococcus luteus* en agar sangre de carnero. Esta especie produce colonias pigmentadas amarillas. Otros micrococos y microorganismos relacionados con el género pueden ser no pigmentados o pueden producir colonias pigmentadas naranjas o rojas en agar. Los micrococos y los microorganismos relacionados pueden diferenciarse de los estafilococos por la resistencia a la furazolidona, la sensibilidad a la bacitracina o por otros métodos como se muestra en el cuadro 12-1.



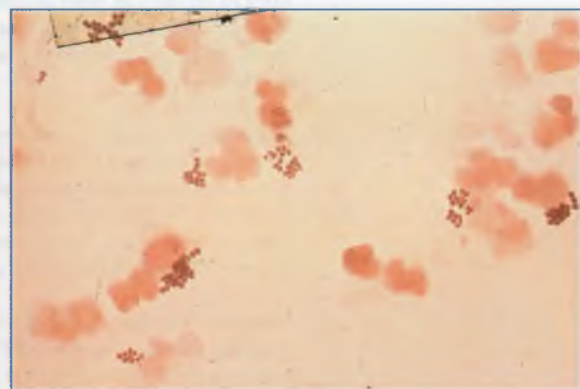
A



B



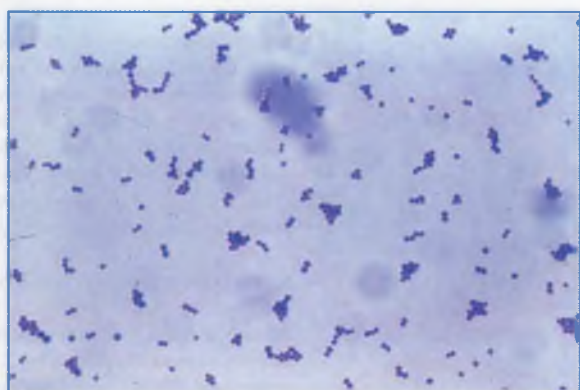
C



D



E



F



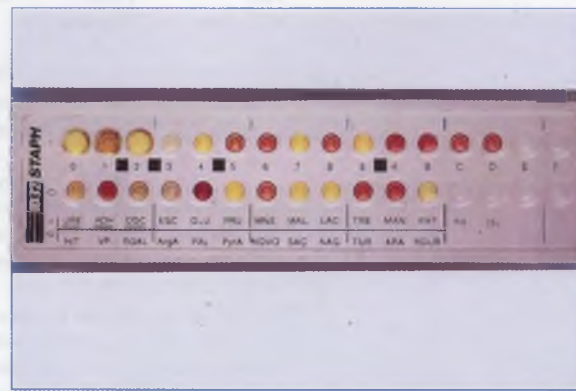
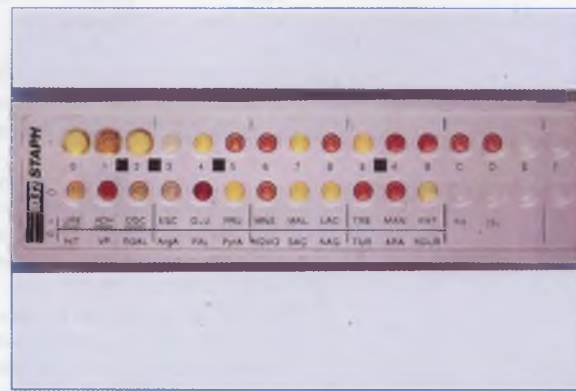
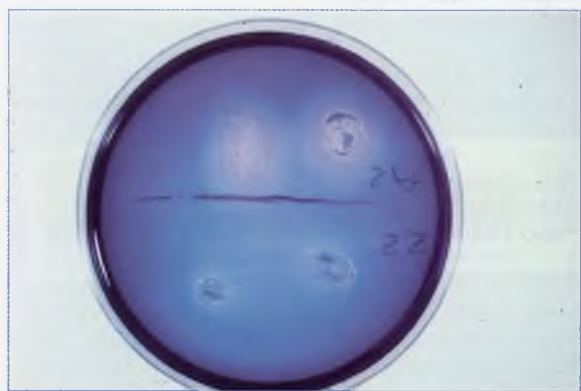
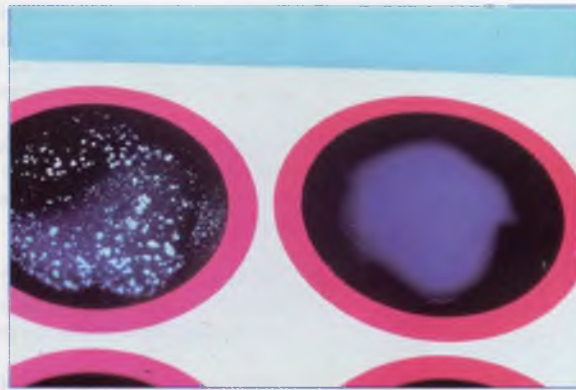
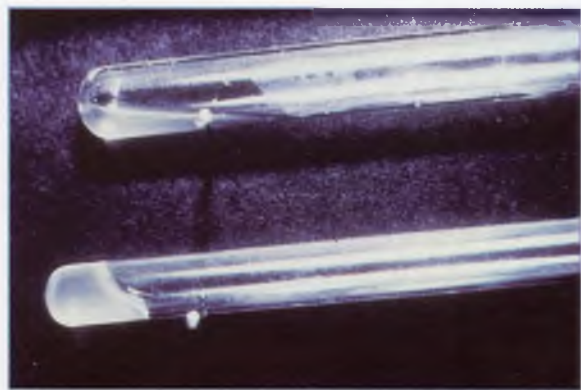
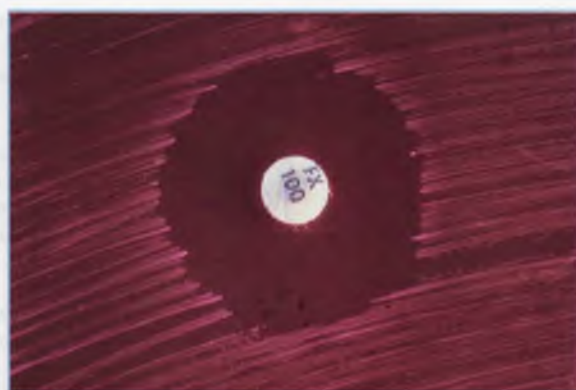
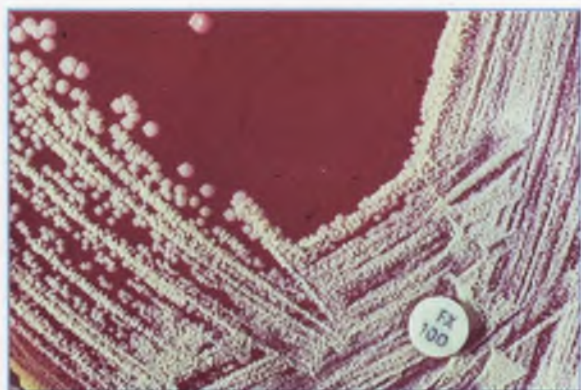
G



H

IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS

- A. Prueba en disco de furazolidona con una especie de *Micrococcus*. Son accesibles varias pruebas para la diferenciación de los micrococcos y géneros relacionados de los estafilococos. La prueba de sensibilidad a la furazolidona es un método fiable para esta diferenciación. Los micrococcos son resistentes a la furazolidona y por lo general crecen en el borde del disco de 6 mm de furazolidona (FX, 100 µg, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).
- B. Prueba con disco de furazolidona en una especie de *Staphylococcus*. El crecimiento de los estafilococos se inhibe por la furazolidona y muestra un área de inhibición del desarrollo alrededor del disco, como se representa en esta figura.
- C. Prueba de oxidasa modificada (Remel®, Lenexa, KS). Esta prueba es un método de 30 segundos, rápido para la diferenciación de los estafilococos de los micrococcos y especies relacionadas. El reactivo oxidasa (dihidroclorotetrametil-*p*-fenilendiamina) se prepara con dimetil sulfoxido (DMSO), lo que le permite penetrar la pared celular estafilocócica. La prueba se realiza frotando una porción del desarrollo de la colonia de una placa en un disco de papel de filtro que está impregnado con el reactivo. La mayoría de los micrococcos y especies relacionadas son oxidasa modificada positiva y producen un color azul violeta en el disco dentro de los 30 segundos, mientras que la mayoría de las especies de *Staphylococcus* son oxidasa modificada negativas.
- D. Prueba de la coagulasa en portaobjetos. Esta prueba es un método rápido para la identificación de *S. aureus*. La mayoría de las cepas de esta especie producen una coagulasa unida a la célula o "factor de aglutinación" que se detecta mezclando una suspensión salina del microorganismo con plasma con EDTA de conejo. Debe incluirse un control con solución salina (*izquierda*) para cada prueba para evaluar la autoaglutinación. No todas las cepas de *S. aureus* tienen factor de aglutinación, de modo que las pruebas coagulasa negativas deben confirmarse con la prueba de coagulasa en tubo (véase lámina en color 12-2E).
- E. Prueba de coagulasa en tubo. En esta prueba, la coagulasa extracelular producida por *S. aureus* forma un complejo con un componente del plasma, llamado factor reactante de coagulasa. Este complejo, a su vez, reacciona con el fibrinógeno en el plasma para formar fibrina y, como consecuencia, el desarrollo de un coágulo visible en el tubo. Se muestra una prueba positiva en la parte *inferior* de la figura y una prueba negativa en la parte *superior*.
- F. Prueba de aglutinación del látex para la identificación de *S. aureus*. Esta prueba de coagulasa alternativa usa partículas de látex recubiertas con plasma. El fibrinógeno unido al látex detecta el factor de aglutinación y las inmunoglobulinas, también presentes en el látex, detectan la proteína A en la superficie de la célula de *S. aureus*. Formulaciones más recientes de esta prueba también contienen partículas de látex recubiertas con anticuerpos contra los tipos capsulares 5 y 8 de *S. aureus*, que permiten una detección más fiable de las cepas resistentes a la oxacilina. Mezclando el desarrollo de las colonias de *S. aureus* con el reactivo del látex resulta una aglutinación rápida (*izquierda*). También se muestra (*derecha*) un estafilococo coagulasa negativo que produce una reacción de aglutinación del látex negativa.
- G. Medio DNasa con azul de toluidina. Este medio detecta la producción de desoxirribonucleasa por *S. aureus*. Los microorganismos se inoculan en motas grandes en la superficie del agar y la placa se incuba a 35-37 °C durante 24 horas. Una prueba positiva se indica por la presencia de un color rosado debajo y alrededor del inóculo. Como se muestra aquí, *S. aureus* ("SA" en la placa) es DNasa positivo, mientras que el control (*S. saprophyticus*, "SS" en la placa) es DNasa negativo. La prueba de DNasa sirve como un método adjunto útil para las cepas de *S. aureus* que tienen resultados débiles o ambiguos en la prueba de la coagulasa.
- H. Sistema API ID32 Staph® (BioMérieux) para la identificación de estafilococos y micrococcos. Este sistema en formato de tira contiene 26 sustratos bioquímicos. Las reacciones positivas y negativas se graban para generar un número de biotipo que se usa en una base de datos del ordenador (APIWEB) para identificar el microorganismo. Este sistema tiene la base de datos más completa de todos los productos comerciales disponibles para la identificación de estafilococos.



IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS (CONTINUACIÓN)

- A. Colonias de *Staphylococcus epidermidis* en agar sangre de carnero (SBA) después de 24 horas de incubación a 35-37 °C.
- B. *S. saprophyticus* en SBA con discos de furazolidona y novobiocina. *S. saprophyticus* es causa de infecciones urinarias en mujeres jóvenes. Como otros estafilococos, esta especie es sensible a la furazolidona (FX), como se observa por la zona de inhibición alrededor del disco FX. El otro disco (designado c) en este portaobjetos es de novobiocina. *S. saprophyticus* es una de las varias especies de estafilococos resistentes a la novobiocina.
- C. Panel de identificación API Staph® inoculado con *S. saprophyticus*. Esta lámina muestra las reacciones en la primera mitad del panel. Las interpretaciones de las reacciones de la prueba mostradas son como sigue:

CHO Control	Negativo	GLU	Positivo	FRU	Positivo
MNE	Negativo	MAL	Positivo	LAC	Positivo
TRE	Positivo	MAN	Positivo	XLT	Negativo
MEL	Negativo				

- D. Panel de identificación API Staph® inoculado con *S. saprophyticus*. Esta lámina muestra la segunda mitad del panel. Las interpretaciones de las reacciones de la prueba mostradas son como sigue:

		NIT	Negativo	PAL	Positivo
VP	Positivo	RAF	Negativo	XYL	Negativo
SAC	Positivo	MDG	Negativo	NAG	Negativo
ADH	Negativo	URE	Positivo		

El código de números API para estas reacciones, mostradas en la lámina en color 12-3C y D, es 6634112. La consulta a la base de datos API Staph asistida por el ordenador proporciona una lista de posibles identificaciones, incluidos *S. saprophyticus* (71.9% de probabilidad), *S. warneri* (19.3% de probabilidad) o *S. hominis* (6.6% de probabilidad). Como *S. saprophyticus* es la única especie resistente a la novobiocina, el microorganismo puede ser identificado como *S. saprophyticus*.

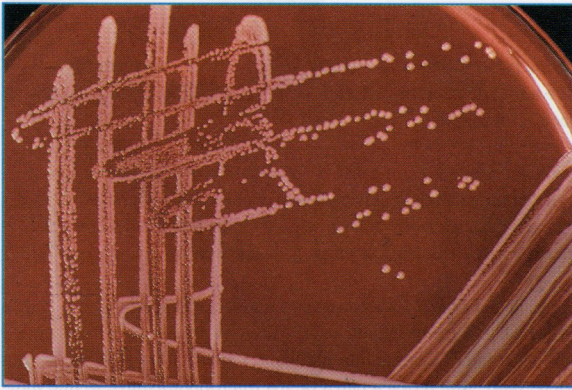
- E. Este portaobjetos muestra el crecimiento de un aislamiento en agar sangre de carnero después de una incubación de 24 horas a 35-37 °C. Esta cepa se aisló en varios hemocultivos de un paciente de 38 años con endocarditis estafilocócica presuntiva. Es una cepa no pigmentada y no hemolítica, y también sensible a furazolidona y novobiocina (no mostrada).
- F. Esta fotografía muestra la reacción de aglutinación del látex del aislamiento de la lámina en color 12-3E. El aislamiento es coagulasa positivo para la prueba del látex. Como el aislamiento no "parece" *S. aureus*, el técnico de laboratorio inoculó una tira de identificación API Staph. Estas reacciones se muestran en la lámina en color 12-3G y H.
- G. Tira de identificación API Staph® inoculada con el aislamiento del hemocultivo mostrado en la lámina en color 12-3E. Esta fotografía muestra las reacciones en la primera mitad de la tira. Las interpretaciones de las reacciones de la prueba son como sigue:

CHO Control	Negativo	GLU	Positivo	FRU	Negativo
MNE	Positivo	MAL	Negativo	LAC	Negativo
TRE	Positivo	MAN	Negativo	XLT	Negativo
MEL	Negativo				

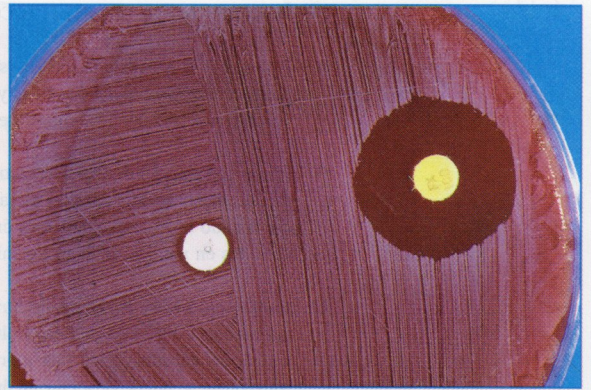
- H. Tira de identificación API Staph® inoculada con el aislamiento del hemocultivo mostrado en la lámina en color 12-3E. Esta fotografía muestra las reacciones en la segunda mitad de la tira. Las interpretaciones de las reacciones de la prueba son como sigue:

		NIT	Positivo	PAL	Positivo
VP	Positivo	RAF	Negativo	XYL	Negativo
SAC	Negativo	MDG	Negativo	NAG	Positivo
ADH	Positivo	URE	Negativo		

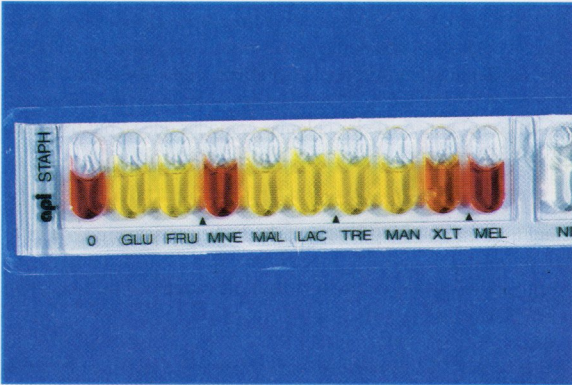
El doble código API para las reacciones que se muestran en la lámina en color 12-3G y 12-34H es 2116141. La consulta en la base de datos de ordenador API Staph identifica a esta cepa como *S. schleiferi*. Esto es coincidente con la reacción del látex positiva que se muestra en la lámina en color 12-3F, ya que estas especies pueden dar pruebas en portaobjetos, del látex y coagulasa en tubo positivas.



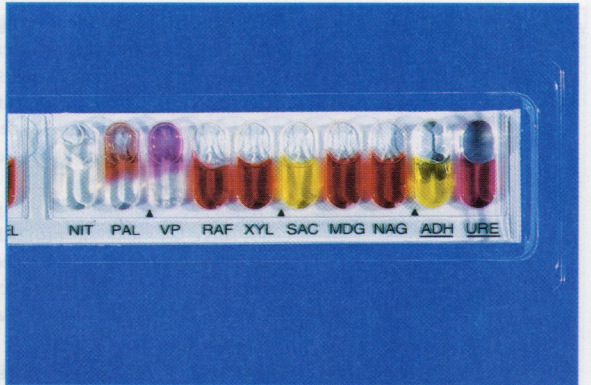
A



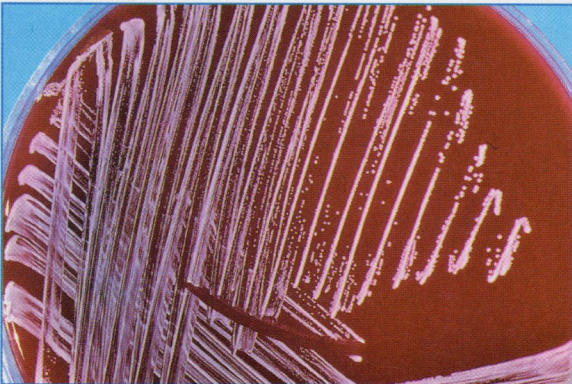
B



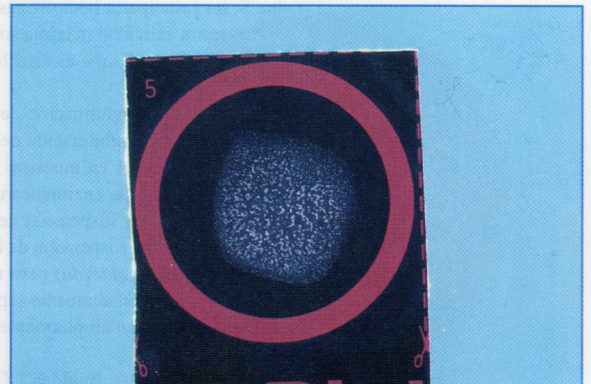
C



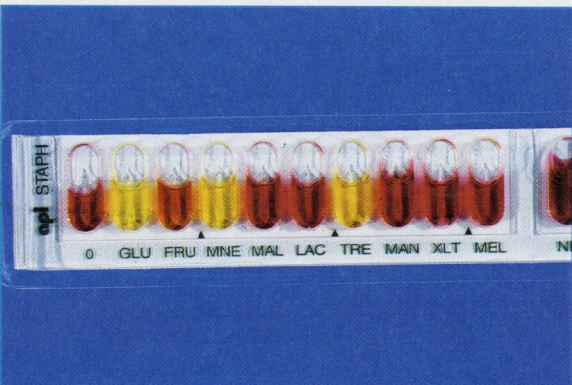
D



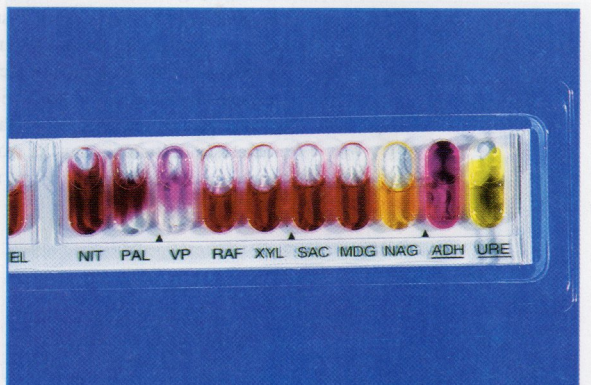
E



F



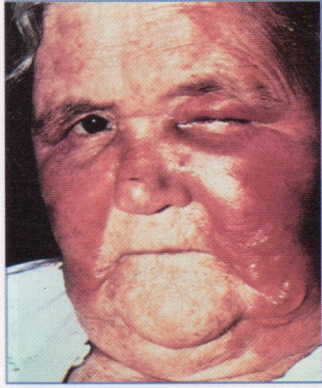
G



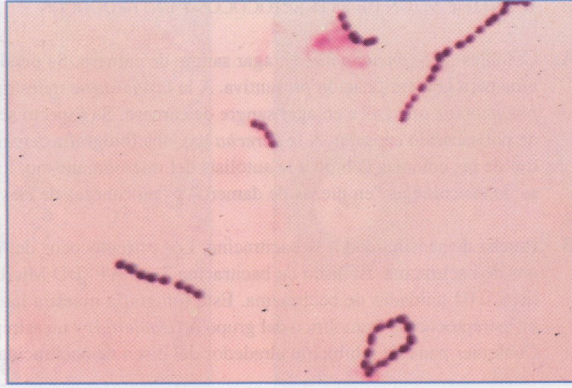
H

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS

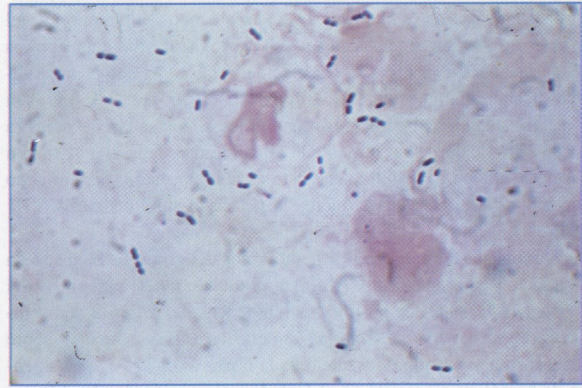
- A. Paciente con erisipela debida a estreptococos β -hemolíticos del grupo A. Esta infección afecta los tejidos blandos y los linfáticos cutáneos y conduce a manifestaciones sistémicas de infección, que incluyen fiebre. Obsérvense las lesiones ampollares adyacentes al mentón.
- B. Frotis con tinción de Gram de estreptococos que crecen en un caldo de cultivo. Como su nombre lo sugiere, los estreptococos característicamente crecen en cadenas. Estas cadenas se observan con mayor frecuencia cuando los microorganismos crecen en caldo. En los frotis con tinción de Gram preparados con cultivos crecidos en medios de agar, los microorganismos suelen aparecer en pares o en cadenas más cortas.
- C. Frotis con tinción de Gram de *Streptococcus pneumoniae*. Esta fotografía muestra el aspecto típico de los neumococos en caldo de hemocultivo. En los casos característicos, estas bacterias crecen de a pares en los cuales las células tienen una morfología "lanceolada" ligeramente alargada. Con algunas células en esta fotografía, se puede observar un área clara o "halo" que rodea a pares de los microorganismos, lo que indica la presencia de la cápsula de polisacárido de *S. pneumoniae*.
- D. Estreptococos β -hemolíticos en agar sangre de carnero. Los estreptococos β -hemolíticos producen hemolisinas que lisan los eritrocitos de carnero, lo que conduce al aclaramiento del medio que rodea las colonias. El estreptococo del grupo A que se muestra acá demuestra este tipo de hemólisis, como los estreptococos de los grupos B, C y G. Sin embargo, las zonas de β -hemólisis que rodean a las colonias de los estreptococos del grupo B no son tan grandes en relación con el tamaño de las colonias como las que se observan con los estreptococos β -hemolíticos de los grupos A, C y G.
- E. Estreptococos α -hemolíticos en agar sangre de carnero. Los estreptococos inicialmente pueden ser clasificados sobre la base de sus propiedades hemolíticas en agar sangre de carnero. La hemólisis parcial de estos eritrocitos conduce a un "enverdecimiento" del medio de agar que rodea a las colonias (α -hemólisis). Los estreptococos que son α -hemolíticos incluyen *S. pneumoniae*, el grupo viridans de estreptococos y la mayoría de las especies de *Enterococcus* (antes *Streptococcus*).
- F. Estreptococos β -hemolíticos en agar sangre de carnero. La β -hemólisis más intensa se observa en las áreas donde el medio ha sido "punzado", lo que empuja a algunas de las bacterias debajo de la superficie del medio. La β -hemólisis en estas áreas se debe a las actividades combinadas de estreptolisina O y estreptolisina S, las principales hemolisinas de los estreptococos del grupo A. La estreptolisina O es lábil al oxígeno y no muestra actividad máxima sobre la superficie del agar; la β -hemólisis superficial se debe en gran parte a la estreptolisina S, que es estable al oxígeno.
- G. Prueba directa de aglutinación del látex para estreptococos del grupo A. En la actualidad, existe tanto un inmunoanálisis de aglutinación del látex como un inmunoanálisis rápido para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados faríngeos. Con el método de aglutinación del látex que se muestra aquí, se trata enzimáticamente el hisopado faríngeo para extraer el antígeno A y se hace reaccionar el extracto con una suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpos contra estreptococos del grupo A y con una suspensión de látex no recubierta de control. La aglutinación del látex con el reactivo de látex de prueba (*izquierda*) pero no el látex control (*derecha*) es una prueba positiva. Aunque la mayoría de estas pruebas son altamente específicas para el antígeno de la pared celular grupo A, las sensibilidades de estos ensayos varían ampliamente.
- H. Strep OIA® (Biostar, Boulder, CO). El Strep OIA es un inmunoanálisis para la detección directa de estreptococos del grupo A en muestras de hisopados faríngeos. Se extrae el hisopo con ácido acético, se lo neutraliza y luego se lo mezcla con anticuerpos antigro A unidos a peroxidasa de rábano picante. Se coloca una gota de esta mezcla sobre la superficie de un portaobjetos OIA, que es revestido con anticuerpos contra estreptococos del grupo A. Después de 2 minutos de incubación, se enjuaga el portaobjetos y se agrega el sustrato peroxidasa de rábano picante dejándolo reaccionar sobre el portaobjetos OIA durante 4 minutos. Después de enjuagado se procede a la lectura del portaobjetos mediante el examen del color de luz reflejada en el área de reacción del portaobjetos OIA. Si se presenta antígeno de estreptococo del grupo A, el portaobjetos muestra una mancha violácea (*izquierda*). Si no se presenta antígeno, la superficie del portaobjetos retiene su color amarillo, con un punto azulado pequeño, como se muestra aquí (*derecha*).



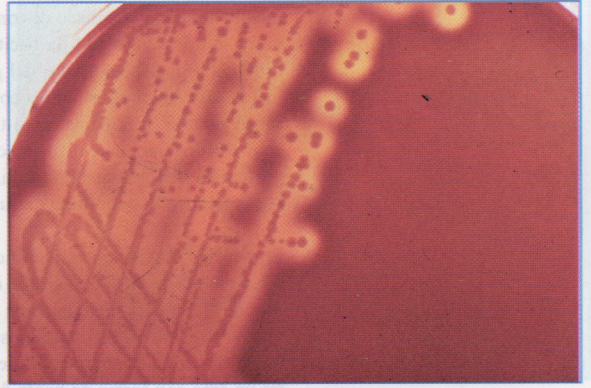
A Escarificación a la baciencia



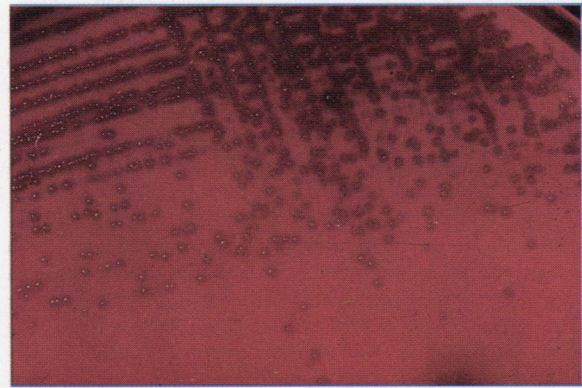
B Escarificación a la baciencia



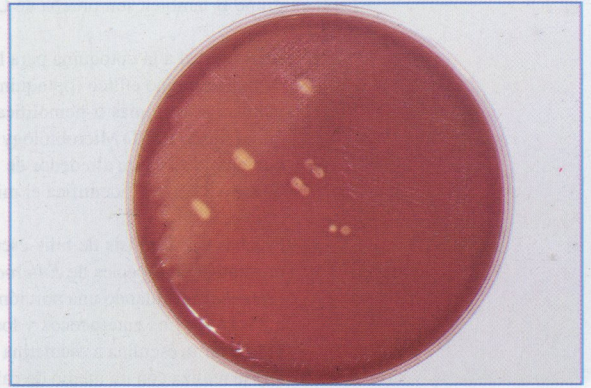
C Escarificación a la baciencia



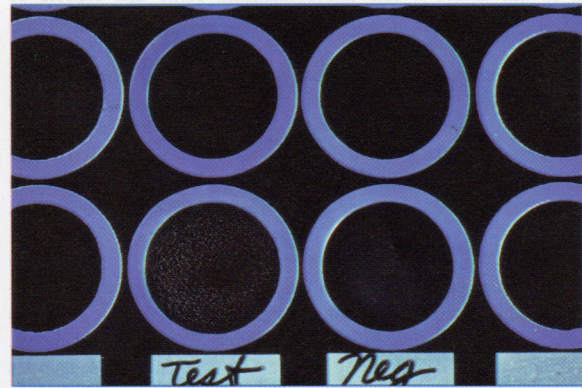
D Escarificación a la baciencia



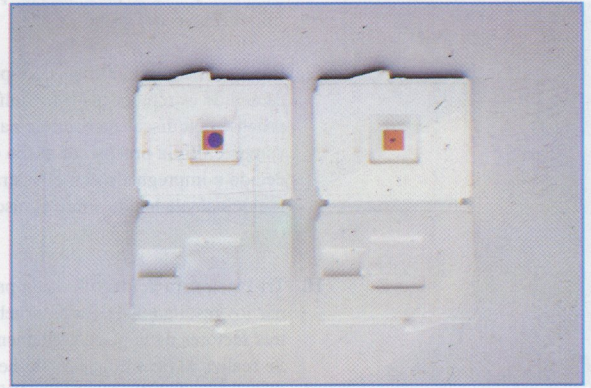
E Escarificación a la baciencia



F Escarificación a la baciencia



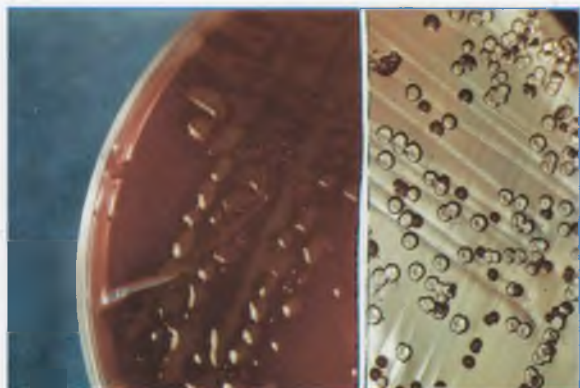
G Escarificación a la baciencia



H Escarificación a la baciencia

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS Y ENTEROCOCOS

- A. Colonias de *S. pneumoniae* en agar sangre de carnero. Se pueden utilizar dos características de *S. pneumoniae* para la identificación presuntiva. A la izquierda se muestra una cepa mucoide α -hemolítica típica de *S. pneumoniae* que crece en agar sangre de carnero. Su aspecto se debe a la producción de grandes cantidades de polisacárido capsular. A la derecha hay una fotografía cercana que muestra el colapso de la porción central de las colonias debido a la autólisis del microorganismo, lo que conduce a las denominadas morfológicas de las colonias “en piezas de damero” y “en cabezas de clavo” que se muestran aquí.
- B. Prueba de sensibilidad a la bacitracina. Los estreptococos del grupo A son sensibles a bajas concentraciones de bacitracina. El disco de bacitracina Taxo A® (BD Microbiology Systems) que se muestra aquí contiene 0,04 unidades de bacitracina. Esta fotografía muestra las reacciones de prueba de la bacitracina para un estreptococo β -hemolítico del grupo A (izquierda) y un estreptococo β -hemolítico del grupo B (derecha). Cualquier zona de inhibición alrededor del disco de bacitracina se considera una prueba positiva.
- C. Sensibilidad a la bacitracina y el trimetoprim-sulfametoxazol. El estreptococo β -hemolítico que se muestra aquí es sensible a bacitracina (derecha), pero también muestra una zona grande de inhibición del crecimiento alrededor del disco de trimetoprim-sulfametoxazol (izquierda). Los estreptococos β -hemolíticos del grupo A son sensibles a la bacitracina, pero resistentes al trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que los estreptococos β -hemolíticos del grupo B son resistentes tanto a la bacitracina como al trimetoprim-sulfametoxazol. Algunos estreptococos β -hemolíticos no pertenecientes al grupo A (p. ej., grupos C, F y G) son sensibles a la bacitracina, pero también serán sensibles al trimetoprim-sulfametoxazol, como se muestra aquí. Por lo tanto, la realización conjunta de estas dos pruebas aumenta la especificidad de la identificación presuntiva que se obtendría utilizando sólo la prueba de bacitracina. Este aislamiento sería denominado “estreptococo β -hemolítico presuntivo, no grupos A ni B, por bacitracina/trimetoprim-sulfametoxazol”.
- D. Prueba de CAMP para la identificación presuntiva de estreptococos β -hemolíticos del grupo B. La reacción de la prueba de CAMP depende de la interacción entre el factor CAMP, un producto del estreptococo del grupo B, con la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*. Los posibles estreptococos del grupo B son sembrados en estría en ángulos rectos con una siembra en estría de *S. aureus* (sin que las estrías se toquen) sobre una placa de agar sangre de carnero. Luego de una incubación durante toda la noche a 35-37 °C, se encuentra un área con forma de punta de flecha de hemólisis sinérgica en el área de intersección donde el factor CAMP y la β -hemolisina se han difundido en el medio. Las variantes no hemolíticas de estreptococos del grupo B también son prueba de CAMP positivas. Esta fotografía muestra tres pruebas de CAMP positivas.
- E. Sensibilidad a la optoquina para la identificación de *S. pneumoniae*. Se utiliza la sensibilidad al clorhidrato de hidrocupreno etílico (optoquina) para diferenciar *S. pneumoniae* de otros estreptococos viridans. Se subcultivan las colonias α -hemolíticas sobre una placa de agar sangre de carnero y se coloca un disco de optoquina (disco P; BD Microbiology Systems) sobre el inóculo. La presencia de una zona de inhibición del crecimiento de 14 mm alrededor de un disco de optoquina de 6 mm después de la incubación durante toda la noche a 35-37 °C identifica el microorganismo como *S. pneumoniae*.
- F. Pruebas de hidrólisis de bilis-esculina y tolerancia a la sal. Estas pruebas se utilizan para la identificación presuntiva de especies de *Enterococcus* y estreptococos del grupo D. Se realiza la prueba de bilis-esculina (derecha) inoculando una porción inclinada del medio de bilis-esculina e incubándola durante toda la noche a 35-37 °C. Los enterococos y los estreptococos del grupo D pueden crecer en presencia de bilis al 40% e hidrolizar la esculina a esculetina (que forma el precipitado negro). La prueba de tolerancia a la sal (izquierda) se realiza con un medio de caldo que contiene NaCl al 6,5%. Las especies de enterococos crecen, mientras que los estreptococos del grupo D no enterococos no crecen en este medio. La fotografía muestra una reacción positiva para ambas pruebas, lo que indica a este microorganismo como una especie de *Enterococcus* del grupo D.
- G. Prueba PYR. La hidrólisis de L-pirrolidonil- α -naftilamida (PYR) es una prueba presuntiva para la identificación de estreptococos β -hemolíticos del grupo A y especies de *Enterococcus* que puede reemplazar a las pruebas con discos de bacitracina-trimetoprim-sulfametoxazol y las pruebas de tolerancia a la sal, respectivamente. En la prueba con disco que se muestra, se aplica el crecimiento de las colonias a un disco humedecido e impregnado con el sustrato PYR. Después de 2 minutos, se coloca una gota de reactivo dimetilaminocinamaldehído sobre el disco para detectar la naftilamida libre que se libera con la hidrólisis de PYR (rojo).
- H. Tri-Placa para la identificación presuntiva de estreptococos. Esta placa única está diseñada para proporcionar los resultados de varias pruebas para la identificación presuntiva de estreptococos y enterococos. Los tres sectores de la placa contienen agar sangre de carnero, agar bilis-esculina y agar PYR, respectivamente. Se realiza la determinación de hemólisis y una prueba de CAMP en el sector de agar sangre y se leen las reacciones de bilis esculina y PYR en los otros dos sectores. Esta fotografía muestra la triplaca inoculada con una especie de *Enterococcus*: α -hemolítica, prueba de CAMP negativa, bilis-esculina positiva y PYR positiva.



A



B



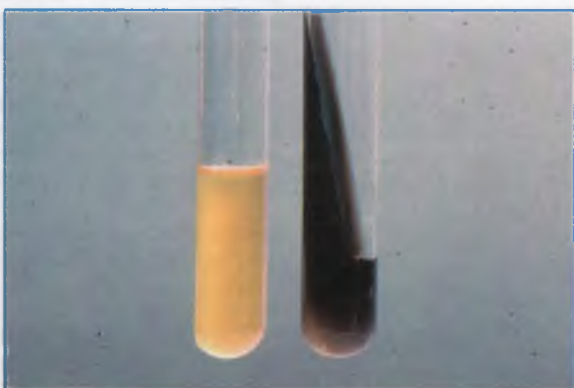
C



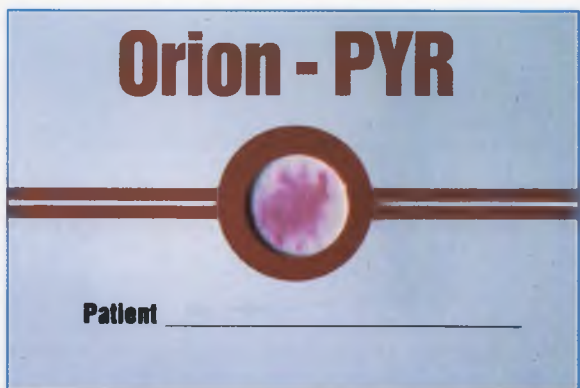
D



E



F



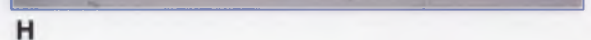
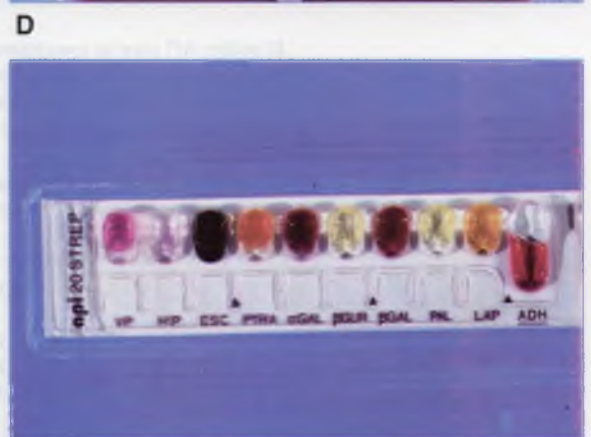
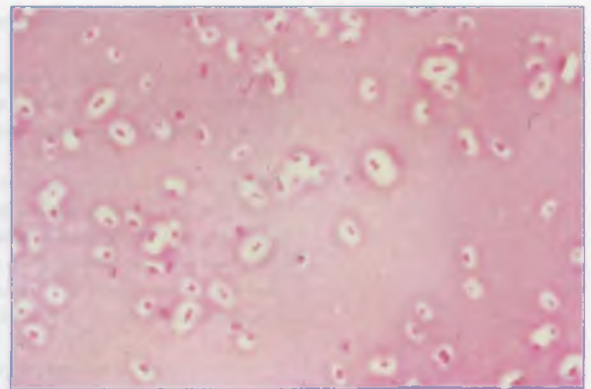
G



H

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS Y ENTEROCOCOS Y BACTERIAS SIMILARES A ESTREPTOCOCOS

- A.** Prueba del látex para el agrupamiento serológico de estreptococos β -hemolíticos. Aunque el método de extracción de Lancefield y las pruebas de precipitinas capilares son las técnicas más honradas por el tiempo para la identificación definitiva de los estreptococos agrupables, otros métodos, como el que se muestra aquí, han sido adoptados en la mayoría de los laboratorios y se los considera procedimientos estándares. En esta prueba, el antígeno de agrupamiento de la pared celular es extraído de la pared de la célula bacteriana por medios enzimáticos y el extracto se hace reaccionar ulteriormente con partículas de látex a las cuales se unen anticuerpos específicos de grupo. Una prueba positiva está indicada por la aglutinación de cuentas de látex en el reactivo de látex homólogo. Como se muestra aquí, ha ocurrido aglutinación con el reactivo del grupo A, pero no con los reactivos de los grupos B, C, D, F o G, lo que identifica así la cepa como un estreptococo β -hemolítico del grupo A.
- B.** Prueba de hinchazón capsular de Neufeld (Quellung) para la identificación de *S. pneumoniae*. Esta “prueba de precipitina” microscópica se puede utilizar para identificar neumococos o para determinar el serotipo capsular de cepas neumocócicas individuales. La reacción de los anticuerpos anticapsulares con el material de hidratos de carbono de la cápsula produce una reacción de microprecipitación sobre la superficie del microorganismo y un cambio en el índice de refracción de la cápsula propiamente dicha. Desde el punto de vista microscópico, la cápsula parece “hincharse”. Se agrega una pequeña cantidad de azul de metileno al preparado para permitir la visualización de las células y proporcionar el contraste de modo que se puedan discernir más fácilmente cambios refráctiles sutiles.
- C.** Prueba de aglutinación del látex Pneumoslides® (BD Microbiology Systems). La prueba Pneumoslides utiliza partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos antineumocócicos. La mezcla del látex sensibilizado con el material de las colonias de una placa de cultivo conduce a una aglutinación visible de la suspensión, lo que identifica así la cepa como *S. pneumoniae*.
- D.** Especies de *Abiotrophia/Granulicatella*. Estos microorganismos eran denominados antes estreptococos satélites o variantes nutricionales porque requieren compuestos del tiol, cisteína o la forma activa de vitamina B₆ (piridoxal o piridoxamina) para el crecimiento en los medios. Este requerimiento se puede cumplir realizando siembras cruzadas en estrías con un estafilococo a través de un inóculo de la cepa variante nutricional probable, como se muestra en esta fotografía. Se observan las pequeñas colonias del microorganismo que crecen adyacentes a la estría del estafilococo luego de la incubación de una forma similar a la prueba satélite para la identificación presuntiva de especies de *Haemophilus*. Los miembros de los estreptococos satélites han sido colocados ahora en el género *Abiotrophia* o el género *Granulicatella*.
- E.** *Enterococcus faecium*. Esta fotografía muestra una placa de agar sangre de camero inoculada por *E. faecium*. Las colonias de este microorganismo son lisas, grises y no hemolíticas o α -hemolíticas. El hisopo, que fue utilizado para recoger algo del crecimiento de la colonia de la placa, muestra que el microorganismo no está pigmentado. Esto se vuelve importante para la identificación de algunas otras especies de enterococos.
- F.** Panel de identificación API Strep® (BioMérieux) inoculado con *E. faecium*. Esta fotografía muestra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:
- | | | | | | |
|--------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|
| VP | Positiva | HIP | Negativa | ESC | Positiva |
| PYRA | Positiva | α -GAL | Positiva | β -GUR | Negativa |
| β -GAL | Positiva | PAL | Negativa | LAP | Positiva |
- G.** Panel de identificación API Strep inoculado con *E. faecium*. Esta fotografía muestra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:
- | | | | | | |
|-----|----------|------|----------|-----|----------|
| ADH | Positiva | RIB | Positiva | ARA | Positiva |
| MAN | Positiva | SOR | Positiva | LAC | Positiva |
| TRE | Positiva | INU | Negativa | RAF | Positiva |
| AMD | Negativa | GLYG | Negativa | HEM | Negativa |
- El biocódigo API para las reacciones que se muestran en la lámina en color 13-3F y G es 5357750. La consulta con la base de datos computarizada API proporciona una identificación de *E. faecium*, con una probabilidad del 99%.
- H.** Agar de cribado para vancomicina. El agar de cribado para vancomicina consiste en agar de infusión de cerebro y corazón que contiene vancomicina (6 μ g/mL). Este medio puede utilizarse para detectar enterococos resistentes a la vancomicina, la mayoría de los cuales son *E. faecium*. Como se muestra en esta fotografía, las cepas A, B, C y D son resistentes a la vancomicina y pueden crecer en este medio. La cepa E es una variedad de *E. faecalis*, la mayoría de las cuales son sensibles a la vancomicina, como lo indica la inhibición del crecimiento en este medio.



IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCOS Y ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS

- A. *Enterococcus casseliflavus* en agar sangre de carnero. *E. casseliflavus* es una de las dos especies móviles de *Enterococcus*. Además, produce un pigmento amarillo. Este pigmento se aprecia en la inspección del hisopo en la fotografía, que ha sido utilizado para recoger algo del crecimiento de la colonia.
- B. *Enterococcus gallinarum* en agar semisólido para motilidad. Como ya se dijo, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* son las dos especies móviles de *Enterococcus*. En esta fotografía se ha inoculado con corte *E. gallinarum* en un tubo de medio semisólido para motilidad que contiene tetrazolio. En la incubación del tubo inoculado, los microorganismos móviles se mueven fuera de la línea de estría para crear turbidez en el medio. El color violeta es el resultado de los microorganismos móviles que reducen el tetrazolio a formazán, que aparece como un precipitado violáceo en cualquier sitio donde haya microorganismos viables.
- C. *Streptococcus bovis* en agar sangre de carnero. *S. bovis* es un estreptococo del grupo D no enterococo. Este microorganismo es bilis-esculina positivo, pero no crece en caldo de NaCl al 6,5% y es PYR negativo. El aislamiento de *S. bovis* de hemocultivos se asocia con neoplasias colónicas.
- D. Panel de identificación API Strep inoculado con *S. bovis*. Esta fotografía muestra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:

VP	Positiva	HIP	Negativa	ESC	Positiva
PYRA	Negativa	α -GAL	Positiva	β -GUR	Negativa
β -GAL	Positiva	PAL	Negativa	LAP	Positiva

- E. Panel de identificación API Strep inoculado con *S. bovis*. Esta fotografía muestra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:

ADH	Negativa	RIB	Negativa	ARA	Negativa
MAN	Positiva	SOR	Negativa	LAC	Positiva
TRE	Positiva	INU	Positiva	RAF	Positiva
AMD	Positiva	GLYG	Positiva	β HEM	Negativa

El código API para las reacciones que se muestran en la lámina en color 13-4D y E es 5250573. La consulta con la base de datos computarizada API proporciona una identificación de esta cepa aislado como *S. bovis* I (probabilidad del 99,9%). Según la nueva nomenclatura para este complejo de microorganismo, *S. bovis* I se denomina ahora *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus* (cuadro 13-7).

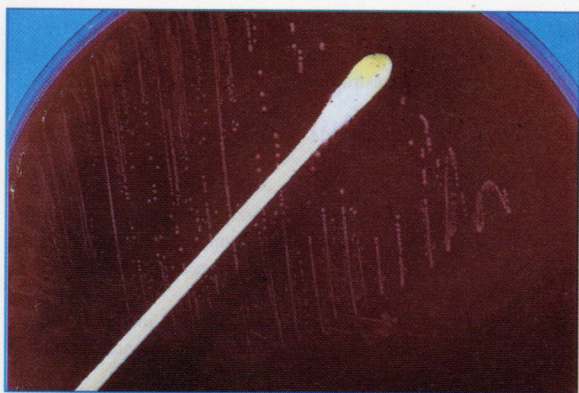
- F. *Streptococcus mitis* que crecen en agar sangre de carnero luego de 24 horas de incubación. Esta cepa particular parece ser γ -hemolítica o no hemolítica. Otras cepas de esta especie pueden ser α -hemolíticas.
- G. Panel de identificación API Strep inoculado con *S. mitis*. Esta fotografía muestra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:

VP	Negativa	HIP	Negativa	ESC	Negativa
PYRA	Negativa	α -GAL	Negativa	β -GUR	Negativa
β -GAL	Negativa	PAL	Positiva	LAP	Positiva

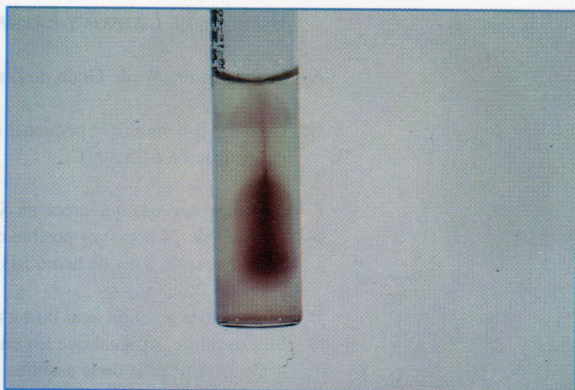
- H. Panel de identificación API Strep inoculado con *S. mitis*. Esta fotografía muestra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones son las siguientes:

ADH	Negativa	RIB	Negativa	ARA	Negativa
MAN	Negativa	SOR	Negativa	LAC	Positiva
TRE	Positiva	INU	Negativa	RAF	Negativa
AMD	Positiva	GLYG	Negativa	β HEM	Negativa

El biocódigo para las reacciones que se muestran en la lámina en color 13-4G y H es 0060411. La consulta con la base de datos computarizada API proporciona una identificación de esta cepa como *S. mitis* (80%)/*oralis* (20%). *S. mitis* y *S. oralis* pertenecen al "grupo mitis" de estreptococos viridans. Se ha demostrado que algunas cepas de *S. mitis* son resistentes a la penicilina y pueden ser resistentes también a otros antibióticos.



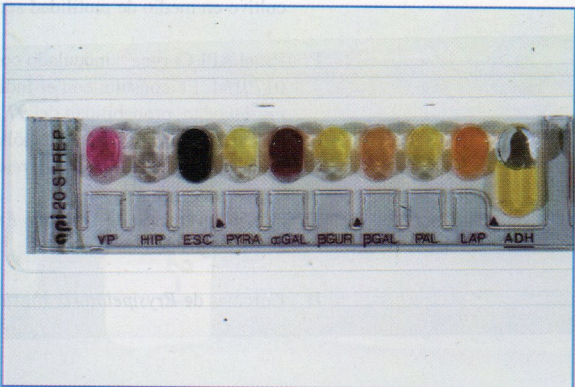
A



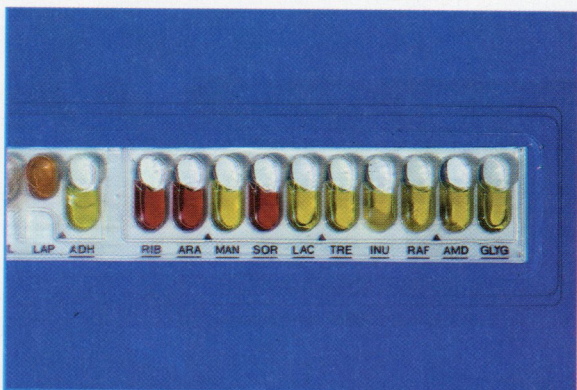
B



C



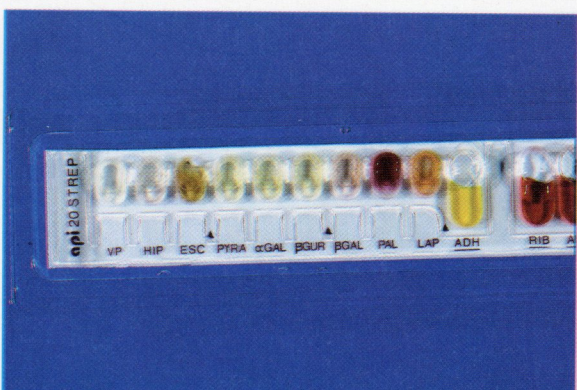
D



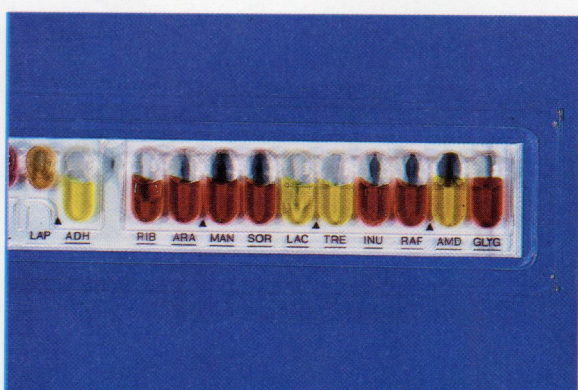
E



F



G



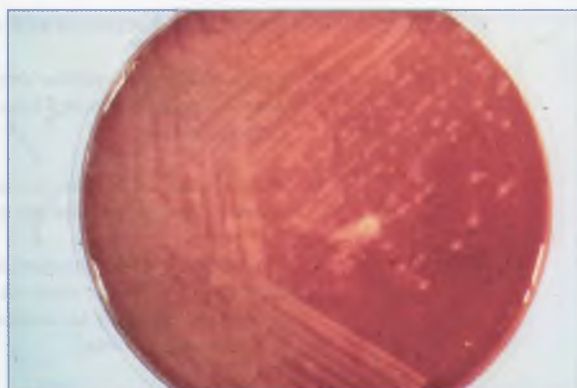
H

ESPECIES DE *LISTERIA* Y *ERYSIPELOTHRIX*

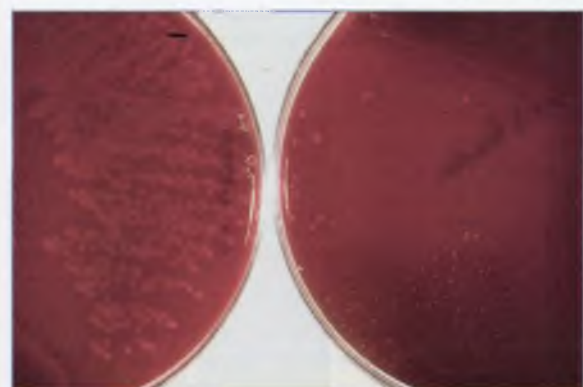
- A. Frotis con tinción de Gram de *Listeria monocytogenes*, que muestra bacilos grampositivos cortos.
- B. Colonias β -hemolíticas pequeñas de *L. monocytogenes* en agar sangre de carnero (SBA) después de 72 horas de incubación a 35-37 °C.
- C. *L. monocytogenes* que crece en SBA después de 24 horas (*izquierda*) y 48 horas (*derecha*) de incubación. Después de 24 horas, es posible que no sea obvia la naturaleza β -hemolítica del microorganismo. Después de 48 horas, la zona de hemólisis se extiende más allá del margen de la colonia, pero aún es algo sutil.
- D. *L. monocytogenes* en agar bilis esculina (*derecha*). El tubo de la izquierda es una porción inclinada de agar bilis esculina. Al igual que los enterococos, *L. monocytogenes* hidroliza la esculina en presencia de bilis al 40%. La hidrólisis de la esculina está indicada por el ennegrecimiento del medio.
- E. Zona de crecimiento en forma de paraguas producida por *Listeria monocytogenes* después de 24 horas de cultivo en medio de motilidad semisólido a 25 °C.
- F. Panel API Coryne® inoculado con *Listeria monocytogenes*. El biocódigo API de la cepa que se muestra es 0170164. La consulta con el Índice de perfiles API proporciona una identificación como "*L. monocytogenes/innocua*, probabilidad del 97,1%". La diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. innocua* está determinada por la evaluación de la hemólisis en agar sangre de carnero y por la reactividad de *L. monocytogenes* en la prueba de CAMP con *S. aureus*.
- G. Frotis con tinción de Gram de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que muestra los bacilos grampositivos delgados y largos de esta especie.
- H. Colonias de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en SBA después de 24 horas de incubación a 35 °C.



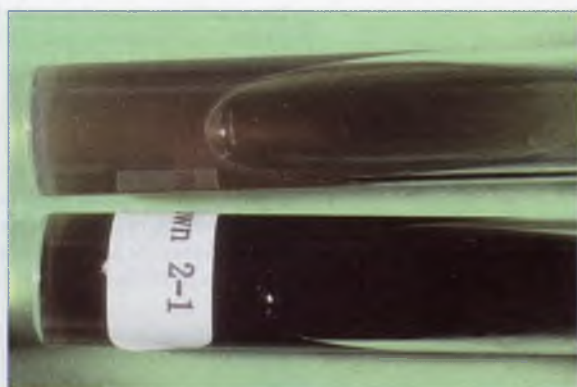
A



B



C



D



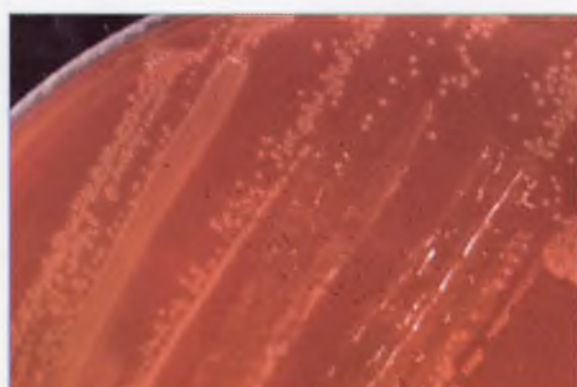
E



F



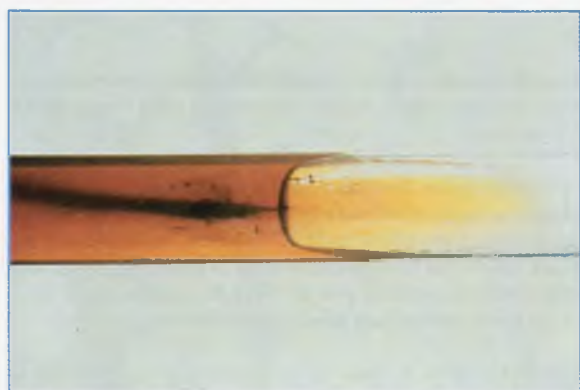
G



H

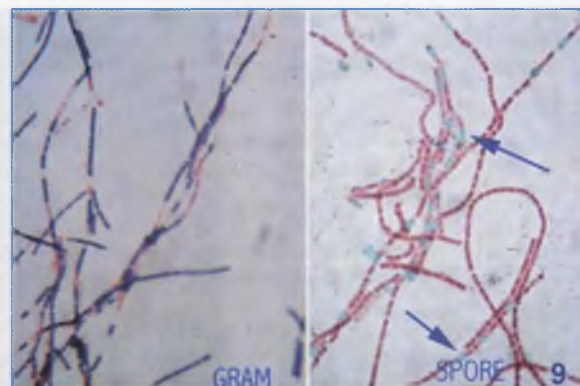
ESPECIES DE *ERYSIPELOTHRIX* Y *BACILLUS*

- A. *Erysipelothrix rhusiopathiae* después del cultivo durante toda la noche en un tubo inoculado por estría y punción en agar hierro de Kligler. Obsérvese la producción de H_2S a lo largo de la línea de punción en el extremo del tubo.
- B. Frotis con tinción de Gram de una especie de *Bacillus*. Obsérvese la presencia de endosporas centrales/terminales carentes de tinción que no edematizan la célula.
- C. Muestra macroscópica intestinal de un paciente que murió por carbunco gastrointestinal. Se observa el apéndice en la parte inferior izquierda de la fotografía. En general, las lesiones del carbunco gastrointestinal se observan en el ciego y las zonas adyacentes del intestino. Los síntomas son dolor abdominal, hematemesis y diarrea sanguinolenta.
- D. Tinción de Gram (*izquierda*) y tinción de esporas con verde de malaquita (*derecha*) de *B. anthracis*. *B. anthracis* crece como bacilos grampositivos algo grandes y las células individuales tienen extremos cuadrados o ligeramente cóncavos. A menudo los microorganismos están dispuestos en cadenas que tienen el aspecto del bambú como se muestra aquí. La tinción muestra las esporas ovoides que no edematizan la célula. (Cortesía de Elmer W. Koneman).
- E. Colonias no hemolíticas, mate y blanco hueso de *Bacillus anthracis* en SBA.
- F. Vista ampliada de colonias de *B. anthracis* en SBA. Las colonias tienen una morfología en vidrio esmerilado con excrecencias con forma de coma a lo largo de los bordes, como se muestra aquí. Estas excrecencias son incluso más evidentes desde el punto de vista microscópico. Las colonias han sido descritas como colonias “en cabeza de Medusa”, en alusión a la hechicera griega cuya cabellera estaba compuesta por serpientes. (Cortesía de Elmer W. Koneman).
- G. Vista ampliada de las colonias no hemolíticas rugosas de *B. anthracis*. Se han tocado algunas con un ansa inoculadora, lo que provoca que las colonias “se paren” como claras de huevo batido.
- H. Grandes colonias β -hemolíticas de *Bacillus cereus* en SBA. *B. cereus* es una de las especies de *Bacillus* aisladas con mayor frecuencia en el laboratorio clínico. A diferencia de *B. anthracis*, esta especie es β -hemolítica, móvil y β -lactamasa positiva.



A

B



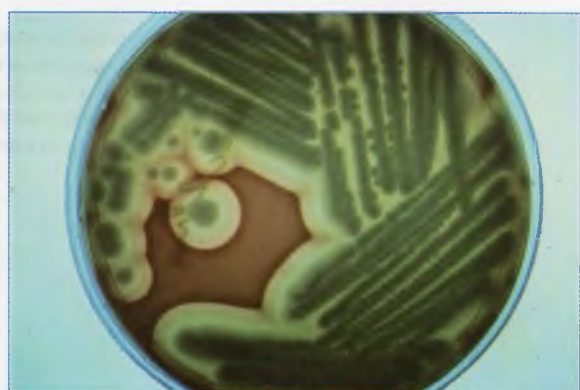
C

D



E

F



G

H

ESPECIES DE *CORYNEBACTERIUM*

- A. Frotis con tinción de Gram que muestra la morfología típica de los miembros del género *Corynebacterium*. Se pueden observar en esta fotografía bacilos de forma regular, bacilos con forma de porra ("en maza") y disposiciones celulares "en letras chinas" y "en cerca".
- B. Agar BHI inoculado con una especie de *Corynebacterium* lipofílica y una no lipofílica. Del lado derecho de la placa, se ha inoculado una especie lipofílica como un césped sobre la placa y se ha colocado una gota de Tween 80 al 0,1% en el centro del inóculo. Se inocula una especie no lipofílica de *Corynebacterium* como un césped sobre la mitad izquierda de la placa. Después de la incubación durante 24 horas a 35-37 °C, sólo se observa crecimiento de la especie lipofílica donde se colocó la gota de Tween 80, mientras que la especie no lipofílica crece en toda la superficie del medio sobre el lado derecho de la placa.
- C. *Corynebacterium amycolatum* que crece en SBA después de 3 días de incubación a 35 °C. Obsérvese el aspecto mate y seco de las colonias y el crecimiento "rugoso" en áreas confluentes. *C. amycolatum* es la especie de *Corynebacterium* aislada más a menudo y se encuentra sobre la piel.
- D. Panel API Coryne® inoculado con *Corynebacterium amycolatum*. Esta fotografía ilustra primero la mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

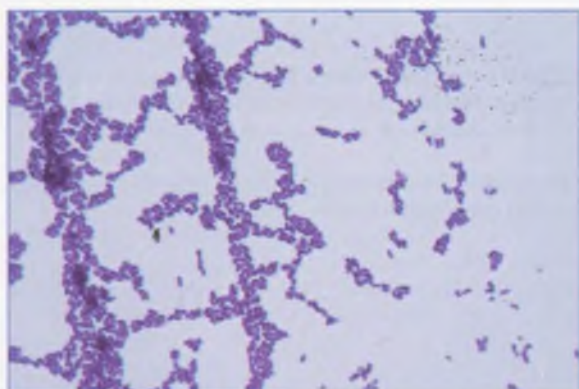
NIT	Positiva	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Negativa	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa				

- E. Panel API Coryne inoculado con *Corynebacterium amycolatum*. Esta fotografía ilustra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

GEL	Negativa	Control CHO	Negativa		
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Negativa	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API Coryne para las reacciones que se muestran en la lámina en color 14-3D y E es 3100305, que da una identificación cruzada de *Corynebacterium* del grupo G, *C. striatum* o *C. amycolatum*. *C. amycolatum* es no lipofílico, mientras que las cepas de corineformes del grupo G son lipofílicas, de modo que este microorganismo no es un corineforme del grupo G. Se necesitan otras pruebas (p. ej., cromatografía gas-líquido de cultivos en caldo de glucosa) para diferenciar *Corynebacterium amycolatum* y *Corynebacterium striatum* entre sí. Esta cepa produjo ácido propiónico a partir de glucosa según lo determinó el análisis mediante cromatografía gas-líquido del caldo de cultivo, de modo que este microorganismo puede ser diferenciado de *C. amycolatum*.

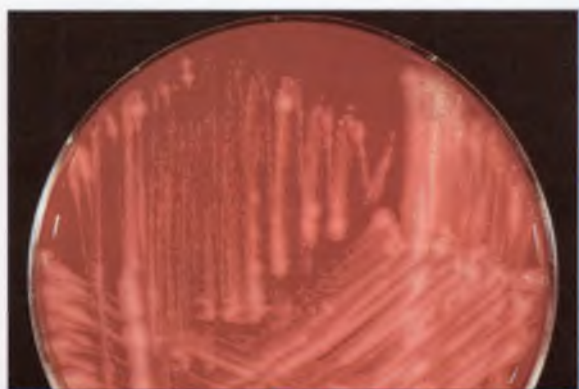
- F. Inflamación local y formación de pseudomembranas en la orofaringe producida por cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae*.
- G. Cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* en agar de Tinsdale modificado. En este medio, *C. diphtheriae* crece como colonias negras con halos pardos. Las cepas cuyas colonias tienen esta morfología son identificadas inicialmente como *C. diphtheriae* y el examen ulterior requiere demostrar la producción de toxina diftérica.
- H. Cultivo de *C. diphtheriae* en medio de suero coagulado de Loeffler. Este medio es inoculado con material proveniente de la faringe posterior (la pseudomembrana diftérica), se prepara un frotis después de unas 8 horas de incubación y se tiñe con azul de metileno. Como se muestra aquí, *C. diphtheriae* aparece como bacilos arrosariados pleomorfos. El aspecto arrosariado se debe a la producción de gránulos metacromáticos por el microorganismo en este medio.



A



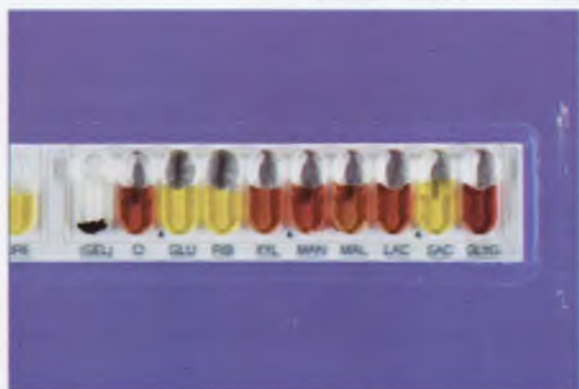
B



C



D



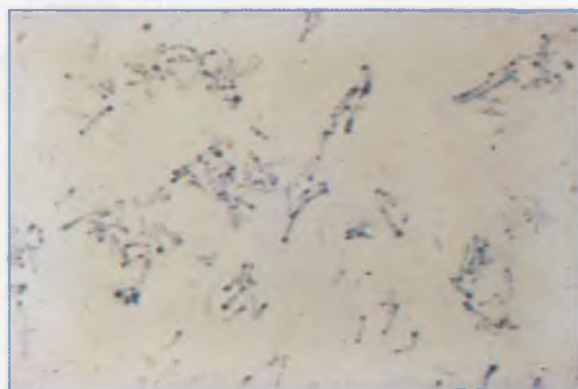
E



F



G



H

ESPECIES DE *CORYNEBACTERIUM* (CONTINUACIÓN)

A. Cultivo de *C. diphtheriae* en SBA después de 24 horas de incubación a 35 °C. Las colonias de este microorganismo son no lipofílicas, blancas y cremosas. Esta cepa fue inoculada en el sistema de identificación API Coryne, y las reacciones bioquímicas para la identificación se muestran en **B** y **C** a continuación.

B. Panel API Coryne® inoculado con *C. diphtheriae*. Esta fotografía ilustra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

NIT	Positiva	PYZ	Negativa	PYRA	Negativa
PAL	Negativa	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Positiva	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa				

C. Panel API Coryne inoculado con *C. diphtheriae*. Esta fotografía ilustra la otra mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

GEL	Negativa	Control CHO	Negativa		
GLU	Positiva	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API Coryne para estas reacciones es 1010124, que corresponde a una identificación de *Corynebacterium diphtheriae* (probabilidad del 97,8%). Se deben realizar otras pruebas para determinar si la cepa produce toxina diftérica.

D. *Corynebacterium jeikeium* en SBA después de 48 horas de incubación a 35-37 °C. Esta especie lipofílica produce colonias no hemolíticas pequeñas en SBA.

E. Panel API Coryne inoculado con *Corynebacterium jeikeium*. Esta fotografía ilustra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Negativa	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa				

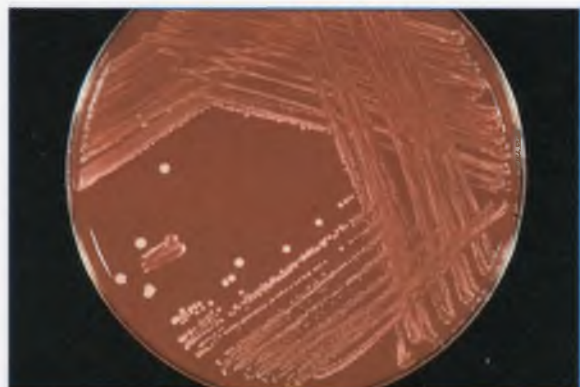
F. Panel API Coryne inoculado con *C. jeikeium*. Esta fotografía ilustra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

GEL	Negativa	Control CHO	Negativa		
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Negativa	LAC	Negativa
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Negativa

El biocódigo API Coryne para estas reacciones es 2100304, que corresponde a la identificación de *C. jeikeium* (93,6% de probabilidad).

G. Frotis con tinción de Gram que muestra los bacilos grampositivos algo pletóricos de *Corynebacterium glucuronolyticum* ("*C. seminale*").

H. *C. glucuronolyticum* en SBA después de 24 horas de incubación a 35-37 °C.



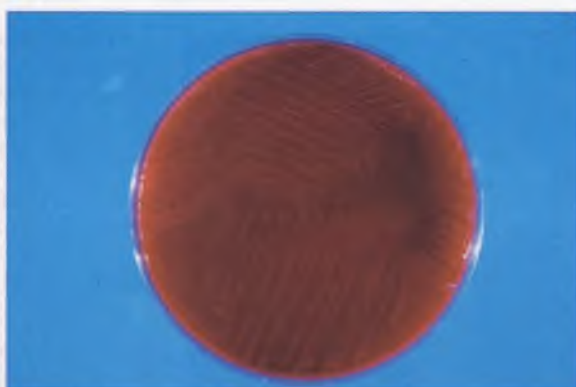
A



B



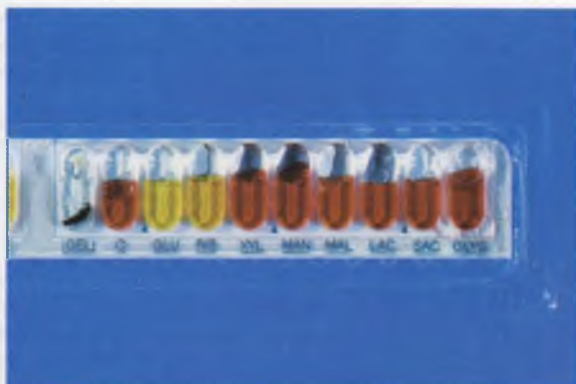
C



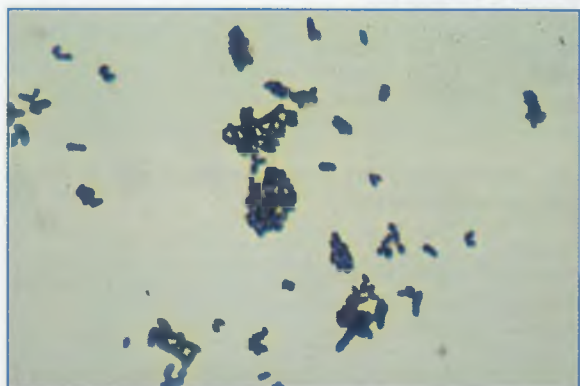
D



E



F



G



H

ESPECIES DE *CORYNEBACTERIUM* (CONTINUACIÓN)

- A. Panel API Coryne® inoculado con *C. glucuronolyticum*. Esta fotografía ilustra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Negativa	β -GUR	Positiva	β -GAL	Negativa
α -GLU	Negativa	β -NAG	Negativa	ESC	Positiva
URE	Positiva				

- B. Panel API Coryne inoculado con *C. glucuronolyticum*. Esta fotografía ilustra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

GEL	Negativa	Control CHO	Negativa		
GLU	Positiva	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 2241125, que corresponde a una identificación de *C. glucuronolyticum* (probabilidad del 99,9%). Esta especie ha sido aislada en muestras de semen y es la única especie de *Corynebacterium* que es β -glucuronidasa (β -GUR) positiva. Esta especie también fue descrita por otro grupo de investigadores y recibió el nombre de "*C. seminale*". Sin embargo, el nombre "*C. glucuronolyticum*" tiene precedentes taxonómicos.

- C. Colonias cremosas, lisas, no lipofílicas y no hemolíticas de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* que crecen en SBA después de 24 horas a 35-37 °C.

- D. Panel API Coryne inoculado con *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

NIT	Positiva	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Negativa	β -GUR	Negativa	β -GAL	Negativa
α -GLU	Negativa	β -NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Positiva	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Negativa	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Negativa	LAC	Negativa
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 3001004, que corresponde a una identificación de *C. pseudodiphtheriticum* (probabilidad del 96,7%).

- E. Colonias cremosas, no lipofílicas y no hemolíticas de *C. riegliei* en SBA después de 24 horas de incubación a 35-37 °C.

- F. Reacción de ureasa rápida de *C. riegliei*. *C. riegliei*, al igual que *C. urealyticum*, es rápidamente ureasa positivo. Esta fotografía muestra un "pico de flauta" de agar urea sin sembrar (arriba) y un pico de flauta de agar urea inoculado con *C. riegliei* (abajo). Esta reacción fue fotografiada una vez incubado el pico de flauta a la derecha durante 30 minutos a 35-37 °C.

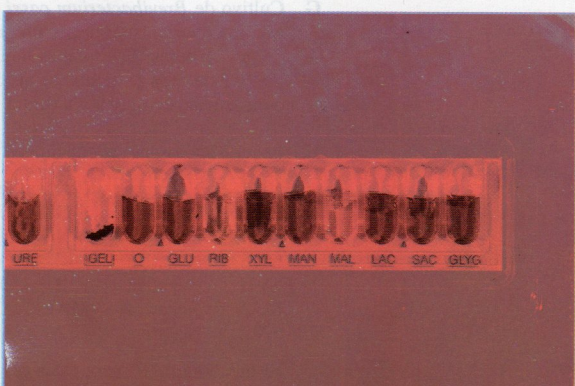
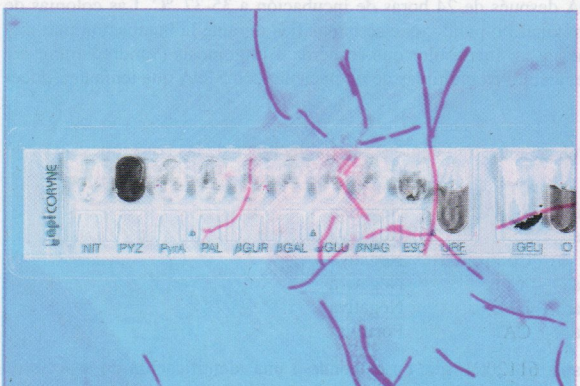
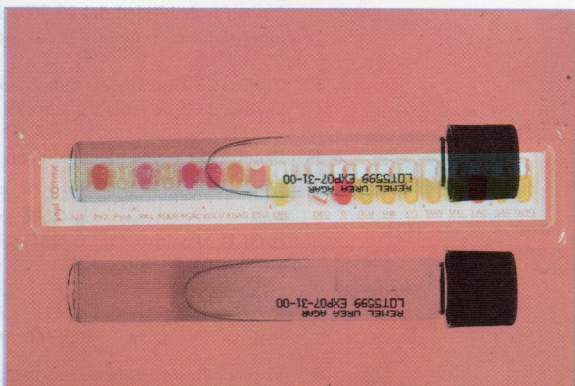
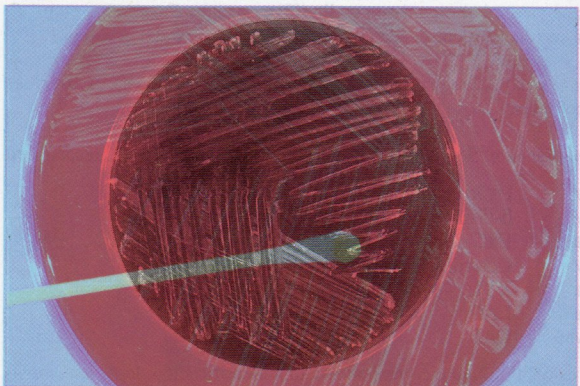
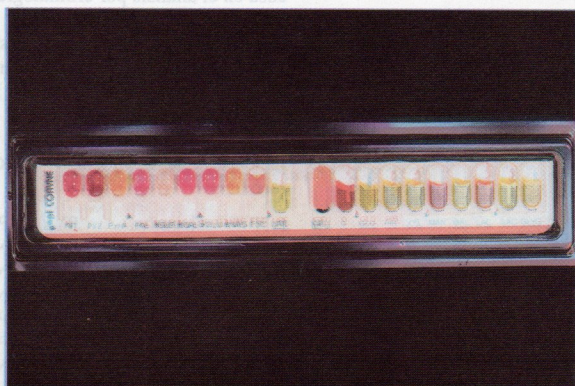
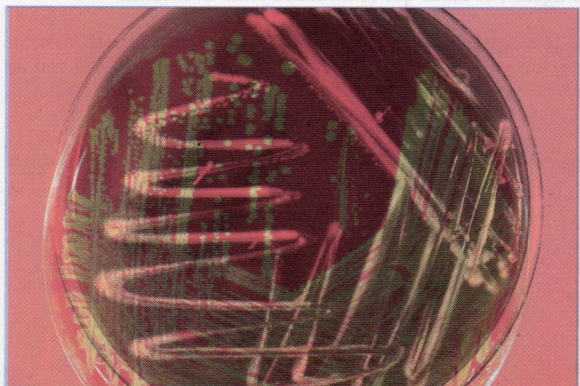
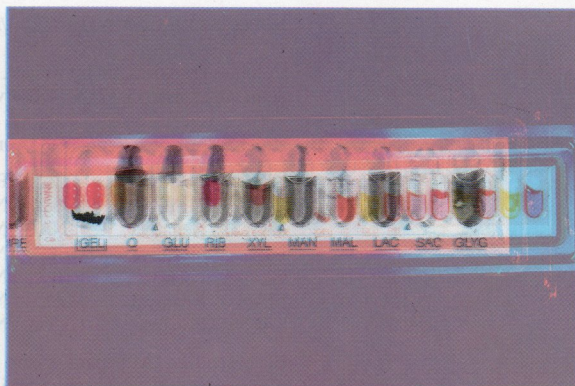
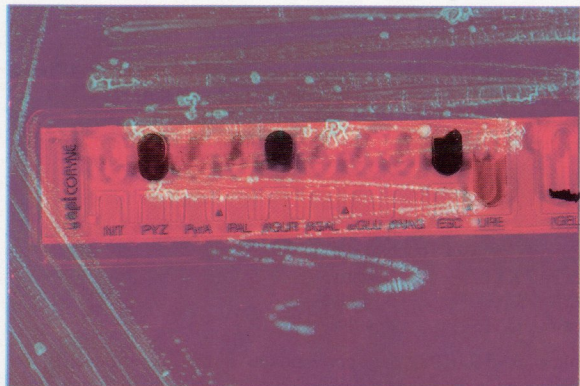
- G. Panel API Coryne inoculado con *C. riegliei*. Esta fotografía ilustra la primera mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Negativa	β -GUR	Negativa	β -GAL	Negativa
α -GLU	Negativa	β -NA	Negativa	ESC	Negativa
URE	Positiva				

- H. Panel API Coryne inoculado con *C. riegliei*. Esta fotografía ilustra la segunda mitad del panel de identificación. Las interpretaciones de las reacciones que se muestran son:

GEL	Negativa	Control CHO	Negativa		
GLU	Negativa	RIB	Positiva	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 2001204. Este biocódigo no está incluido en la base de datos de API Coryne en la actualidad, pero es el mismo publicado con la descripción original de esta nueva especie. *C. riegliei* se asocia con infecciones urinarias. Además de ser rápidamente ureasa positiva, esta especie también es atípica en que produce ácido a partir de maltosa y ribosa, pero no de glucosa, como se muestra aquí.



ESPECIES DE *CORYNEBACTERIUM*, *ARCANOBACTERIUM* Y *BREVIBACTERIUM*

- A. Colonias cremosas, no lipofílicas, no hemolíticas de *Corynebacterium striatum* en SBA después de 48 horas de incubación a 35-37 °C. Obsérvese la morfología "en diana" de las colonias individuales.

- B. Panel API Coryne® inoculado con *C. striatum*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Positiva	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Negativa	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Negativa	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 3100105, que corresponde a una identificación del *Corynebacterium* del grupo C, 55,5%/*C. striatum-amycolatum*, 43,6%. Como las cepas grupo G son lipofílicas, este microorganismo es *C. striatum* o *C. amycolatum* y no produjo ácido propiónico a partir de glucosa en el análisis por cromatografía gas-líquido, de modo que se identifica como *C. striatum*.

- C. *Corynebacterium* del grupo G después de 24 horas de incubación a 35-37 °C. Después de 24 horas, las colonias individuales son extremadamente pequeñas y ocurre un buen crecimiento sólo en las áreas con un inóculo importante. Esta especie lipofílica ha sido aislada en muestras de vítreo, sangre, líquido cefalorraquídeo y aparato urogenital.

- D. Panel API Coryne inoculado con *Corynebacterium* del grupo G. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Negativa	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 2100325. La consulta con una base de datos computarizada proporciona una identificación de *Corynebacterium* del grupo G (probabilidad del 76,6%)/*C. striatum/amycolatum* (probabilidad del 22,7%). Dado que este microorganismo es lipofílico y tanto *C. striatum* como *C. amycolatum* son no lipofílicos, esta cepa puede ser identificada como *Corynebacterium* del grupo G.

- E. Cultivo de *Arcanobacterium haemolyticum* en SBA luego de 48 horas de incubación a 35-37 °C. Obsérvese la zona de β-hemólisis que rodea a las colonias.

- F. Panel API Coryne inoculado con *A. haemolyticum*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Positiva
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Positiva
α-GLU	Positiva	β-NAG	Positiva	ESC	Negativa
URE	Negativa	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Positiva
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Negativa

El biocódigo API para estas reacciones es 6530360, que corresponde a una identificación de *A. haemolyticum* del 99,9% (identificación excelente).

- G. Cultivo de *Brevibacterium casei* en SBA después de 24 horas de incubación a 35-37 °C. Las colonias de este microorganismo tienen un pigmento amarillo pálido, que se intensifica durante la incubación más allá de las 24 horas. Estas cepas también tienen un fuerte olor que recuerda a la gomosis ("podredumbre del pie"). Esta cepa particular se aisló en hemocultivos múltiples de un paciente con SIDA que tenía una infección asociada con una vía central.

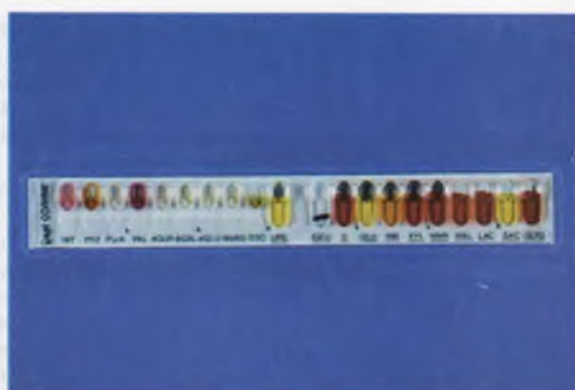
- H. Panel API Coryne inoculado con *B. casei*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Positiva
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Positiva	β-NAG	Negativa	ESC	Negativa
URE	Negativa	GEL	Positiva	Control CHO	Negativa
GLU	Negativa	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Negativa	LAC	Negativa
SAC	Negativa	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

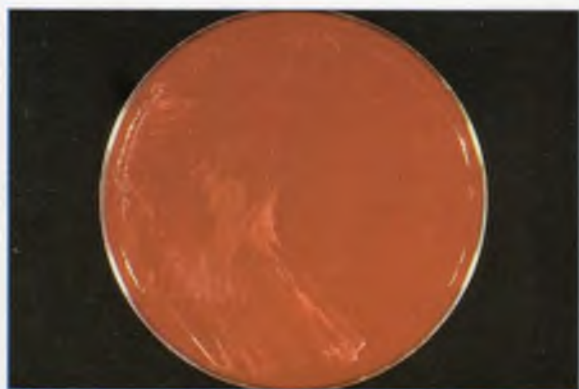
El biocódigo API para estas reacciones es 6112004, que corresponde a una identificación de especie de *Brevibacterium*. Pruebas adicionales confirmaron que la cepa de este hemocultivo era en efecto *B. casei*.



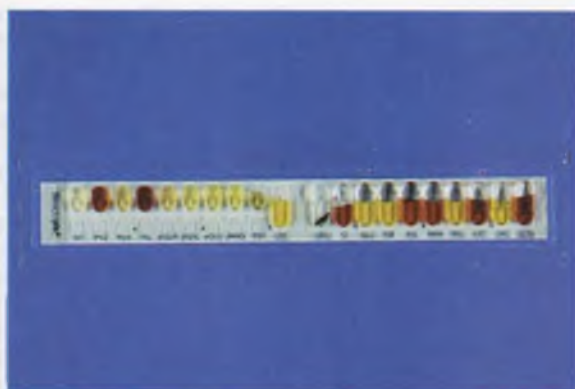
A



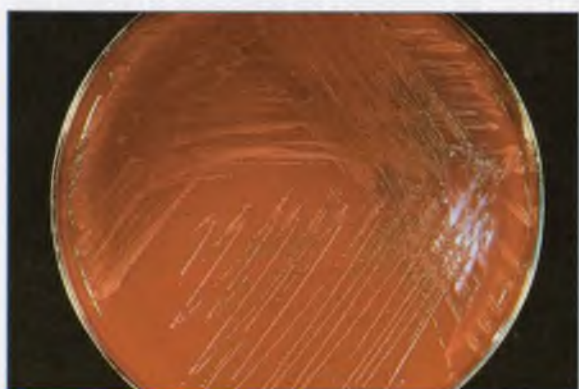
B



C



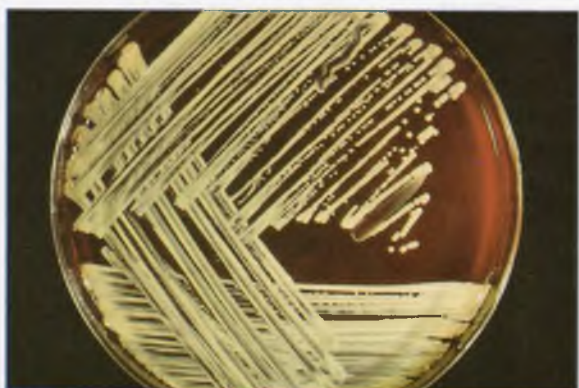
D



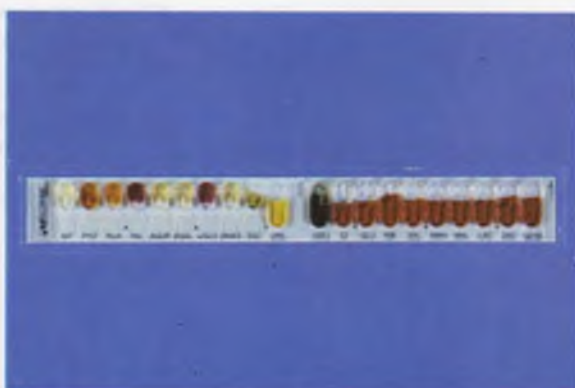
E



F



G



H

ESPECIES DE *ROTHIA*, *CELLULOSIMICROBIUM*, *CELLULOMONAS*/MICROBACTERIUM Y *LACTOBACILLUS*

- A. Crecimiento de *Rothia dentocariosa* en SBA después de 48 horas de incubación a 35-37 °C. Este microorganismo bacilar grampositivo está relacionado con microorganismos nocardiformes y forma colonias secas, blancas y cerebriformes en medios de agar, como se muestra aquí.

- B. Panel API Coryne® inoculado con *R. dentocariosa*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Positiva	PYZ	Positiva	PYRA	Positiva
PAL	Negativa	β-GUR	Negativa	β-GAL	Negativa
α-GLU	Positiva	β-NAG	Negativa	ESC	Positiva
URE	Negativa	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Negativa	XYL	Negativa
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Negativa	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 7050125, que corresponde a una identificación de *R. dentocariosa*, con una probabilidad del 99,5%.

- C. Cultivo de *Cellulosimicrobium cellulans* en SBA después de 24 horas a 35-37 °C. Este microorganismo de pigmento amarillo brillante era denominado antes *Oerskovia xanthineolytica*.

- D. Panel API Coryne inoculado con *C. cellulans*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Positiva	PYZ	Positiva	PYRA	Positiva
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Positiva
α-GLU	Positiva	β-NAG	Positiva	ESC	Positiva
URE	Negativa	GEL	Positiva	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Positiva
MAN	Negativa	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Positiva	CAT	Positiva

El biocódigo API para estas reacciones es 7572727, que corresponde a una identificación de *Oerskovia xanthineolytica* (*C. cellulans*), con una probabilidad del 99,9%.

- E. Cultivo de una especie de *Microbacterium* con pigmentación amarilla en SBA después de 24 horas a 35-37 °C.

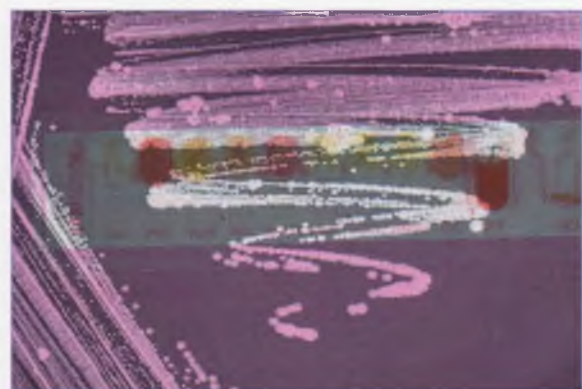
- F. Panel API Coryne inoculado con especies de *Microbacterium*. Se muestran aquí las interpretaciones de las reacciones:

NIT	Negativa	PYZ	Positiva	PYRA	Negativa
PAL	Positiva	β-GUR	Negativa	β-GAL	Positiva
α-GLU	Positiva	β-NAG	Positiva	ESC	Positiva
URE	Negativa	GEL	Negativa	Control CHO	Negativa
GLU	Positiva	RIB	Positiva	XYL	Positiva
MAN	Positiva	MAL	Positiva	LAC	Negativa
SAC	Positiva	GLYG	Positiva	CAT	Positiva

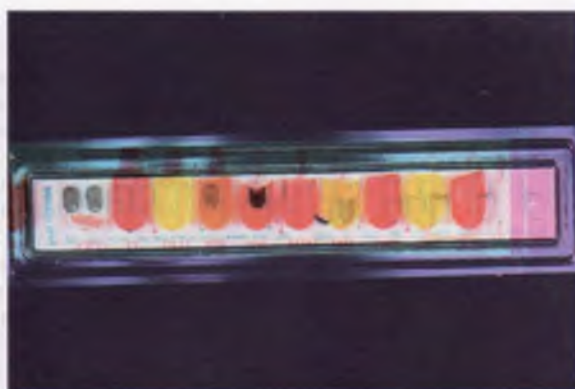
El biocódigo API para este microorganismo es 2570737, que corresponde a una identificación de especies de *Cellulomonas*/especies de *Microbacterium* (probabilidad del 99,9%). Se necesitan otras pruebas para separar estos dos géneros.

- G. Frotis con tinción de Gram de un hemocultivo que dio especies de *Lactobacillus*. Estos microorganismos son bacilos grampositivos regulares que se presentan solos, de a pares o en cadenas cortas.

- H. Colonias pequeñas de una especie de *Lactobacillus* no hemolítica que crece en SBA después de 24 horas de incubación a 35-37 °C.



A



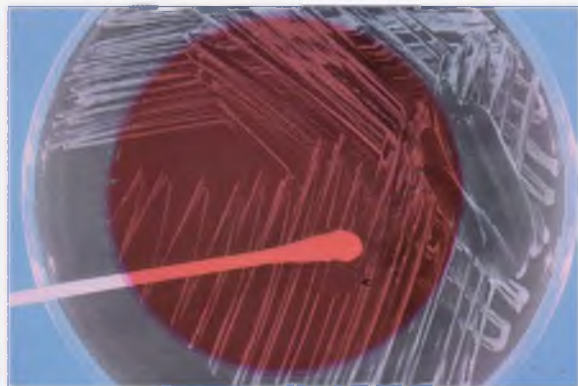
B



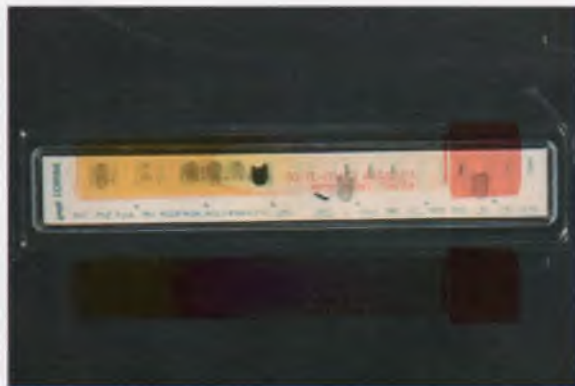
C



D



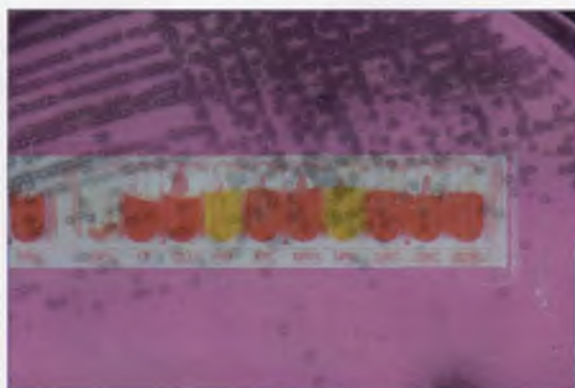
E



F



G



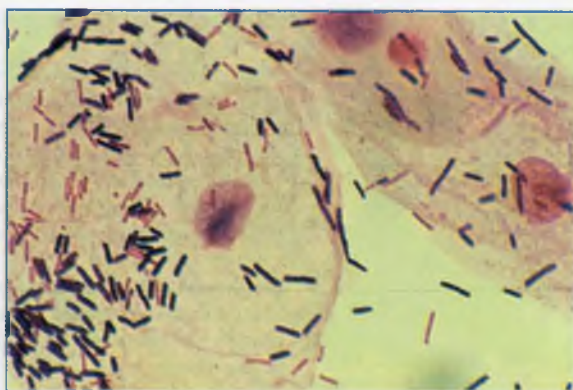
H

ESPECIES DE *LACTOBACILLUS* Y *GARDNERELLA*

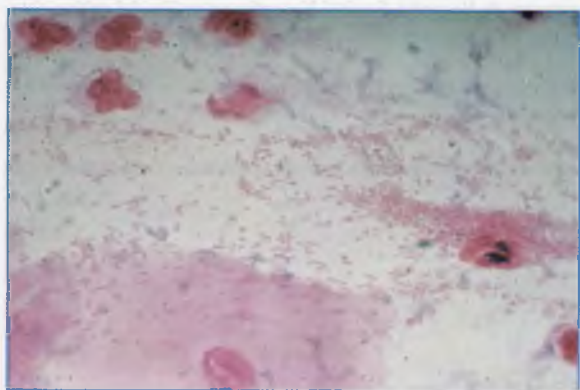
- A. Especies de *Lactobacillus* inoculadas como un césped en una placa de SBA con un disco de vancomicina. Algunos lactobacilos son resistentes a los antibióticos glucopéptidos vancomicina y teicoplanina, como lo indica el crecimiento de los microorganismos hasta el borde del disco de vancomicina que se muestra aquí.
- B. Frotis con tinción de Gram de una muestra vaginal normal. Obsérvese la presencia de las grandes células epiteliales y los bacilos grampositivos que corresponden al "morfotipo de lactobacilo".
- C. Frotis con tinción de Gram de material recogido de la vagina de una paciente con vaginosis bacteriana. La célula epitelial que se muestra en el portaobjetos está cubierta por una preponderancia de bacilos y cocobacilos gramnegativos, que representan bacilos gramnegativos anaerobios y "morfotipos de *Gardnerella*".
- D. Cultivo de *G. vaginalis* en agar sangre CNA con 48 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Después de este período, las colonias son muy pequeñas y es mejor observarlas en áreas de crecimiento confluyente.
- E. Colonias β-hemolíticas pequeñas de *Gardnerella vaginalis* que crece en medio HBT (bicapa de sangre humana-Tween) después de 72 horas de incubación a 35-37 °C en CO₂ al 5-7%. Este microorganismo es β-hemolítico en medio que contiene sangre humana (al igual que agar HBT).
- F. Técnica de utilización rápida de hidratos de carbono para la identificación de *G. vaginalis*. Este procedimiento de identificación de 4 horas es similar al utilizado para la identificación de especies de *Neisseria* (cap. 11). Se fraccionan en tubos pequeños volúmenes de 0,10 mL una solución salina amortiguada con rojo fenol y sin hidratos de carbono (BSS) y se agrega una gota de hidratos de carbono esterilizados con filtro a la BSS. Se prepara una suspensión densa del microorganismo en BSS sin hidratos de carbono (0,5 mL) y se agrega una gota de esta suspensión a los tubos que contienen hidratos de carbono. En la fotografía, los tubos individuales son (*de izquierda a derecha*) la suspensión del microorganismo en BSS, BSS-glucosa, BSS-maltosa y BSS-manitol. El último tubo (*extremo derecho*) es una prueba de hidrólisis de hipurato. Como se muestra, *G. vaginalis* produce ácido a partir de glucosa y maltosa, pero no de manitol, y es fuertemente hidrólisis de hipurato positivo.



A



B



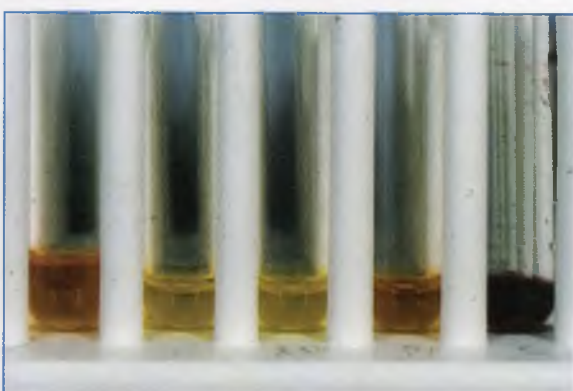
C



D



E



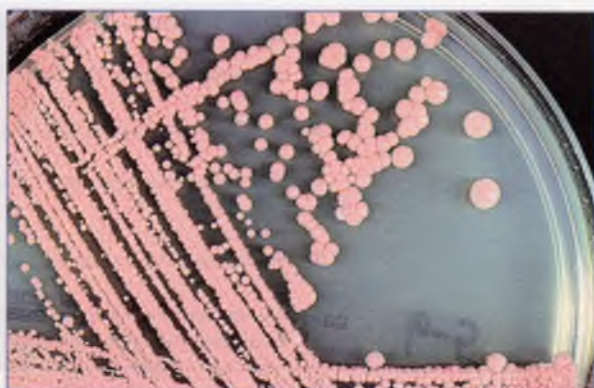
F

IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS

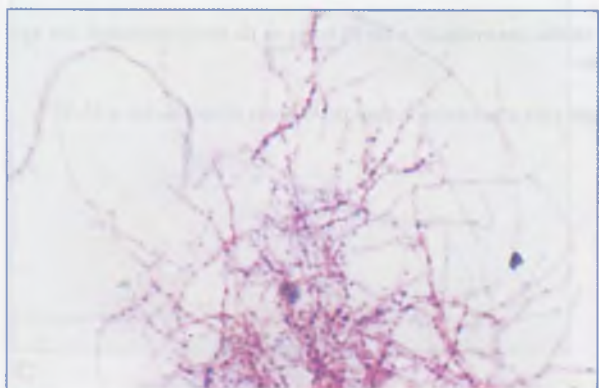
- A. Vista ampliada de *Nocardia asteroides* después de 7 días de incubación a 30 °C en agar de Middlebrook 7H11. Se observan aquí las colonias onduladas, lisas y anaranjadas típicas que tienden a adherirse a la superficie del agar. Otras especies producen colonias correosas, secas y blancas (véase lámina en color 1-5J). Cabe mencionar que las especies de *Nocardia* crecen en los medios de aislamiento selectivos utilizados para aislar las especies de *Mycobacterium*; de hecho, el diagnóstico de laboratorio de nocardiosis a menudo se sospecha por primera vez en la sección de micobacteriología del laboratorio. Reconocer el olor a “sótano húmedo” característico es un dato inicial útil para la identificación.
- B. Crecimiento de un cultivo de especies de *Rhodococcus* luego de 48 horas de inoculación en una placa de agar de Middlebrook 7H11. Las colonias son relativamente grandes, varían en tamaño de 2 a 4 mm de diámetro, y son enteras y lisas. Obsérvese la pigmentación rosa salmón, un dato inicial para la identificación de esta especie.
- C. Tinción ácido-alcohol resistente parcial de un exudado que contiene filamentos ramificados delicados ácido-alcohol resistentes característicos de las especies de *Nocardia*. Se aisló *Nocardia asteroides* del cultivo obtenido de esta muestra.
- D. Tinción de Gram de las especies de *Rhodococcus* que muestra cocobacilos grampositivos cortos dispuestos solos y en grupos en forma de caracteres chinos.
- E. Tinción ácido-alcohol resistente de especies de *Rhodococcus*. Se observan cocobacilos cortos, muchos de los cuales son ácido-alcohol resistentes.



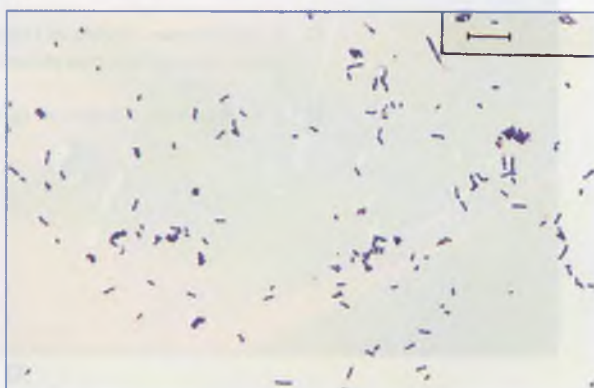
A



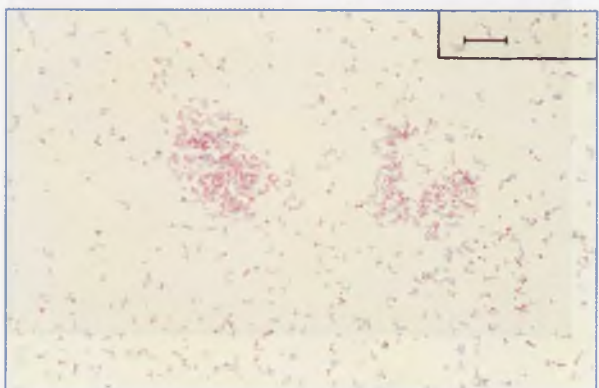
B



C



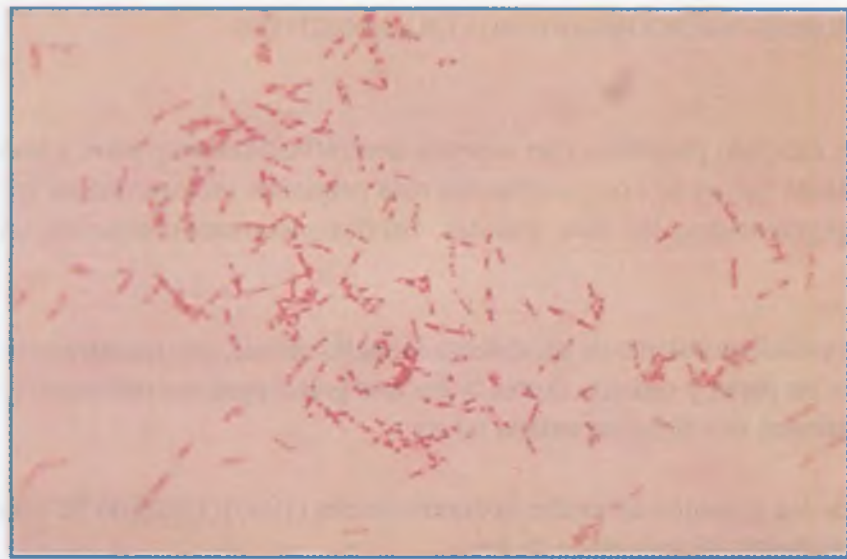
D



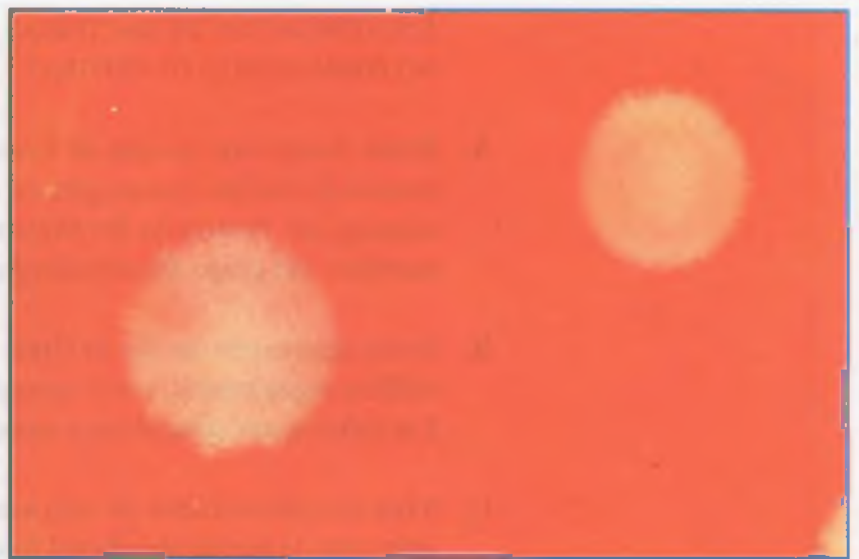
E

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS: BACILOS GRAMNEGATIVOS

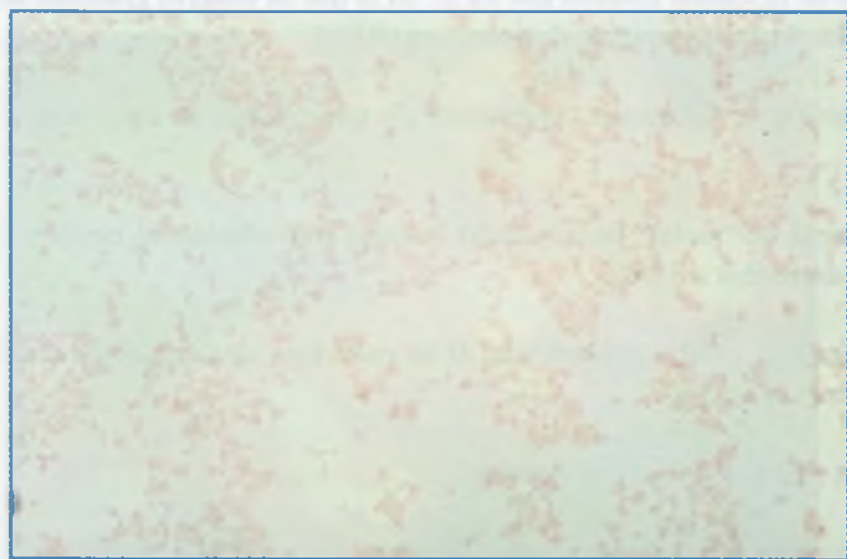
- A. *Bacteroides fragilis*. Tinción de Gram de células a las 48 horas de un cultivo en caldo de tioglicolato.
- B. *B. fragilis*. Colonias en agar sangre para anaerobios después de 48 horas de incubación a 35 °C.
- C. *Prevotella melaninogenica*. Tinción de Gram de las células de una colonia luego de 48 horas del cultivo en agar sangre.
- D. *P. melaninogenica*. Colonias negras en agar sangre después de 5 días de incubación a 35 °C.
- E. *Fusobacterium nucleatum*. Tinción de Gram de las células de una colonia luego de 48 horas en agar sangre para anaerobios. Nótese bacilos gramnegativos alargados con extremos aguzados.
- F. *F. nucleatum*. Colonias características desarrolladas en agar sangre para anaerobios después de 48 horas de incubación a 35 °C, que ilustra el efecto opalescente.
- G. *F. necrophorum*. Tinción de Gram de células desarrolladas a las 48 horas en un medio anaerobio con agar sangre. Se evidencia gran pleomorfismo.
- H. *F. necrophorum*. Colonias en agar sangre para anaerobios después de 48 horas de incubación a 35 °C.



A



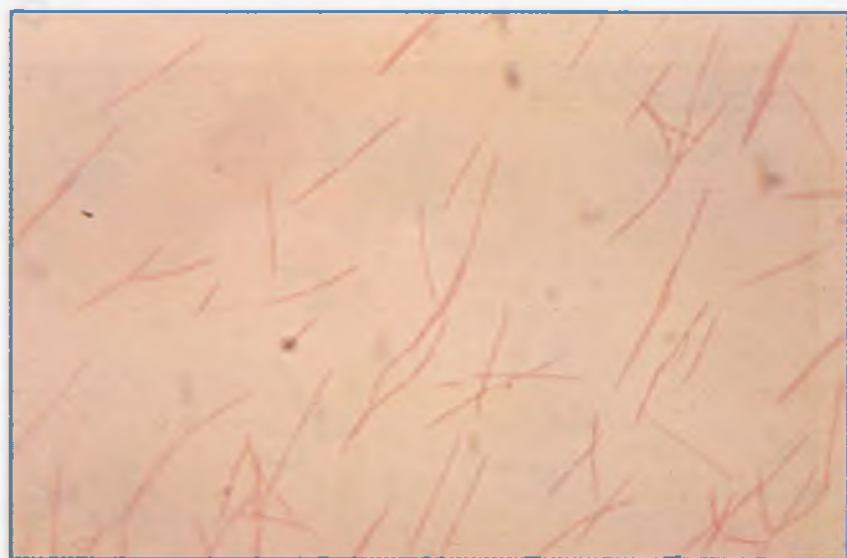
B



C



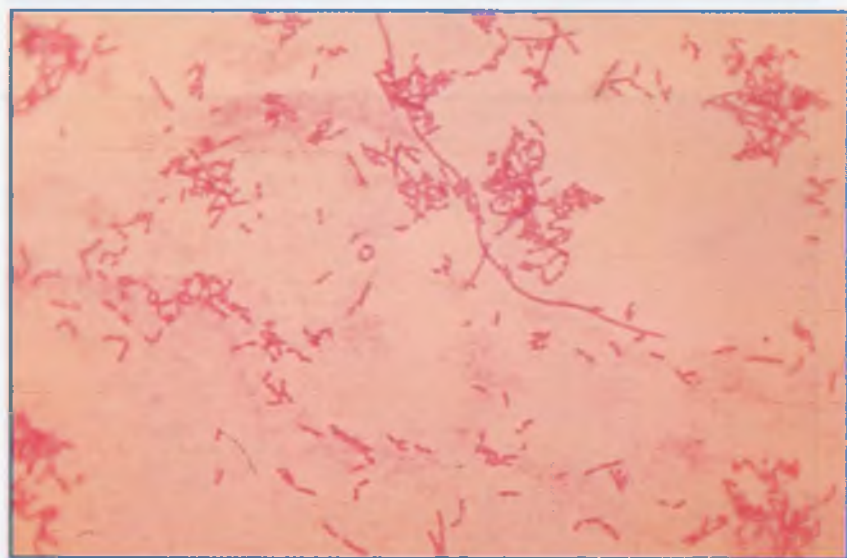
D



E



F



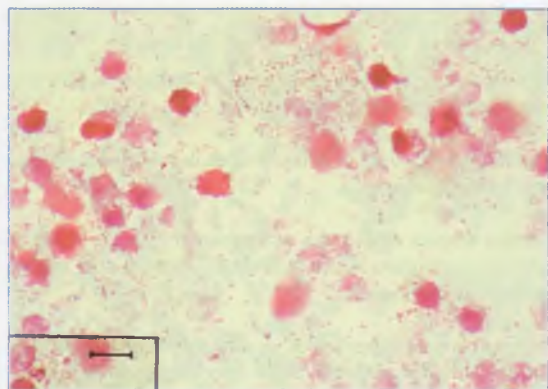
G



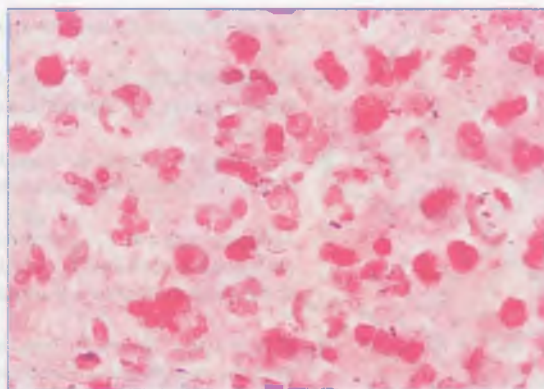
H

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS: MICROORGANISMOS GRAMPOSITIVOS
NO FORMADORES DE ESPORAS

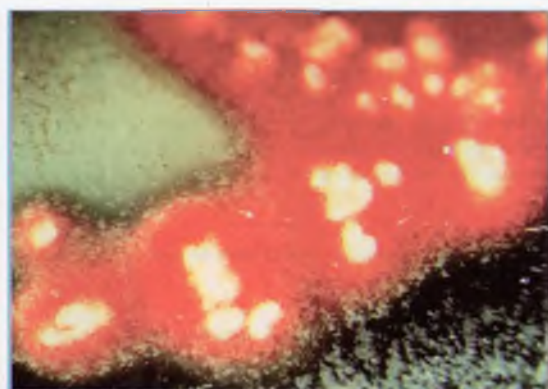
- A. Frotis directo con tinción de Gram de un exudado purulento que muestra neutrófilos desintegrados y una mezcla de bacilos gramnegativos de distintos tamaños. Los cocobacilos más pequeños indican una de las especies de *Prevotella-Porphyromonas* pigmentadas; los más grandes, bacilos pleomorfos sugieren un miembro del grupo *Bacteroides fragilis*.
- B. Frotis directo con tinción de Gram de un exudado purulento de un absceso intraabdominal, que muestra neutrófilos segmentados, cocos grampositivos en pares y cadenas cortas, y bacilos gramnegativos minúsculos. Las infecciones anaerobias a menudo contienen una flora bacteriana mixta.
- C. Vista con microscopio de bajo aumento de los gránulos de azufre actinomicóticos (10×). (Exudado de una infección de herida abdominal fotografiada dentro de una placa de Petri).
- D. Aspecto de un frotis con tinción de Gram de la misma muestra que en C, en la que se observa gránulos de azufre con filamentos ramificados delgados de una especie de *Actinomyces* (800×).
- E. *Actinomyces israelii*. Preparación con tinción de Gram del crecimiento de una colonia en agar sangre. Nótese las células ramificadas.
- F. *A. israelii*. Colonias características en forma de "molar" desarrolladas en agar con infusión de cerebro y corazón después de 7 días de incubación anaerobia a 35 °C.
- G. *Eubacterium alactolyticum*. Tinción de Gram de células provenientes de un cultivo en caldo de tioglicolato enriquecido después de 48 horas de incubación a 35 °C.
- H. *E. alactolyticum*. Colonias de 48 horas en agar sangre para anaerobios.



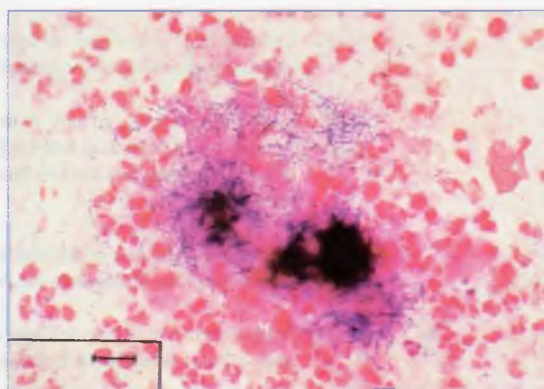
A



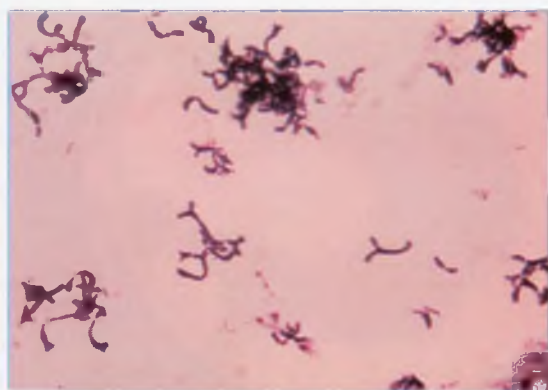
B



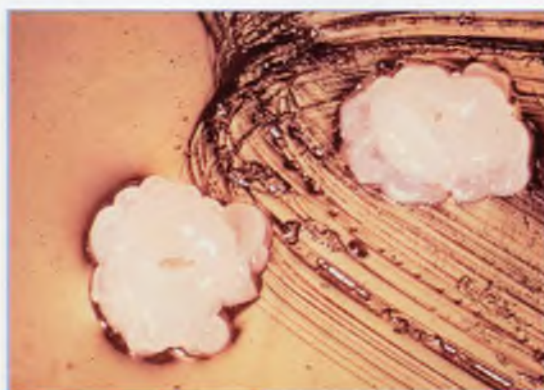
C



D



E



F



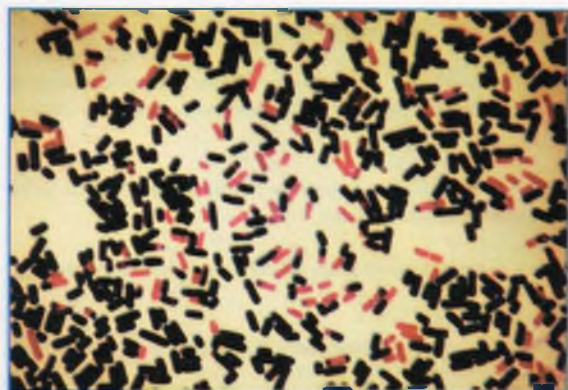
G



H

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS: CLOSTRIDIOS

- A. *Clostridium perfringens*. Tinción de Gram de células de una colonia de 24 horas en agar sangre. Nótese la falta de esporas y de algunas células que tienden a teñirse de rojo (gramnegativas).
- B. *C. perfringens*. Tinción de Gram de células a partir de cultivo de 24 horas en caldo de tioglicolato. Nótese la falta de esporas y la presencia de unas pocas formas filamentosas.
- C. Apariencia típica de *C. perfringens* en agar sangre después de 24 horas de incubación a 35 °C. Nótese la doble zona de hemólisis. La zona interna de hemólisis completa se debe a la toxina theta y la zona externa de hemólisis incompleta a la toxina alfa (con actividad lecitinasas).
- D. *C. perfringens*. Tinción de Gram directa de un tejido muscular aspirado de un paciente con mionecrosis por gangrena gaseosa. Hay un fondo necrótico, sin células inflamatorias ni células musculares, y bacilos gram-positivos en forma de “furgón de carga” relativamente grandes y un bacilo gramnegativo que es una célula *C. perfringens* gramvariable u otro microorganismo.
- E. Colonias de *C. perfringens* en agar yema de huevo de McClung modificado. El precipitado alrededor de las colonias indica actividad lecitinasas de la toxina alfa producida por el microorganismo.
- F. Producción de lipasa en agar yema de huevo. Unos pocos clostridios, como *C. botulinum*, *C. sporogenes* y *C. novyi* tipo A, muestran actividad lipasa en agar yema de huevo, como se muestra aquí. Nótese la capa perlada opalescente sobre la superficie de las colonias que se extiende encima de la superficie del medio y las rodea.
- G. *C. septicum*. Colonias extendidas, rizoides, chatas, irregulares, rugosas en una placa de agar sangre para anaerobios luego de 48 horas de incubación.
- H. Frotis directo con tinción de Gram de un hemocultivo positivo que contenía *C. septicum*. Se observan numerosas esporas subterminales oviformes o en forma de limón.



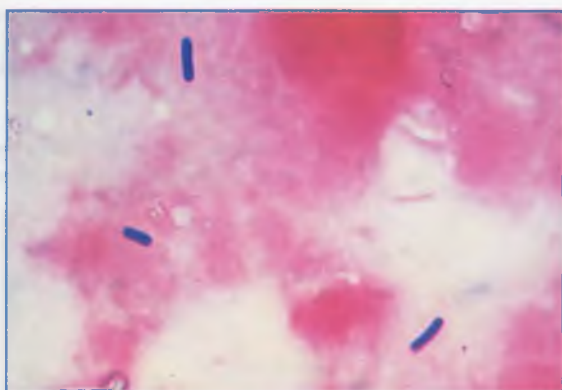
A



B



C



D



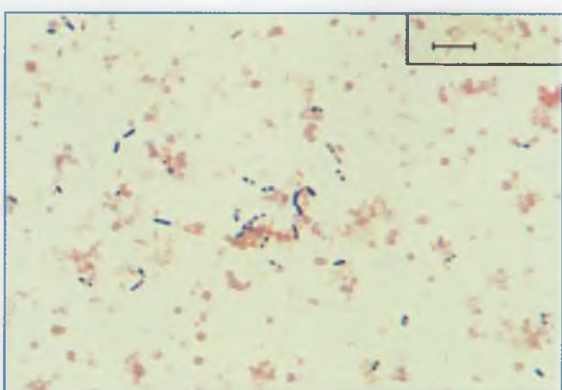
E



F



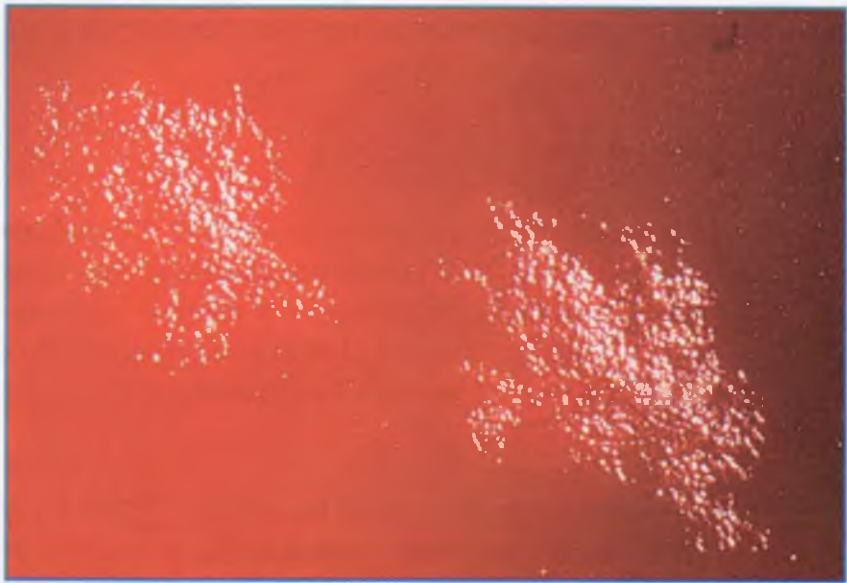
G



H

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS: CLOSTRIDIOS (CONTINUACIÓN)

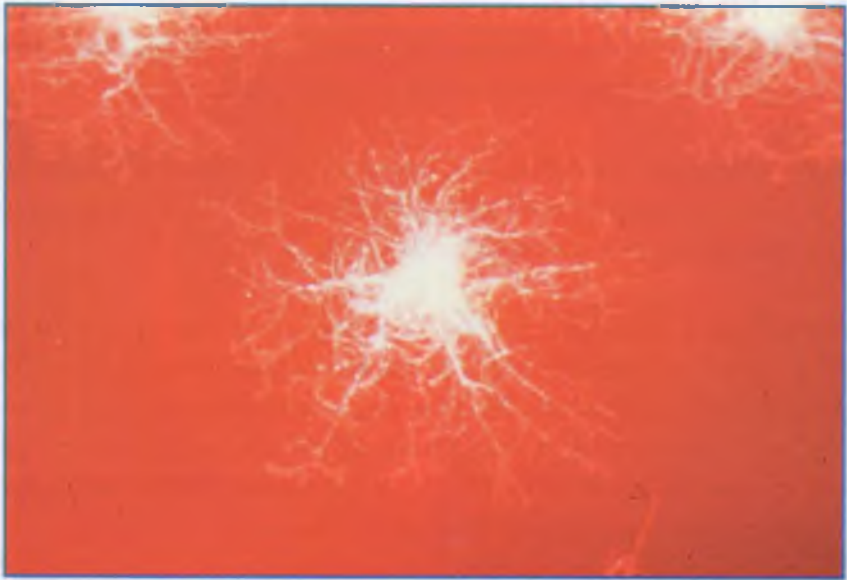
- A. Colonias de *C. tetani* en agar sangre condensado (4% de agar), que se usa para inhibir el desplazamiento de los microorganismos de modo que puedan ser aislados a partir de otras bacterias presentes en cultivos mixtos.
- B. *C. tetani*. Tinción de Gram de las células de un cultivo en caldo con glucosa y carne picada. Algunas de las células tienen esporas terminales redondas, características de *C. tetani*.
- C. *C. sporogenes*. Colonias en forma de “cabeza de medusa” a las 48 horas del cultivo en agar sangre para anaerobios.
- D. *C. ramosum*. Tinción de Gram de un cultivo en caldo con tioglicolato después de 48 horas de incubación.
- E. *C. difficile* luego de 48 horas de incubación en agar sangre para anaerobios (magnificación original 2,8×).
- F. *C. difficile* en agar fructosa cicloserina-cefoxitina después de 48 horas de incubación.
- G. *C. sordellii* en agar sangre para anaerobios luego de una incubación prolongada en anaerobiosis. La colonia es de 5 × 10 mm.
- H. *C. sordellii*. Tinción de Gram a partir de una placa de agar sangre de 2 días que revela grupos de esporas libres y bacterias distendidas con esporas subterminales ovoideas.



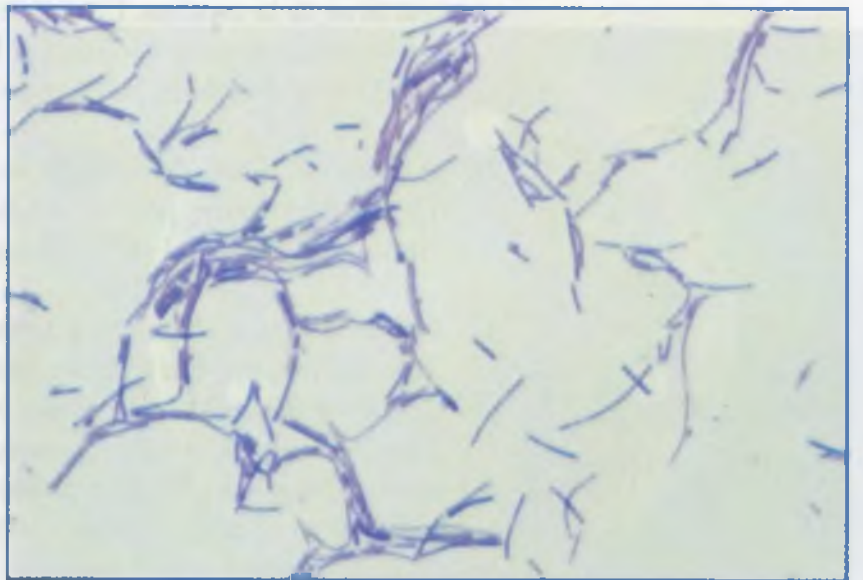
A



B



C



D



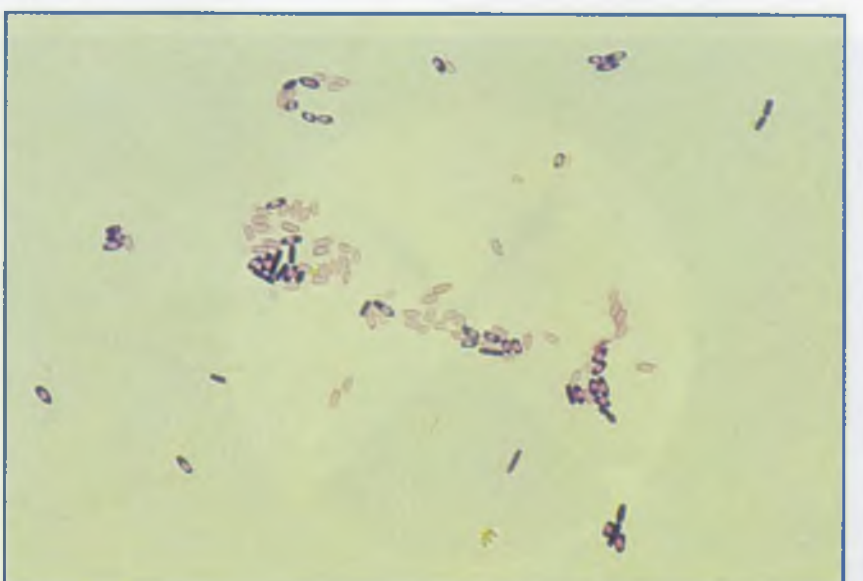
E



F



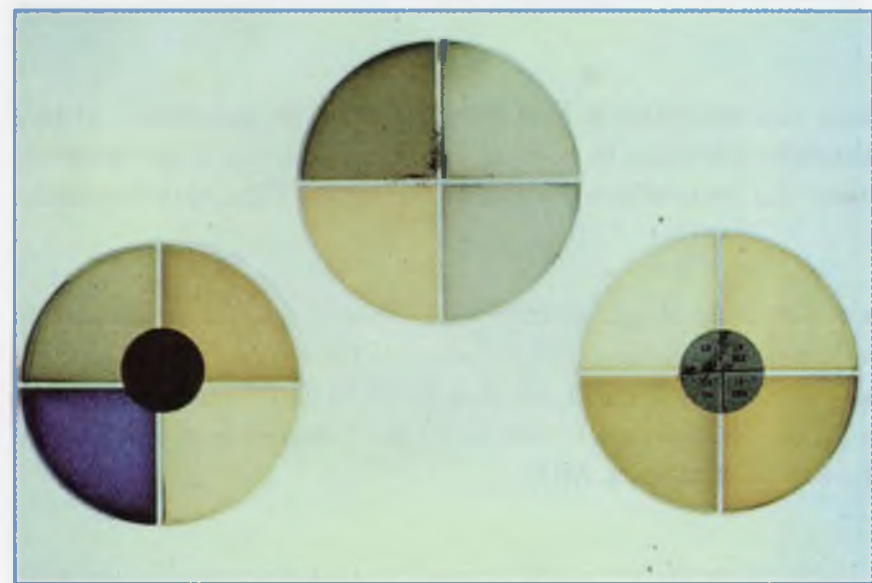
G



H

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS: USO DE PLACAS CUADRANTES PRESUMPTO Y DISCOS EN AGAR SANGRE PARA ANAEROBIOS

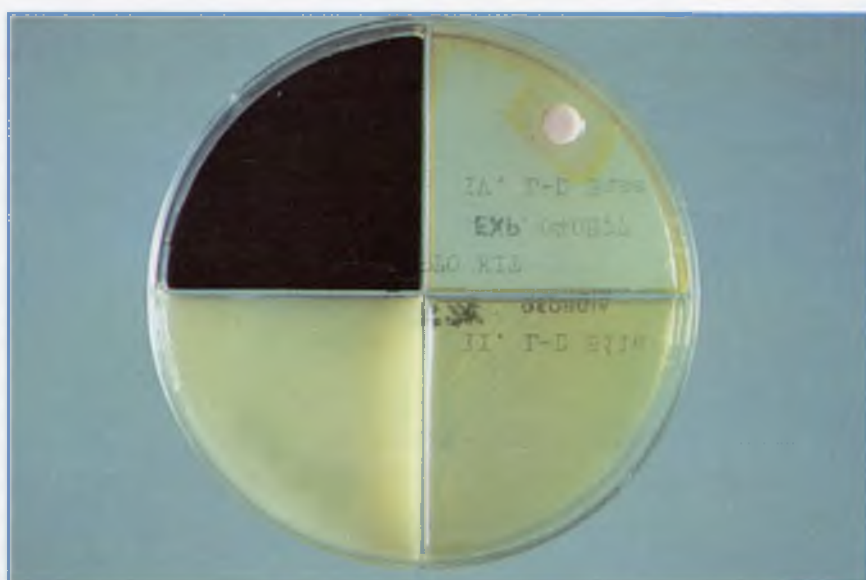
- A. Vista de tres placas en cuadrantes (descritas en detalle en el texto).
- B. Una placa en cuadrantes Presumpto 1 y una placa de agar sangre para anaerobios de los CDC. Después de la inoculación con un cultivo de caldo activo o una suspensión celular de la cepa por identificar, los discos de antibióticos (penicilina, 2 U; rifampicina, 15 g; kanamicina, 1 000 g) se colocan en el medio de agar sangre, y se coloca un disco de papel de filtro en blanco sobre la porción de agar LD de la placa cuadrante para usarlo en la detección de la producción de indol. La placa Presumpto 1 contiene los siguientes medios: agar LD, esculina LD, agar yema de huevo LD y agar bilis LD.
- C. Cultivo de *Bacteroides fragilis* en una placa Presumpto 1 después de 48 horas de incubación a 35 °C. En el primer cuadrante (*arriba, a la derecha*), el agar LD muestra un crecimiento moderado. La producción de indol puede detectarse por el agregado de una gota de para-dimetilaminocinamaldehído a un disco de papel (véase F). El agar esculina LD hacia la izquierda del agar LD está oscuro en forma difusa a causa de la hidrólisis de la esculina. El agar yema de huevo LD debajo del agar esculina muestra buen crecimiento pero no evidencia actividad lecitinasa, lipasa o proteolítica. Hay un crecimiento abundante en el agar bilis LD (*abajo, a la derecha*) y se produce un precipitado característico en el medio por esta cepa.
- D. Pruebas con discos de antibióticos. Se observa una zona de inhibición del desarrollo alrededor del disco de 15 g de rifampicina, pero no se advierte inhibición del desarrollo alrededor del disco de 2 unidades de penicilina o del disco de 1 000 g de kanamicina. Este patrón es característico del grupo *B. fragilis*.
- E. Reacciones en placa en cuadrantes Presumpto 1 de *B. thetaiotaomicron*. El primer cuadrante (*arriba, a la derecha*) muestra una reacción positiva débil de indol, como lo indica el círculo celeste sobre el agar LD después del agregado del reactivo para-dimetilaminocinamaldehído. El color negro (ambarino) del agar esculina (*izquierda del primer cuadrante*) indica hidrólisis de esculina. Hay un desarrollo adecuado pero no hay actividad lecitinasa, lipasa o proteólisis en agar yema de huevo LD (*abajo, a la izquierda*). Hay un buen crecimiento en agar bilis LD pero no hay precipitado como el que tiene *B. fragilis* (*abajo, a la derecha*).
- F. Reacciones en placa Presumpto 1 de *Fusobacterium necrophorum* después de 48 horas de incubación a 35 °C. El primer cuadrante (*abajo, a la derecha*) muestra una fuerte reacción de indol evidenciada por el color azul oscuro del disco de papel en el agar LD después del agregado del reactivo para-dimetilaminocinamaldehído. El desarrollo se inhibe en agar bilis LD (*arriba, a la derecha*). Aunque no está visible en esta fotografía a causa de la distribución de la iluminación, hay un buen crecimiento en agar yema de huevo LD (*arriba, a la izquierda*) y actividad lipasa característica como se evidencia por un brillo iridiscente –una capa perlada– sobre la superficie de las colonias y en el medio que rodea el crecimiento bacteriano. Esto se demuestra mejor con luz reflejada. En agar esculina LD (*abajo, a la izquierda*), *F. necrophorum* muestra un buen crecimiento y producción de sulfuro de hidrógeno, como se evidencia por el color negro de las colonias, pero no oscurece el medio para sugerir hidrólisis de esculina.
- G. Placa en cuadrantes Presumpto 2 (sin inocular). La placa contiene los siguientes cuadrantes (en el sentido de las agujas del reloj, comenzando a las 12 en punto): agar almidón LD, agar glucosa LD, agar DNA-LD y agar leche LD.
- H. Placa en cuadrantes Presumpto 2 luego de inoculación, incubación y agregado de reactivos. Nótese las reacciones positivas para hidrólisis, actividad desoxirribonucleasa y fermentación de glucosa.



A



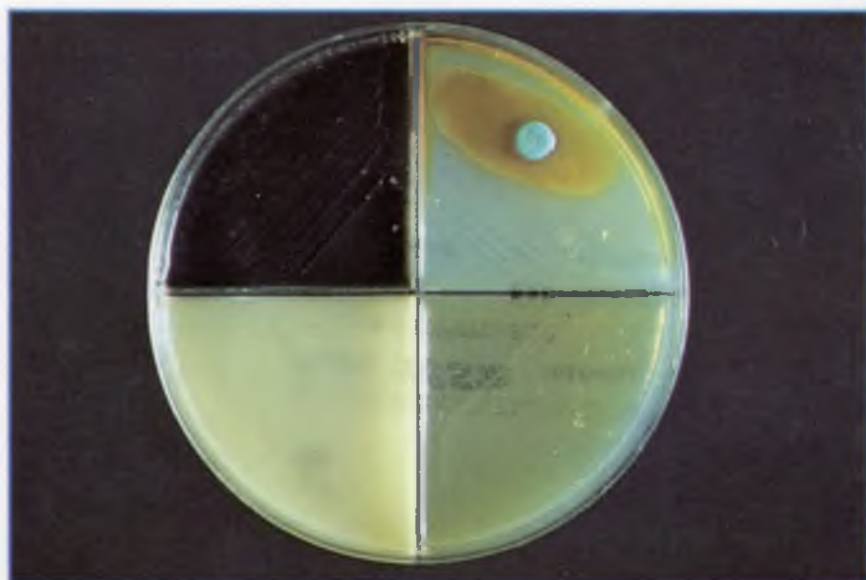
B



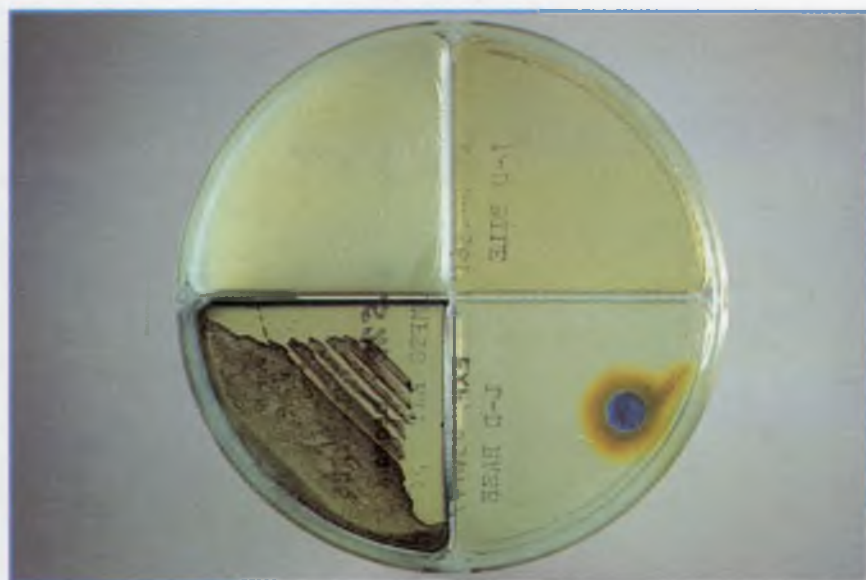
C



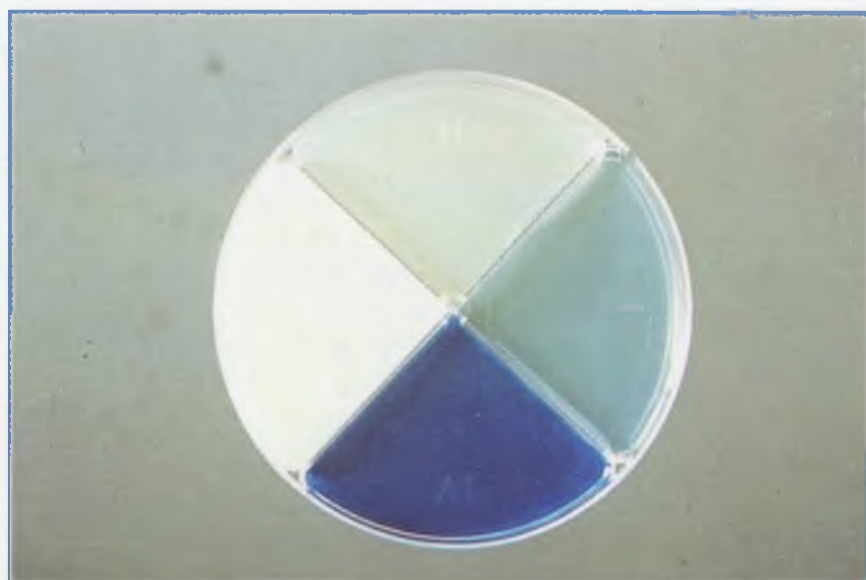
D



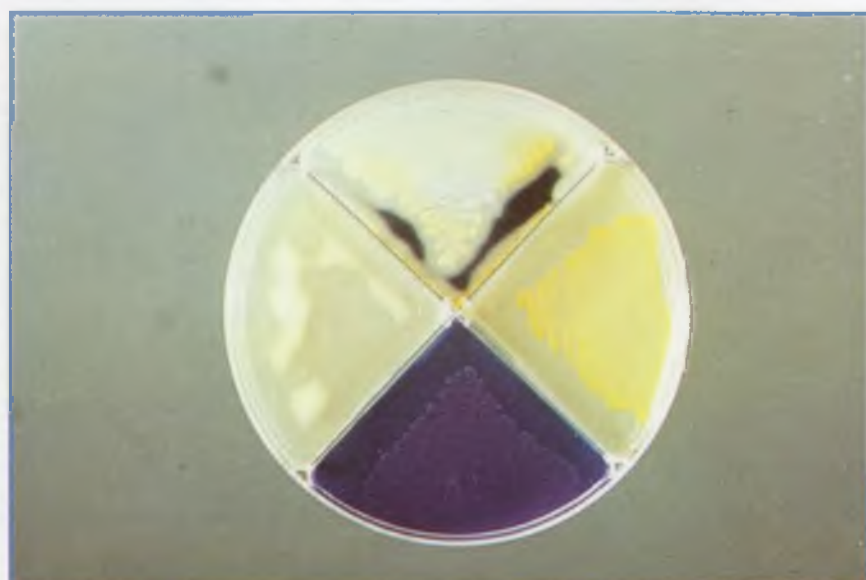
E



F



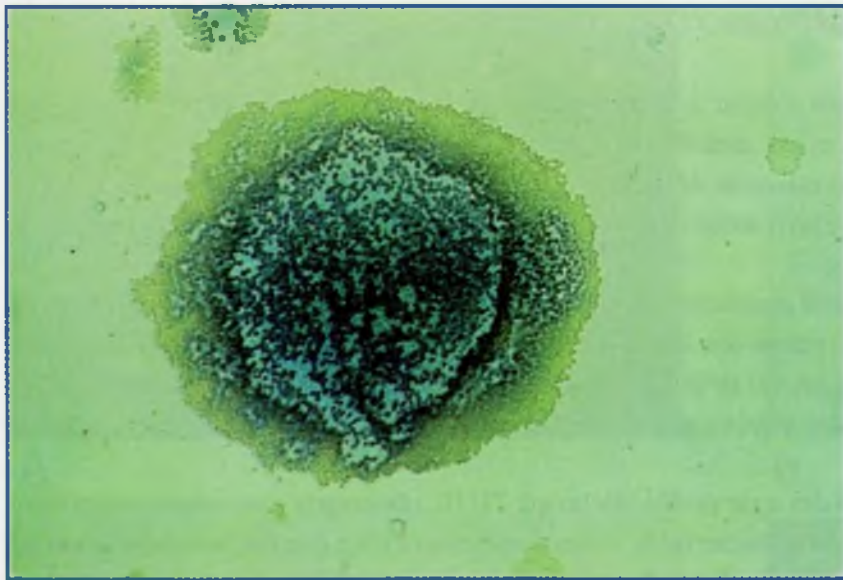
G



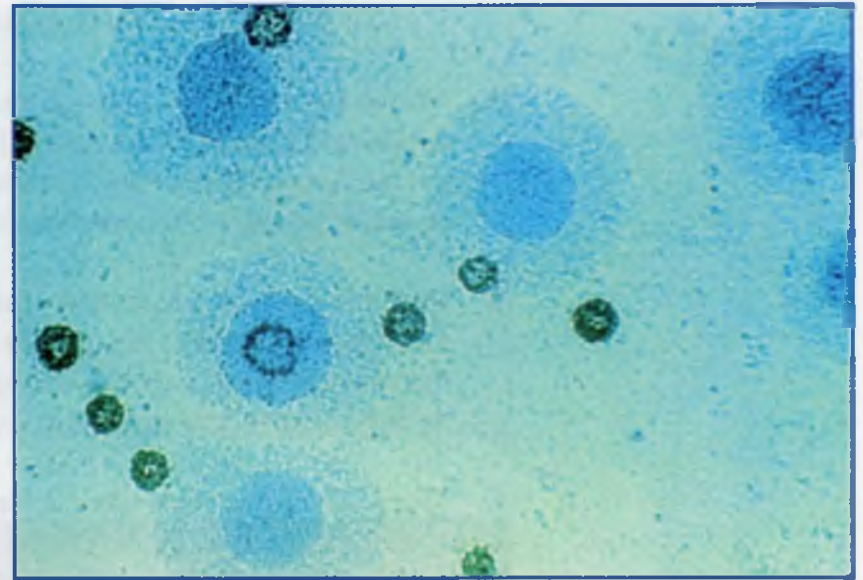
H

MICOPLASMAS Y UREAPLASMAS

- A. Colonia de *M. pneumoniae* en agar glucosa para micoplasma. Esta fotografía muestra una colonia aislada del microorganismo a la cual se le han adsorbido entrocitos de cobayo. *M. pneumoniae* es la única especie que demuestra la propiedad de hemadsorción. (La fotografía es cortesía de Health and Education Resources, Bethesda, MD).
- B. Colonia de *M. hominis* y *U. urealyticum* que crece en el agar diferencial A7B de Shepard. Las colonias de *M. hominis* tienen la morfología típica en huevo frito, el color azul se debe a la tinción de Diene. Las colonias de *U. urealyticum* son más pequeñas y densas, y presentan una pigmentación castaña debido a la precipitación de óxido de manganeso por la acción de la enzima ureasa de los microorganismos. (La fotografía es cortesía de Health and Education Resources, Bethesda, MD).



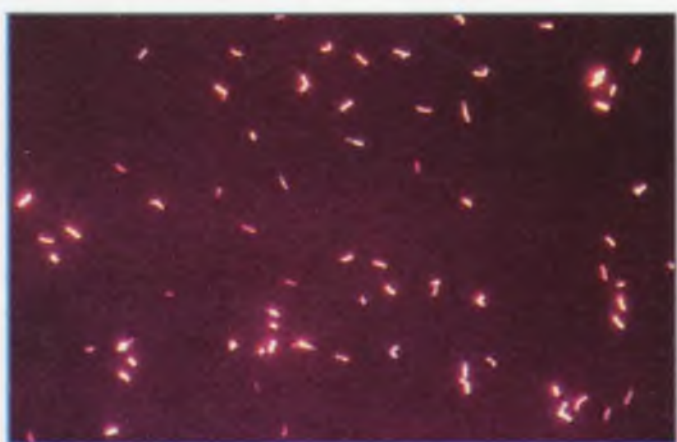
A



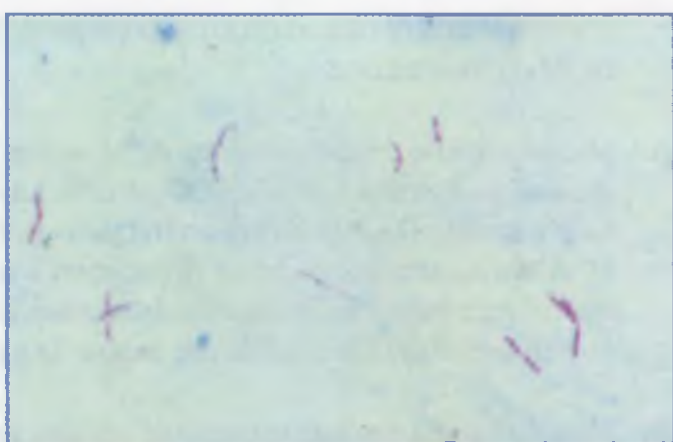
B

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

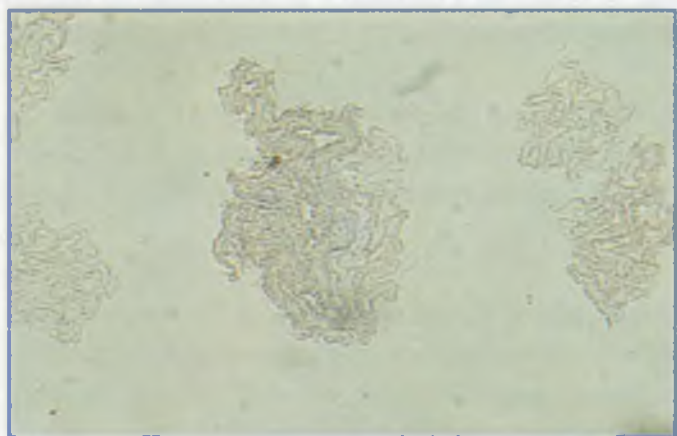
- A. Microfotografía de un frotis de una colonia similar a la ilustrada en la lámina en color 19-1C, teñido con auramina-rodamina. Obsérvese la fluorescencia amarillo brillante de los bacilos muy cortos y ligeramente curvos. Aunque la morfología celular es sugestiva de *M. tuberculosis*, se debe realizar un examen bajo óptica de mayor potencia y la confirmación con cultivo antes de lograr la identificación de una especie definitiva.
- B. Microfotografía de una tinción ácido-alcohol resistente de Kinyoun de un frotis de material obtenido de un tuberculoma necrótico del pulmón. Obsérvense los bacilos relativamente cortos, delgados, arrosariados, ligeramente curvos y teñidos de rojo. Aunque no se pueden hacer identificaciones de especies sólo a partir de frotis ácido-alcohol resistentes, el aspecto aquí es altamente compatible con *M. tuberculosis*.
- C. Microcolonia que crece sobre la superficie del agar de Middlebrook 7H10, observada con microscopio óptico de baja potencia. Advuértase que las células bacterianas están dispuestas en un patrón ondulante y serpiginoso. Esto indica la producción de un factor productor de cordones, como se observa en la tinción ácido-alcohol resistente que se muestra en la lámina en color 19-1I.
- D. Prueba de acumulación de niacina. Los tubos contienen una tira de papel de filtro impregnada con bromuro de cianógeno. El líquido en el tubo de la *derecha* ha sido extraído de la superficie del medio de cultivo de Löwenstein-Jensen después del crecimiento de colonias de una especie de *Mycobacterium* desconocida, en comparación con el control de agua negativo de la *izquierda*. El desarrollo de un color amarillo sobre la tira y en el líquido subyacente indica la presencia de niacina. *M. tuberculosis* tiene la propiedad singular de acumular niacina cuando las colonias crecen en el medio de Löwenstein-Jensen, propiedad compartida por *M. simiae* en forma menos frecuente y por cepas ocasionales de *M. marinum*.
- E. Tubos que muestran la prueba de reducción de nitrato. El tubo de la *derecha* ha sido inoculado con una especie de *Mycobacterium* desconocida, en comparación con un control no inoculado de la *izquierda*. El desarrollo de color rojo luego del agregado de los reactivos de sulfamida y α -naftiletilenediamina indica la presencia de nitritos y una prueba positiva. *M. tuberculosis* es un reductor activo de nitratos.
- F. Placa de cuadrante que contiene agar de Middlebrook 70H10 en el cual se había incorporado hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico (T_2H). Los tres cuadrantes en los cuales se observa crecimiento son cepas diferentes de *M. tuberculosis* (resistentes a T_2H); el cuadrante sin crecimiento fue inoculado con una cepa de *M. bovis*. La capacidad para crecer o no crecer en el medio que contiene T_2H es útil para separar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, respectivamente.
- G. Frasco de medio de Löwenstein-Jensen en el cual están creciendo colonias de *M. tuberculosis* después de una incubación de 22 días a 35 °C en una estufa de incubación con CO_2 al 10%. Las colonias que se observan aquí son claramente rugosas; sin embargo, tienen más de una pigmentación amarilla que las colonias de color *beige* que se observan habitualmente.
- H. Colonias de un subcultivo de *M. tuberculosis* que crecen en agar de Middlebrook 7H10 después de una incubación de 25 días a 35 °C en una estufa de incubación con CO_2 al 10%. Las colonias tienen un aspecto rugoso y de color *beige*, característico de la especie.
- I. Microfotografía de una tinción ácido-alcohol resistente de Kinyoun preparada de caldo de un frasco de cultivo de sangre BACTEC 12A después de una incubación de 10 días a 35 °C. Se observan muchos bacilos ácido-alcohol resistentes, dispuestos en vainas paralelas. Cuando se observa el agregado de células bacterianas, como se muestra aquí, en frotis de un preparado de caldo, se puede hacer una identificación presuntiva de *Mycobacterium tuberculosis*, porque el fenómeno se debe a la producción del factor formador de cordones, que se cree que es un factor de virulencia.
- J. Microfotografía de una tinción de Gram de un frotis de líquido pleural de un caso de empiema en un paciente con SIDA. Obsérvense los bacilos relativamente largos, delgados, con arrosariado delicado y escasa tinción. Debido a su cubierta externa cética y gruesa, las células bacterianas de las micobacterias no se tiñen bien con violeta de genciana, la tinción primaria utilizada en la tinción de Gram. Obsérvese el halo definido alrededor de los bacilos, un indicio de que el microorganismo está encapsulado y es sugestivo de una especie de *Mycobacterium*. En este caso *M. tuberculosis* creció en cultivo.



A



B



C



D



E



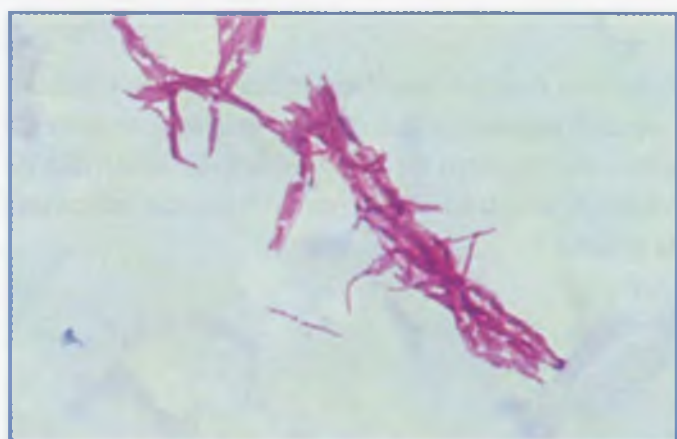
F



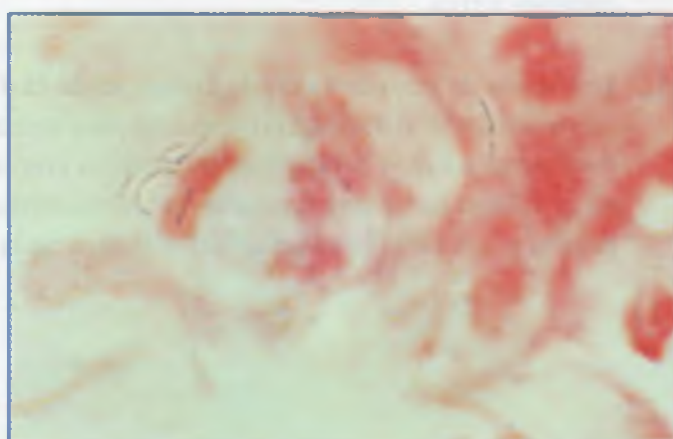
G



H



I



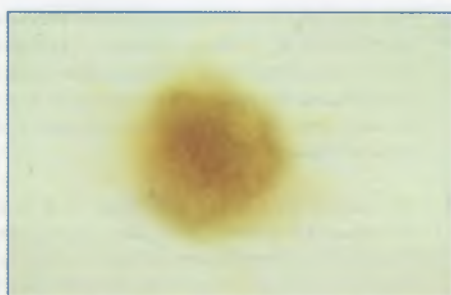
J

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO DE ESPECIES DE *MYCOBACTERIUM* DISTINTAS DE *M. TUBERCULOSIS*

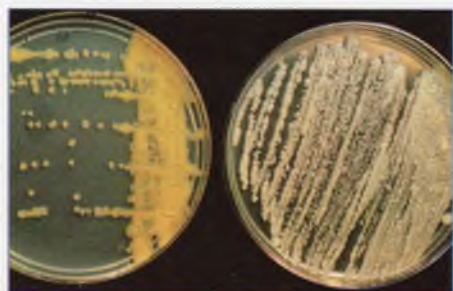
- A. Microfotografía de microcolonias de *M. avium* que crecen en agar de Middlebrook 7H10 después de una incubación de 6 días a 35 °C en CO₂ al 10%. Las microcolonias translúcidas, delgadas y planas, con una elevación umbilicada más oscura central, semejante a un huevo frito, son características de las cepas lisas de *M. avium* aisladas comúnmente en pacientes con SIDA. La observación de este tipo de microcolonias puede ser útil para inducir la realización de una sonda de ácidos nucleicos del complejo *M. avium*/*M. intracellulare* en la confirmación rápida con cultivo de un aislamiento desconocido.
- B. Microfotografía con más aumento de una única microcolonia del complejo *M. avium*/*M. intracellulare*, que muestra nuevamente la colonia delgada y translúcida descrita en la lámina en color 19-2A. Las proyecciones periféricas de aspecto rizoides, como se muestran aquí, se observan a menudo y proporcionan un indicio agregado para la identificación presuntiva de microorganismos del complejo *M. avium*/*M. intracellulare*.
- C. Dos placas de agar de Middlebrook 7H10, cada una inoculada con el mismo subcultivo de *M. kansasii*. La placa de la izquierda fue expuesta a la luz; la de la derecha se mantuvo en la oscuridad hasta inmediatamente antes de que se tomara la microfotografía. El pigmento amarillo de las colonias en la placa expuesta a la luz es característico de un fotocromógeno.
- D. Dos placas de agar de Middlebrook 7H10 cada una inoculada con el mismo subcultivo de *M. scrofulaceum*. La placa de la izquierda fue expuesta a la luz; la de la derecha se mantuvo en la oscuridad hasta inmediatamente antes de que se tomara la microfotografía. El pigmento amarillo de las colonias tanto en la placa expuesta a la luz como en la no expuesta a la luz es característico de un escotocromógeno.
- E. Una placa de agar de Middlebrook 7H10 previamente inoculada con una cepa de *M. gordonae*; *M. gordonae* es un escotocromógeno y produce característicamente una pigmentación amarilla intensa, como se muestra aquí.
- F. Se inoculan varios tubos que contienen concentraciones de nitrato de sodio con buffer con distintas cepas de especies de *Mycobacterium* para ilustrar las reacciones 1+ (segundo tubo desde la izquierda) a 4+ (el tubo más hacia la derecha). Se desarrolla color rojo luego del agregado de los reactivos sulfanilamida y *N*-naftilenediamina; la intensidad del color refleja la concentración de los nitritos producidos. La prueba cuantitativa de reducción de nitratos puede ser útil para diferenciar las cepas de *M. tuberculosis* (4+ positiva) de *M. bovis* (1+ positiva) y *M. kansasii* (4+ positiva) de otro fotocromógeno (negativo a 1+ positivo).
- G. Dos tubos que contienen reactivo Tween 80. El tubo de la izquierda había sido inoculado con una cepa control negativa, el tubo de la derecha, con un subcultivo de *M. kansasii*. El desarrollo de color rojo (tubo de la derecha) después de la incubación durante 3 a 10 días es una prueba positiva, lo que indica la capacidad de la cepa de la prueba para hidrolizar Tween 80. El cambio de color de amarillo a rojo en este ensayo no se debe a un cambio del pH, antes bien, es el resultado de un cambio en la densidad óptica a medida que se produce ácido oleico y sorbitol polioxietilado como productos de degradación de la hidrólisis de Tween 80.
- H. Dos tubos de profundidad de Löwenstein-Jensen previamente inoculados con un control catalasa-negativo (tubo de la izquierda) y un subcultivo de *M. kansasii* (tubo de la derecha). Obsérvese el área alta de formación de burbujas en el tubo de la derecha después del agregado de peróxido de hidrógeno a la superficie del agar, que excede los 45 mm, lo que indica una prueba positiva y una actividad de catalasa fuerte.
- I. Prueba de la catalasa positiva. Inmediatamente antes de tomar la microfotografía, se colocaron algunas gotas de peróxido de hidrógeno en las colonias aisladas de las colonias fotocromógenas de *M. kansasii*. La evolución de burbujas rápidas, como se muestra aquí, indica una prueba positiva, lo que señala una actividad de catalasa activa.
- J. Dos tubos de base de caldo de Dubos, el de la derecha contiene reactivo bisulfato de fenoftaleína tripotásico (reactivo de arilsulfatasa) y se compara con un tubo control negativo a la izquierda desprovisto de reactivo. Ambos tubos habían sido inoculados con un subcultivo de una cepa de *M. fortuitum*. El desarrollo de color rosado luego del agregado de un reactivo de carbonato de sodio en el tubo de la izquierda indica una prueba positiva y actividad de arilsulfatasa de la cepa de prueba.



A



B



C



D



E



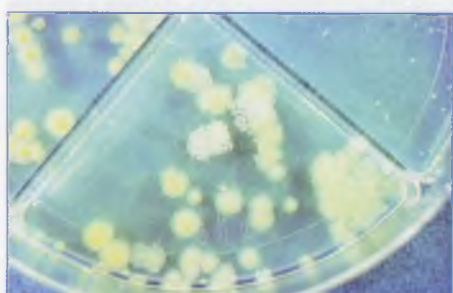
F



G



H



I



J

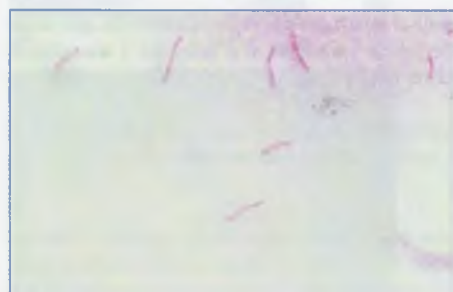
- K. Dos tubos de caldo de urea inoculados previamente con un control negativo (*tubo de la izquierda*) y un subcultivo de *M. gordonae* (*derecha*). Las cepas de micobacterias que tienen actividad de ureasa viran el rosado del caldo en varias horas (positivo fuerte) a algunos días, debido a la liberación de amoníaco y a la alcalinización del medio. La evaluación de la actividad de ureasa puede ser útil para separar *M. gordonae* (positivo fuerte) de otros escotocromógenos y el complejo *M. fortuitum-chelonae* de otros bacilos de crecimiento rápido.
- L. Dos tubos de base de caldo de Dubos, el de la *izquierda* contiene pirazinamida y el de la *derecha*, un control negativo desprovisto de reactivo. Ambos tubos habían sido inoculados con un subcultivo de una cepa de *M. avium*. El desarrollo de una banda rosado roja en la capa de reactivo hacia la superficie del agar en el tubo de la *izquierda*, después del agregado de reactivo de sulfato amónico ferroso, indica una prueba positiva y la capacidad de esta cepa para desaminar la pirazinamida.
- M. Microfotografía de un frotis ácido-alcohol resistente de un subcultivo de *M. kansasii*. Las células bacterianas de *M. kansasii* se describen como rectangulares, rectas y con bandas, lo que está razonablemente representado aquí. A causa de la variación entre las cepas y entre las otras especies, en el mejor de los casos es riesgoso hacer una identificación presuntiva de la especie de *Mycobacterium* sobre la base de una morfología de la tinción ácido-alcohol resistente.
- N. Placa de agar de Middlebrook 7H10 inoculada previamente con un subcultivo de una cepa clásica de *M. avium*. Las cepas clásicas de *M. avium* fueron incluidas al principio en los no fotocromógenos del grupo III en la clasificación de Runyon. Estas colonias son relativamente pequeñas, lisas y blanco grisáceas, sin evidencia de pigmentación.
- O. Placa de agar de Middlebrook 7H10 inoculada previamente con una cepa del complejo *M. avium-intracellulare* (MAI) aislada en un paciente con SIDA. Muchas de las cepas de MAI aisladas en pacientes con SIDA tienen esta pigmentación amarilla definida. La mayoría de las cepas aisladas en el Denver Veterans Hospital a comienzos de la década de 1990 han producido colonias peculiares con forma de rosquilla, pero probablemente no sea una característica definida de todas las cepas.
- P. Microfotografía con bajo aumento de una biopsia hepática de un paciente con SIDA también infectado por *M. avium-intracellulare*. Obsérvense los cúmulos intracelulares densos de bacilos ácido-alcohol resistentes y cortos en la porción central de la fotografía.
- Q. Placa de agar de Middlebrook 7H10 inoculada 3 días antes con una cepa de *M. fortuitum* e incubada a 35 °C en CO₂ al 10%. Las colonias promedian 1 a 2 mm de diámetro, son enteras, lisas, húmedas y están desprovistas de pigmentación. El complejo *M. fortuitum-chelonae* de microorganismos fue asignado originariamente al grupo IV de Runyon, los bacilos de crecimiento rápido.
- R. Placa de agar de MacConkey modificado (desprovisto de violeta de genciana) sobre la cual crecen colonias tomadas de un subcultivo de *M. fortuitum*. Las cepas que pertenecen a *M. fortuitum-chelonae* tienen la capacidad singular de crecer en agar de MacConkey modificado. Las colonias miden en promedio 2 mm de diámetro y tienen bordes continuos, son húmedas y presentan un tinte amarillo-rosado leve debido al pigmento derivado del agar.
- S. Placa de agar sangre de carnero al 5% con un crecimiento de *M. fortuitum*. Las cepas que pertenecen al complejo *M. fortuitum-chelonae* crecen en agar sangre de carnero al 5% dentro de las 48 a 72 horas y pueden confundirse con otros microorganismos bacilares grampositivos si no se realiza una tinción parcial ácido-alcohol resistente.
- T. Microfotografía de una tinción de Gram de un frotis de una colonia aislada que se muestra en la lámina en color 19-2S. Las células bacterianas aparecen como cocobacilos grampositivos cortos, delgados y casi filamentosos y de tinción débil. Los microscopistas deben tener en cuenta esta imagen y no deben hacer una identificación presuntiva errónea de una especie de *Actinomyces* o una corinebacteria atípica. Una tinción ácido-alcohol resistente parcial de un segundo frotis ayuda a la identificación correcta.



K



L



M



N



O



P



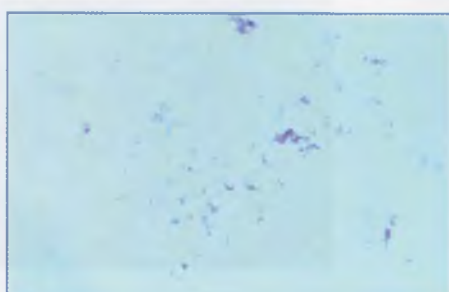
Q



R



S



T

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE ALGUNAS ENFERMEDADES MICOBACTERIANAS

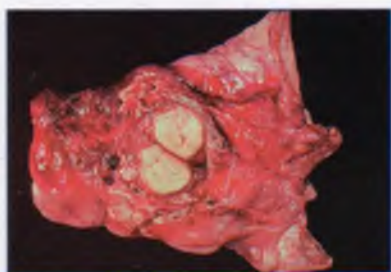
- A. Radiografía de tórax de un paciente con tuberculosis pulmonar. Obsérvese el área extensa de infiltración densa del lóbulo superior derecho.
- B. Se observa una lesión nodular solitaria con bordes bien definidos en el segmento superior del campo pulmonar inferior izquierdo. Una lesión numular de coccidioidomicosis pulmonar debe incluirse en el diagnóstico diferencial de esta lesión. Esto resultó un tuberculoma.
- C. Lóbulo pulmonar resecado que muestra un nódulo central bien circunscripto de 2,5 cm de diámetro, blanco y de aspecto firme. Desde el punto de vista histológico fue un tuberculoma, similar al que se pudo haber extirpado del paciente cuya radiografía de tórax se muestra en la lámina en color 19-3B.
- D. Microfotografía de un corte teñido con hematoxilina y eosina tomado a través de un tuberculoma, que muestra grados variados de fibrosis basal y una infiltración celular compuesta por linfocitos y macrófagos; muchos de los últimos forman células gigantes de Langhans características.
- E. Base del encéfalo en un paciente que murió por meningitis tuberculosa. La piaracnoides que cubre la base del encéfalo, sobre todo en el área del quiasma óptico, aparece turbia como manifestación de la reacción inflamatoria crónica.
- F. Un caso de tuberculosis cutánea del quinto dedo. La lesión que se muestra aquí aparece activa e inflamatoria. De hecho, una radiografía puso en evidencia afectación ósea y articular de las falanges media y distal. En una época, las lesiones de los dedos de la mano similares a ésta eran frecuentes en los individuos que ordeñaban vacas.
- G. Esta región posterior del cuello muestra un ganglio linfático posauricular agrandado con trayectos fistulosos cicatrizados a lo largo del recorrido del drenaje linfático. Es un cuadro clásico de “escrófula” o linfadenitis tuberculosa, causada típicamente por *M. scrofulaceum* y micobacterias distintas de *M. tuberculosis*. El camino de la infección es oral y suele ocurrir en dos grupos etarios durante la dentición: en niños de 3 a 7 años, cuando aparecen los dientes secundarios, y al final de la segunda década de vida, cuando afloran los molares.
- H. Porción anterior del cuello que muestra múltiples trayectos fistulosos cicatrizados en un caso de linfadenitis tuberculosa crónica. Nuevamente la vía de infección es la oral, con drenaje de las micobacterias infectantes a lo largo de los canales linfáticos.
- I. Microfotografía con bajo aumento de un corte de intestino delgado teñido con una tinción ácido-alcohol resistente con base de carbol-fucsina. El moteado rosado que se observa en la submucosa corresponde a agregados densos de bacilos ácido-alcohol resistentes de un caso de infección intestinal causada por el complejo *M. avium/M. intracellulare* en un paciente con SIDA.
- J. Microfotografía con gran aumento de un área que se muestra en la lámina en color 19-3I, que ilustra mejor los agregados intracelulares densos de bacilos ácido-alcohol resistentes. Este cuadro histopatológico es similar a las “células de la lepra” observadas en los pacientes con enfermedad de Hanson (lepra).



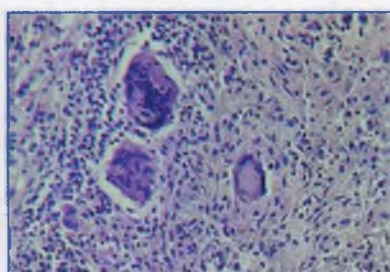
A



B



C



D



E



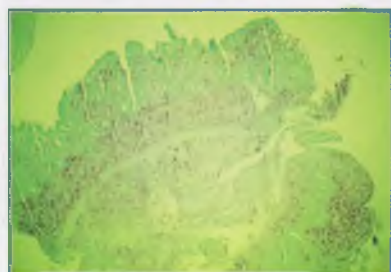
F



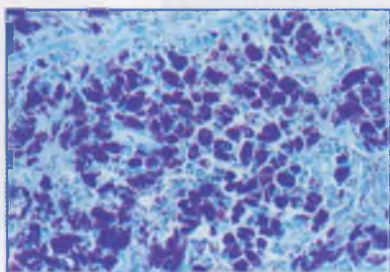
G



H



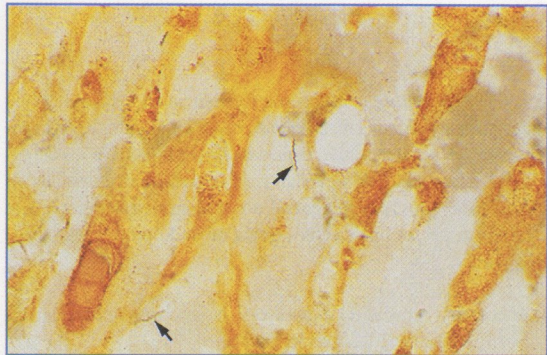
I



J

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR ESPIROQUETAS

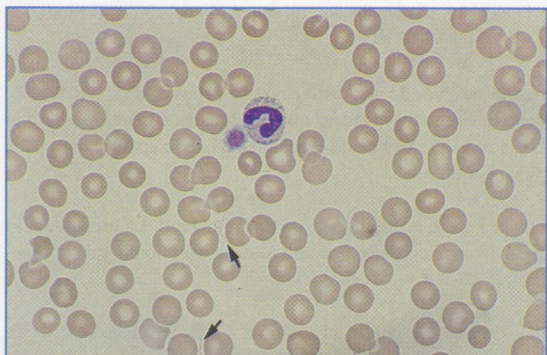
- A. *Treponema pallidum*. Esta microfotografía muestra un corte histológico de placenta con tinción de Warthin-Starry de un paciente con sífilis congénita. Se evidencian con facilidad las espirales firmemente enrolladas con el aumento original (1 000×).
- B. *Treponema pallidum*. Este control de la prueba FTA-ABS muestra tinción 4+ de las espiroquetas. Se observan la forma helicoidal y las espirales firmemente enrolladas en algunas de las células bacterianas. Esta microfotografía es una preparación con inmunofluorescencia indirecta de *T. pallidum* que utiliza antiglobulina humana conjugada con fluoresceína (aumento original, 600×). (Cortesía de Burton Wilcke y Mary Celotti, Vermont Department of Public Health, Burlington).
- C. Frotis de sangre periférica con tinción de Wright de un paciente con infección por *Borrelia*. Se observa el enrollamiento laxo de los microorganismos *Borrelia*, pero la estructura delgada puede pasarse por alto con facilidad. Estas espiroquetas pueden detectarse cuando se examinan frotis para paludismo o para la morfología celular, incluso si el médico no sospecha el diagnóstico (aumento original, 1 000×). (Cortesía del doctor Thomas Fritsche).
- D. Tinción con naranja de acridina de sangre periférica que muestra claramente especies de *Borrellia*. Si se sospecha el diagnóstico, puede utilizarse esta técnica, que puede ser más sensible que las tinciones de Giemsa o de Wright (aumento original, 1 000×). (Cortesía del doctor Brian Lauer).
- E. Garrapatas *Ixodes scapularis (dammini)*. Estas garrapatas duras, de color oscuro, también conocidas como garrapatas de patas negras o garrapatas del ciervo, tienen un escudo dorsal que cubre todo el dorso del macho (M) pero sólo una porción en la hembra (F), ninfa (N) y larva (L). Es el principal vector de *Borrelia burgdorferi*, el agente de la enfermedad de Lyme, en el este de los Estados Unidos. *Ixodes pacificus*, el vector en la región del Pacífico, es muy similar. Los vectores principales son ninfas y adultos hembras. Los machos adultos pican sólo en raras ocasiones y el estadio larvario no suele infectarse cuando pica a los seres humanos. Los estadios de ninfas representan un problema particular porque su tamaño pequeño dificulta su detección.
- F. *Borrelia burgdorferi* en el sedimento de un cultivo teñido con anticuerpos monoclonales contra la proteína OspA, conjugada con estreptavidina-fosfatasa alcalina. Se muestra el polimorfismo típico de *B. burgdorferi*. (Cortesía del doctor Paul Duray).
- G. Corte histológico de riñón de perro teñido con una técnica de impregnación argéntica (Warthin-Starry) que muestra varios túbulos renales con orientación longitudinal. Incluso con bajo aumento, se observan masas de *Leptospira* que oscurecen la superficie del epitelio tubular. Es evidente que este sitio de privilegio, donde las leptospiros están protegidas de las defensas del huésped, puede actuar como fuente de producción para la diseminación de la infección cuando la orina contaminada por las leptospiros se elimina en el suelo (aumento original, 1 000×). (Cortesía de David Miller).
- H. Tubos del medio semisólido polisorbato 80-albúmina bovina (PSO-BA). El tubo de la derecha se inoculó con *Leptospira interrogans*. La subsuperficie de crecimiento en el medio de cultivo semisólido es típica de leptospiros, como *L. interrogans* serovariedad *pomona*. El crecimiento aparece como una banda horizontal blanca grisácea alrededor de 1 cm por debajo de la superficie del medio tras la incubación durante 2 a 6 semanas a temperatura ambiente. La banda se torna más densa cuando continúa la incubación, pero puede ser muy escasa en las cepas con requerimientos nutricionales especiales, como en el caso de *L. interrogans* serovariedad *hardjo*. (Cortesía de David Miller).



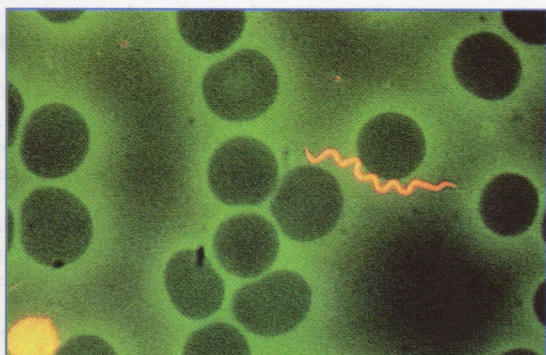
A



B



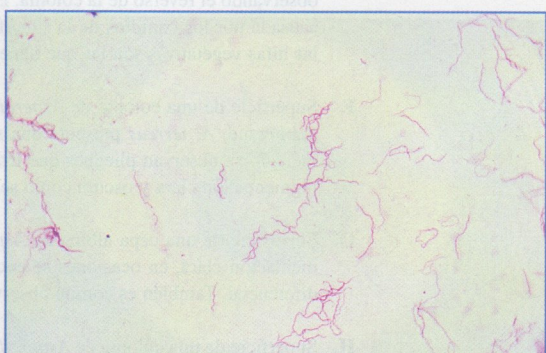
C



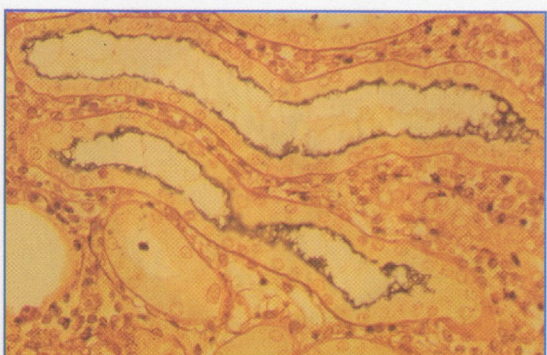
D



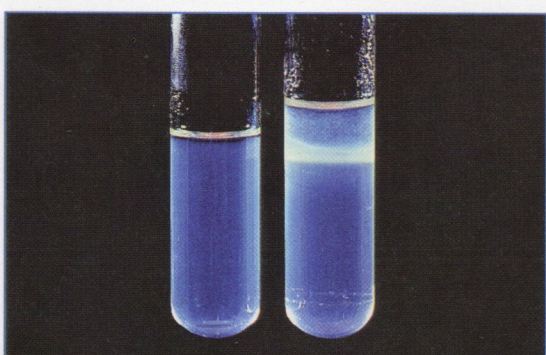
E



F



G

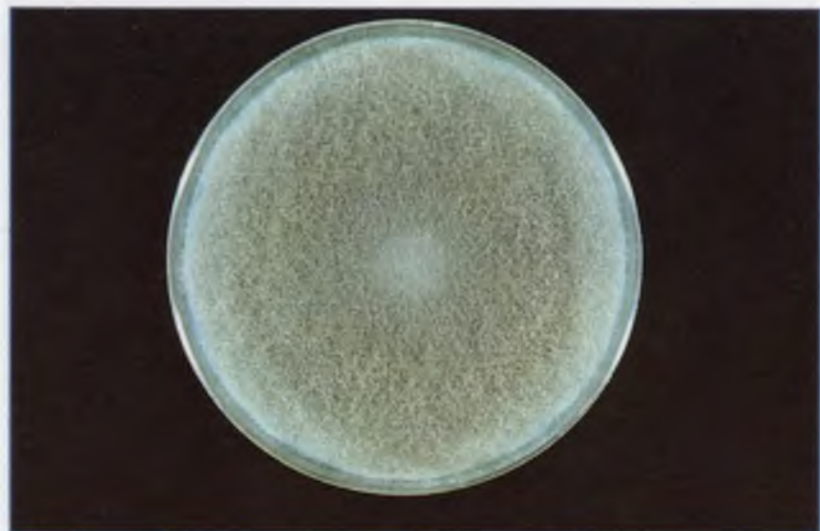


H

MORFOLOGÍA DE LA COLONIA DE ESPECIES DE *ZYGOMYCETES* Y ESPECIES SELECCIONADAS DE *ASPERGILLUS*

Los miembros de *Zygomycetes* y ciertas especies de *Aspergillus* se aíslan con frecuencia en los laboratorios clínicos como agentes de infecciones oportunistas. Estos hongos crecen rápidamente en el cultivo, en especial las especies de *Zygomycetes*, que pueden cubrir la placa del cultivo dentro de las 48 horas. De los aspergilos, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus* son los que se aíslan más en muestras obtenidas en pacientes con aspergilosis. Cuando se aíslan otros aspergilos, por lo general no se identifica la especie a la que corresponden. *A. nidulans* y *A. glaucus* son dos especies infrecuentes que a menudo producen cleistotecios, la forma teleomorfa que contiene ascosporas.

- A. Placa de agar dextrosa de Sabouraud inoculada con una especie de *Zygomycetes*. Nótese que la placa en su totalidad está cubierta por el micelio con la superficie blanco grisácea y vellosa.
- B. Imagen en primer plano de una colonia de una especie de *Zygomycetes* tras 96 horas de incubación. A medida que la colonia madura, asume un color gris castaño, a menudo con un punteado negro como pimienta, que indica la producción de esporangios.
- C. Superficie de una colonia de *Aspergillus fumigatus* después de una incubación de 5 días en agar dextrosa de Sabouraud. Las colonias maduras de *A. fumigatus* suelen ser pulverulentas o granulares y tienen cierto tono verdoso por la producción de conidios pigmentados. El margen de crecimiento a menudo aparece como una zona blanca de crecimiento nuevo, como se ilustra aquí.
- D. Superficie de una colonia de *Aspergillus flavus* que crece en agar dextrosa de Sabouraud. La textura de las colonias maduras suele ser granular por la producción de conidios y, como lo sugiere el nombre de la especie, es característica cierta pigmentación amarilla.
- E. Superficie de una colonia de *Aspergillus niger* después de una incubación de 4 días en agar dextrosa de Sabouraud. Es característico observar la superficie densamente punteada de castaño oscuro a negro. La pigmentación negra de la superficie de *A. niger* puede distinguirse de la de uno de los hongos dematiáceos observando el reverso de la colonia. En el caso de *A. niger* es gris claro a beige, ya que la pigmentación está causada por los conidios de la superficie; el reverso de los hongos dematiáceos es negro azabache porque las hifas vegetativas son las que tienen el pigmento.
- F. Superficie de una colonia de *Aspergillus terreus* después de una incubación de 6 días en agar dextrosa de Sabouraud. *A. terreus* presenta una superficie granular y cierto tinte amarillo o castaño característico. A menudo se observan pliegues que irradian desde el centro y no son infrecuentes las zonas concéntricas de pigmentación clara y oscura como se observa aquí.
- G. Superficie de una cepa albina de *Aspergillus nidulans*. Aunque la mayoría de las cepas tienen cierta pigmentación clara, en ocasiones se encuentran cepas albinas y deben tenerse en cuenta en la identificación diferencial. También es común observar la superficie granular, con pliegues radiales.
- H. Superficie de una colonia de *Aspergillus glaucus*. El aspecto multicolor verde y amarillo observado aquí no es específico, porque otras especies de *Aspergillus* pueden tener un aspecto similar. Es necesario el examen microscópico para arribar a la identificación de la especie.



A



B



C



D



E



F



G



H

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS HIALINOS AISLADOS CON FRECUENCIA

Las colonias de los hongos hialinos tienen un aspecto variado. La mayoría muestra pigmentación pastel claro o más oscura, con combinaciones de colores verdes, amarillos, anaranjados y castaños que son comunes. La textura de las colonias puede ser lisa, granular, algodonosa o vellosa, de acuerdo con su madurez y grado de esporulación. Deben realizarse estudios microscópicos para confirmar la identificación de género y especie.

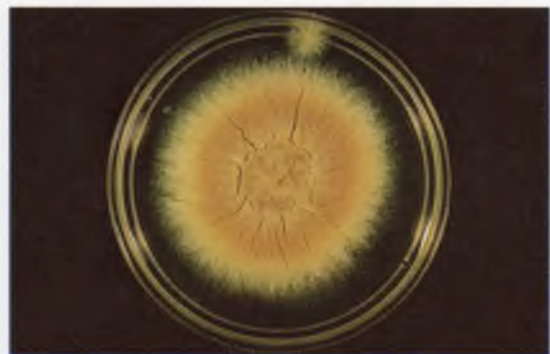
- A. Superficie de una colonia de especies de *Penicillium* después de una incubación de 5 días en agar dextrosa de Sabouraud, que muestra el color verde distintivo, la superficie granular, los pliegues radiales y el borde blanco de crecimiento nuevo en la periferia. Aunque la mayoría de las cepas de las especies de *Penicillium* muestran cierto tinte verde, a veces se observan variantes amarillas.
- B. Superficie de una colonia de *Penicillium marneffei* después de una incubación de 4 días en agar dextrosa de Sabouraud, que muestra la pigmentación roja distintiva de una porción de la colonia. Nótese que el pigmento ha filtrado hacia el agar y tiene una coloración rojo vinosa clara. La superficie tiende a ser granular a suave y esponjosa, de acuerdo con el grado de esporulación; nótese el borde blanco bien definido de crecimiento nuevo en la periferia.
- C. Superficie de una colonia de especies de *Paecilomyces*. Las colonias de estas especies suelen ser granulares y a menudo tienen pigmentación amarillo castaña, como se ilustra aquí. Sin embargo, otras cepas pueden tener un aspecto verde pastel claro, verde amarillento o azulado.
- D. Superficie de una colonia de especies de *Scopulariopsis* después de 5 días de crecimiento en agar dextrosa de Sabouraud. La pigmentación amarilla, la textura granular y los pliegues radiales, como se ilustra aquí, son características distintivas de estas especies.
- E. Superficie de una colonia de especies de *Acremonium* después de 5 días de incubación en agar dextrosa de Sabouraud. Las colonias de las especies de *Acremonium* suelen tener aspecto liso, casi levaduriforme, como se ilustra aquí, debido a la naturaleza sumamente delicada de las hifas y los cuerpos de fructificación. Pueden observarse colores amarillo pastel claro, verde claro y rojo melocotón.
- F. Superficie de una colonia típica de especies de *Fusarium* después de 6 días de crecimiento en agar dextrosa de Sabouraud. Pueden sospecharse especies de *Fusarium* cuando se observan colonias granulares o algodonosas de crecimiento rápido, con pigmentación rosada a roja, lavanda o púrpura característica.
- G. Superficie de una típica colonia gris “ratón” algodonosa de *Scedosporium apiospermum* (forma anamórfica de *Pseudallescheria boydii*) después de 5 días de incubación en agar dextrosa de Sabouraud. La colonia de crecimiento rápido con aspecto gris ratón, como se ilustra aquí, siempre sugiere especies de *Scedosporium*. La pigmentación característica es causada por los conidios con pigmento oscuro.
- H. Una colonia de especies de *Gliocladium* después de 5 días de crecimiento en agar dextrosa de Sabouraud. El pigmento verde, la extensión de la colonia de borde a borde sin un margen de crecimiento bien definido y la textura granular (denominado “césped verde”) son exclusivos de las especies de *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último muestra con mayor frecuencia pigmentación amarilla en lugar de verde.



A



B



C



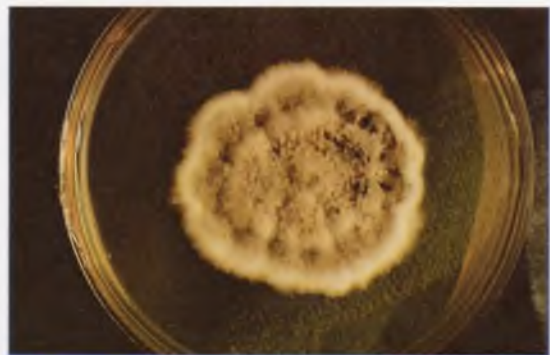
D



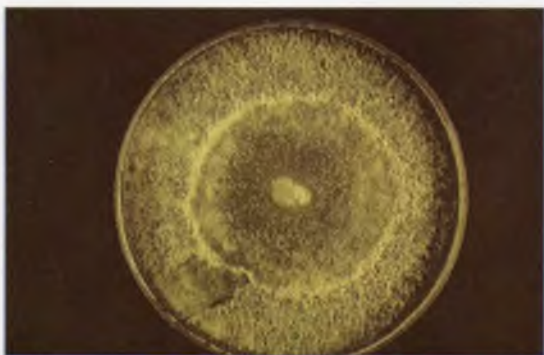
E



F



G

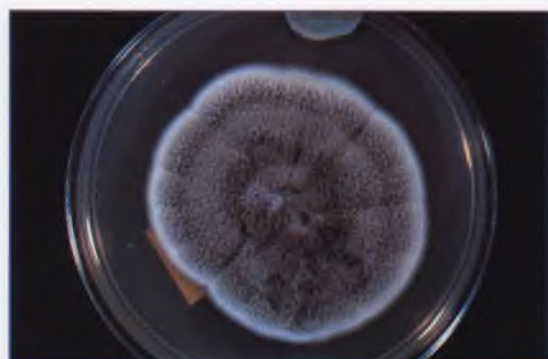


H

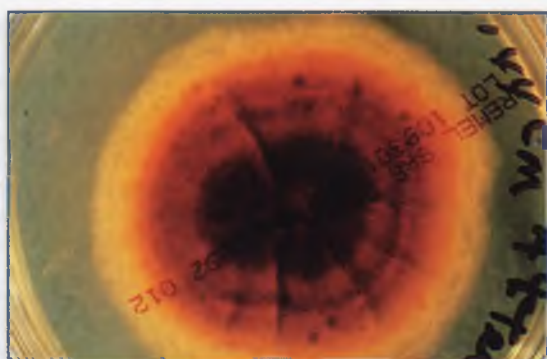
MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS DEMATIÁCEOS AISLADOS CON FRECUENCIA

Los hongos filamentosos dematiáceos (oscuros) se caracterizan por el crecimiento de colonias de color verde oscuro, castaño o negro, con pigmentación negra en el reverso de la superficie. La mayoría de las especies ambientales crecen con rapidez y producen colonias maduras dentro de los 5 días. Las especies de crecimiento lento, que requieren dos semanas o a veces más antes de poder observar colonias maduras, a menudo se aíslan en muestras clínicas tomadas de pacientes con micetomas o cromomicosis. Aquí se muestran las fotografías de colonias representativas de los hongos filamentosos dematiáceos que crecen en agar dextrosa de Sabouraud.

- A. Superficie algodonosa gris a negra, de una colonia de especies de *Alternaria* después de 6 días de crecimiento. El aspecto mostrado aquí no es distintivo de estas especies, también puede observarse en otras especies de hongos filamentosos dematiáceos ambientales.
- B. Reverso de la colonia de un hongo filamentoso dematiáceo, que ilustra la mayor tonalidad causada por la pigmentación castaño oscuro de las hifas vegetativas.
- C. Vista de la superficie de un subcultivo de especies de *Ulocladium*, que ilustra el aspecto veloso con pigmentación castaño oscuro a negro. Aunque en ciertas cepas de hongos dematiáceos con frecuencia se observan anillos concéntricos claros y más oscuros, aquí no se distinguen.
- D. Vista de la superficie de una colonia de *Phialophora verrucosum* después de 14 días de incubación. Esta cepa particular tiene un color gris oscuro a negro, con una textura vellosa. Es necesario realizar el estudio microscópico, porque otras especies de crecimiento lento pueden formar colonias con aspecto similar.
- E. Vista de la superficie de una colonia de *Fonsecaea pedrosoi* después de 16 días de incubación. La colonia es bastante pequeña, típica para la especie y se observa la pigmentación castaño oscuro a negra característica. Esta cepa tiene un aspecto más aplanado con consistencia similar al ante.
- F. Vista de la superficie de una colonia de crecimiento más rápido (5 días), de la cepa ambiental de especies de *Cladosporium*, que ilustra la superficie verde oscuro, con aspecto de ante, interrumpida por pliegues irregulares. Las cepas ambientales de las especies de *Cladosporium* pueden aparecer verde oscuro, como se muestra aquí, o pueden ser grises, gris castaño o castaño negruzco y simulan otros hongos dematiáceos.
- G. Vista de la superficie de otra variante de una especie de *Cladosporium* del ambiente que muestra una consistencia coriácea, gris oscuro. La textura de la colonia entre los hongos dematiáceos puede ser algodonosa, vellosa, similar al ante o coriácea.
- H. Aspecto de la superficie levaduriforme, plana y lisa de *Aureobasidium pullulans* después de 6 días de incubación. Estas especies deben ser las primeras en las que se piense cuando se observe una "levadura negra," similar a la mostrada aquí; sin embargo, también deben considerarse ciertas cepas de *Exophiala wernickii* (llamadas sinamorfos *Phaeoannelomyces*) que formarán un micelio bajo, veloso con hifas verdaderas después de varios días adicionales de incubación.



A



B



C



D



E



F



G



H

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE DERMATÓFITOS

Las colonias representativas de los hongos filamentosos dermatófitos en medios de cultivo artificiales no son características. Hay variación suficiente de cepas y diferencias en el aspecto de la misma cepa, de acuerdo con el tipo de medio de cultivo utilizado y las condiciones ambientales durante la incubación, de modo que la morfología de la colonia no es un criterio fiable para hacer identificaciones presuntivas. Casi siempre son necesarios los estudios microscópicos para arribar a la identificación definitiva. Aquí se muestran fotografías de colonias seleccionadas de dermatófitos que crecen en agar dextrosa de Sabouraud a 30 °C, escogidas para mostrar ciertas características que pueden brindar indicios para la identificación presuntiva.

- A. Colonia de *Microsporum canis* después de 5 días de incubación. Las colonias tienden a ser algodonosas o, a veces, granulares si la conidiación es densa. El crecimiento amarillo limón observado aquí, con pigmento que también se extiende al reverso de la superficie, es un indicio que sugiere *M. canis*.
- B. Superficie de una colonia pulverulenta, amarillo intenso de *Microsporum gypseum* después de 6 días de incubación. *M. gypseum* tiende a presentar una esporulación densa; por consiguiente, es más propenso a producir colonias granulares que *M. canis*.
- C. Superficie de una variante lisa y blanca de *Trichophyton mentagrophytes*, sin evidencia de pigmentación de fondo en el agar. La colonia ilustrada aquí no es típica y se requiere el estudio microscópico para su identificación.
- D. Superficie de una variante suave y esponjosa de *Trichophyton mentagrophytes* que muestra pigmentación rojiza del agar de base. La pigmentación rojo vinosa es un rasgo que sugiere *T. rubrum*; sin embargo, ciertas cepas de *T. mentagrophytes* también pueden producir pigmento rojizo al crecer en agar dextrosa de Sabouraud. No obstante, la pigmentación nunca es tan intensa como en *T. rubrum* cuando las colonias crecen en agar harina de maíz o agar dextrosa patata.
- E. Reverso de una colonia de *Trichophyton rubrum* que crece en agar dextrosa patata. La pigmentación rojo vinoso intensa es característica de las especies y es especialmente intensa cuando la colonia crece en agar dextrosa patata o agar harina de maíz.
- F. Crecimiento comparativo de *T. mentagrophytes* (parte inferior) y *T. rubrum* (parte superior) en agar harina de maíz, que muestra la diferencia distintiva en la pigmentación entre ambas especies.
- G. Superficie de una colonia pequeña de *Trichophyton tonsurans* después de 14 días de incubación. *T. tonsurans* crece más lento en el agar dextrosa de Sabouraud. La mayoría de las cepas producen cierta pigmentación amarillo castaña. La superficie tiende a ser granular y con frecuencia se observan pliegues radiales. Salvo el crecimiento más lento, las colonias de *T. tonsurans* parecen similares a las de las especies de *Scopulariopsis* y *Aspergillus terreus*.
- H. Superficie de una colonia de *Epidermophyton floccosum* después de 6 días de incubación. Esta colonia parece más suave y esponjosa que granular y tiene una pigmentación amarillo intensa. Las colonias clásicas de *E. floccosum* se describen como verde caqui. La textura de la colonia tiende a ser más suave y esponjosa que granular, ya que este género no produce microconidios.



A



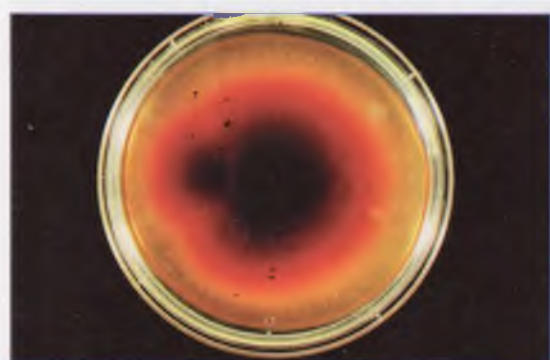
B



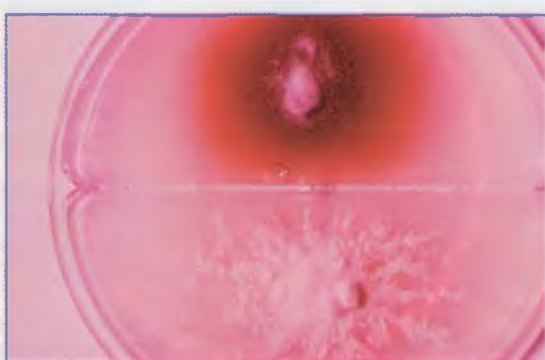
C



D



E



F



G

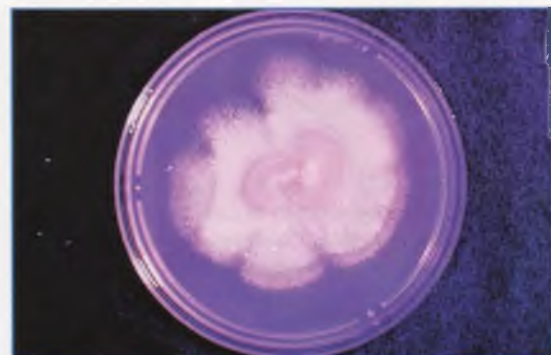


H

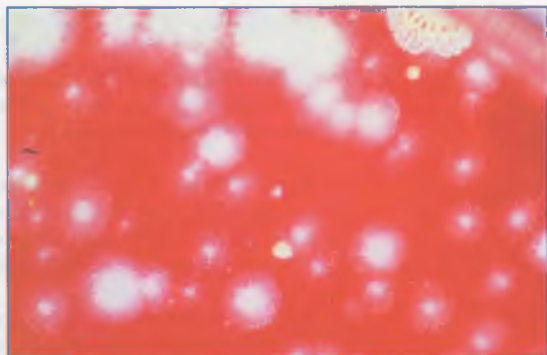
MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE HONGOS DIMORFOS

Los hongos dimorfos, denominados así porque crecen en forma de hongo filamentoso entre 25 °C y 30 °C (temperatura ambiente) y en forma de levadura a 37 °C, son patógenos para los seres humanos y causan micosis profundas. Aunque la identificación de la especie definitiva depende del estudio microscópico, la confirmación de que una especie dada pertenece al grupo de hongos dimorfos depende de la demostración en el laboratorio de ambas formas: filamentosa y levaduriforme. La forma filamentosa del hongo puede convertirse a la forma de levadura mediante la incubación de subcultivos en medios enriquecidos a 37 °C y observando en la microscopia la aparición de las levaduras típicas de las especies. Con el advenimiento de técnicas de extracto de exoantígeno y ensayos de sondas de ácidos nucleicos, las pruebas de conversión se realizan sólo de modo infrecuente en la mayoría de los laboratorios clínicos.

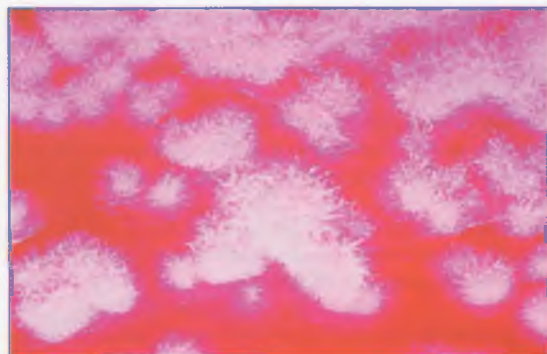
- A. Superficie de la colonia de un hongo filamentoso dimorfo, que ilustra tanto la forma de levadura (*central*) como la forma filamentosa (*periferia*). Esta colonia se incubó durante 14 días a 30 °C. Cuando se observa esta mezcla de formas de levadura y filamentosa, puede sospecharse uno de los hongos dimorfos, en especial si la colonia presenta crecimiento relativamente lento y el hongo filamentoso tiene consistencia vellosa o de telaraña.
- B. Colonias de *Blastomyces dermatitidis* que crecen en agar sangre de carnero al 5% después de 5 días de incubación. Nótese el aspecto de telaraña de estas colonias, un indicio de que el aislamiento puede corresponder a un hongo dimorfo y alertando para que se tomen precauciones especiales al realizar los subcultivos o las preparaciones microscópicas en fresco a fin de evitar una infección adquirida en el laboratorio.
- C. Aspecto de las colonias de *Blastomyces dermatitidis* cuando la incubación se realiza a 37 °C, durante una conversión de la fase filamentosa a la de levadura. Hay una forma intermedia de las colonias entre filamentosa y de levadura conocida como "fase espinosa". Nótese las espículas bastante toscas formadas por estas colonias blancas.
- D. Colonias de *Histoplasma capsulatum* en agar infusión de cerebro y corazón después de 25 días de incubación a 30 °C. Las colonias son blancas y su consistencia es similar a la de las telarañas. Estas colonias no tienen ninguna característica distintiva y es necesario el examen microscópico para la identificación.
- E. Superficie de una placa de agar sangre de carnero al 5% incubada a 37 °C en la cual crecen colonias de levaduras pequeñas, amarillentas de *Histoplasma capsulatum* después de la conversión exitosa de la forma filamentosa. Las formas de levadura son similares a otras levaduras verdaderas, sólo que el crecimiento es muy lento y las colonias siguen siendo bastante pequeñas.
- F. Superficie de colonias de *Coccidioides immitis* que crecen en agar sangre de carnero al 5% después de 7 días de incubación. Las colonias son blanco grisáceas y tienen una suave textura vellosa. Las colonias de *C. immitis* que crecen en el agar sangre a menudo muestran un cambio de color al rojo por la hemoglobina que filtra del medio de cultivo (no mostrado aquí).
- G. Superficie de una colonia de levadura lisa, gris castaño, de *Sporothrix schenckii*. Debido a la esporulación sumamente delicada de *S. schenckii*, las colonias a menudo aparecen más como levaduras que filamentosas, incluso cuando se incuban entre 25 °C y 30 °C. Después de la incubación prolongada, las colonias de *S. schenckii* tienden a oscurecerse considerablemente y en algunas cepas se tornan negro azabache (véase lámina en color 21-5H).
- H. Tubos de agar infusión de cerebro y corazón, uno de los cuales contiene cicloheximida, en los que crecen las formas de levadura (*parte superior*) y filamentosa (*parte inferior*) de *S. schenckii*. Debido a la naturaleza delicada de las hifas y las estructuras de fructificación, la colonia del hongo filamentosa aparece bastante levaduriforme. Las colonias tienden a oscurecerse cuando maduran y en algunos casos, como el que se ilustra aquí, adquieren una pigmentación negra característica.



A



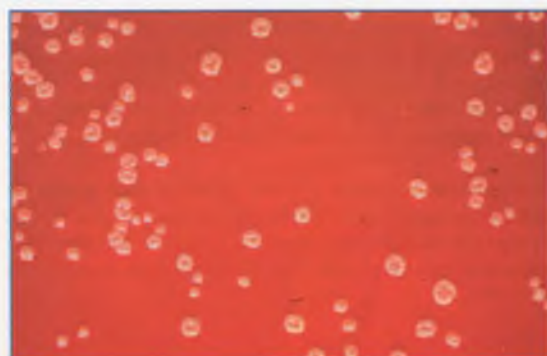
B



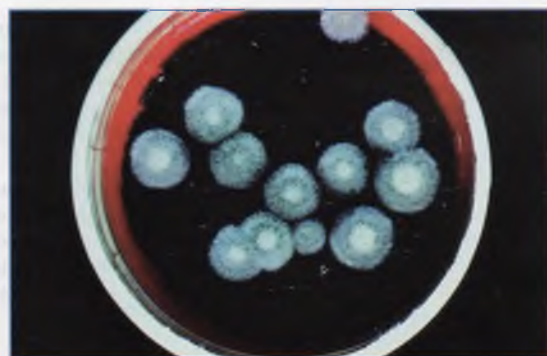
C



D



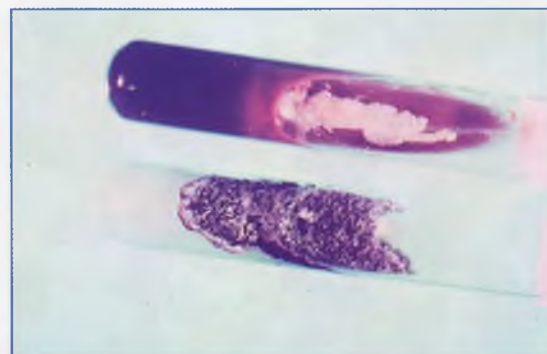
E



F



G



H

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE LEVADURAS AISLADAS CON FRECUENCIA

La identificación por el laboratorio de las levaduras importantes en medicina implica la evaluación visual de las características de la colonia y la interpretación de los resultados de las pruebas de fermentación y de asimilación de hidratos de carbono.

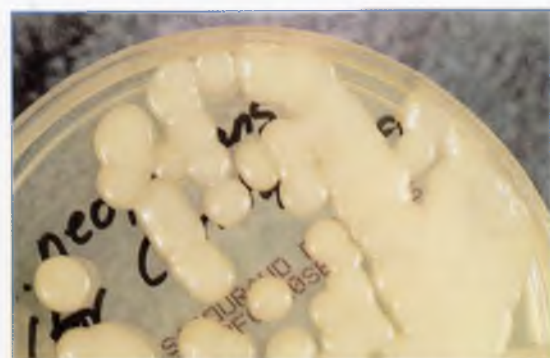
- A. Superficie de una colonia de levadura lisa, blanquecina obtenida de un subcultivo de *Candida albicans* después de 3 días de incubación. La colonia que se muestra aquí no es distintiva de *Candida albicans*, sino que puede verse con otras especies de *Candida* y levaduras de otras especies. Cuando en el laboratorio de microbiología se aísla una colonia levaduriforme, como la ilustrada aquí, es necesario realizar otros estudios.
- B. Superficie de una placa de agar sangre de carnero al 5% en la que crecen colonias blancas de una levadura. Las extensiones similares a pies desde los márgenes de las colonias son producidas típicamente por *Candida albicans*.
- C. Colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar dextrosa de Sabouraud después de 4 días de incubación. La consistencia mucóide característica de las colonias es indicativa de una levadura formadora de cápsula y sugiere especies de *Cryptococcus*. Para identificar *C. neoformans* se requieren otras pruebas.
- D. Colonias de *Cryptococcus neoformans* que crecen en placas con agar semillas de níger. La pigmentación castaño rojiza de las colonias cuando crecen en este medio es característica de *C. neoformans* y permite la distinción de otras especies de *Cryptococcus* que son incapaces de producir colonias pigmentadas oscuras.
- E. Colonias de *Torulopsis (Candida) glabrata* que crecen en agar dextrosa de Sabouraud después de 3 días de incubación a 30 °C. Se sugiere la presencia de *T. glabrata* cuando se observan colonias más pequeñas y translúcidas, aunque para confirmar la identificación son necesarios otros estudios.
- F. Colonias de las especies de *Rhodotorula*, que ilustran la pigmentación rojo anaranjada distintiva de este género. Algunas cepas de especies de *Cryptococcus* también pueden producir una pigmentación rojiza; por consiguiente, pueden ser necesarios otros estudios para realizar la identificación definitiva.
- G. Superficie de una placa de agar sangre en la que sólo crecen colonias levaduriformes de *Malassezia furfur* en el área donde se había agregado aceite de oliva virgen. *M. furfur* es una levadura lipofílica que se encuentra en la piel humana. Un medio con alto contenido en aceite (como el aceite de oliva virgen extendido en la superficie mostrado aquí) es necesario para el aislamiento de esta levadura. Debe notificarse al personal de laboratorio si se sospecha tía versicolor de modo que pueda hacerse la preparación de cubierta con aceite.
- H. Microfotografía de un frotis teñido para ácido-alcohol resistencia a partir de una colonia aislada de *Saccharomyces cerevisiae* que crece en la superficie de agar para ascosporas. Los cuerpos esféricos, teñidos de rojo (ácido-alcohol resistentes) observados aquí son las ascosporas. *Hansenula anomala* también produce ascosporas ácido-alcohol resistentes cuando crecen en agar para ascosporas; sin embargo, presentan un contorno con forma de gorra en lugar de ser esféricas.



A



B



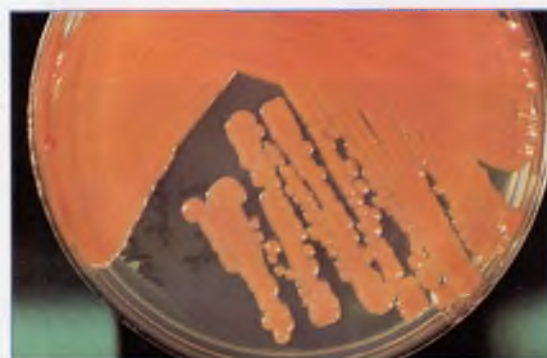
C



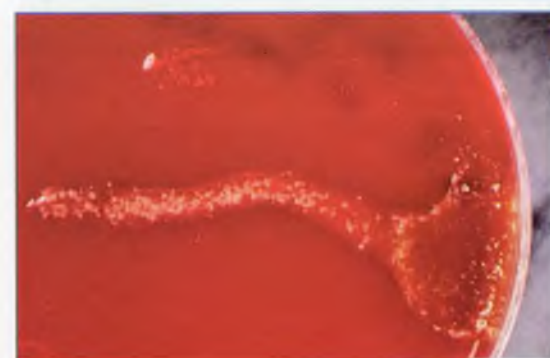
D



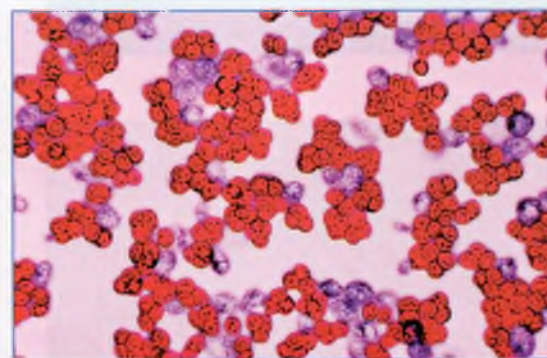
E



F



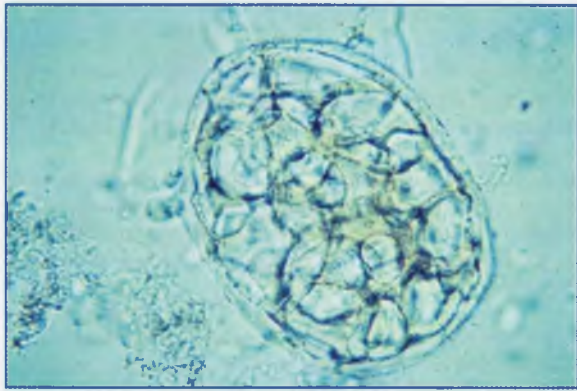
G



H

ARTEFACTOS: "NADIE CONOCE LOS ESCOMBROS QUE YO HE VISTO"

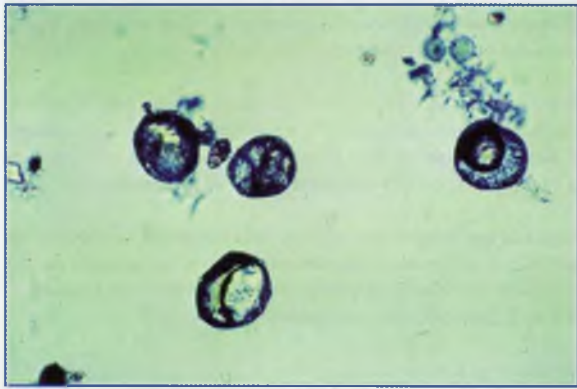
- A. Materia vegetal que simula un huevo de *Ascaris lumbricoides* decorticado.
- B. Fibra del músculo esquelético de carne roja ingerida que simula un forma larvaria de un parásito.
- C. Partículas de talco que a menudo contaminan las muestras recolectadas cuando se utilizan guantes de goma y que simulan quistes de amebas.
- D. Cristales que simulan huevos de parásitos.
- E. Fibras vegetales que simulan larvas rabditoides.
- F. Grano de polen equinulado que simula un huevo de especies de *Taenia*.
- G. Grano de polen que simula un huevo de uncinaria, de *Strongyloides* o de *Ascaris* decorticado.
- H. Pelusa de durazno que simula una larva filariforme.



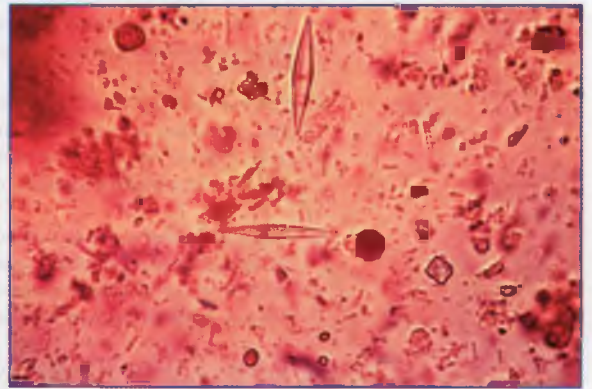
A



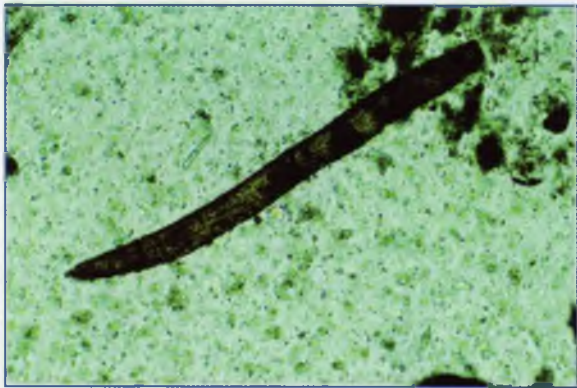
B



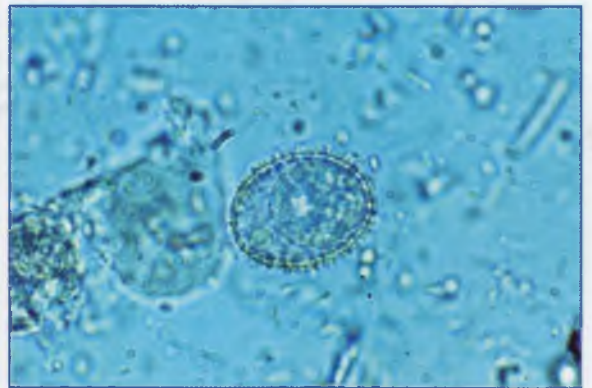
C



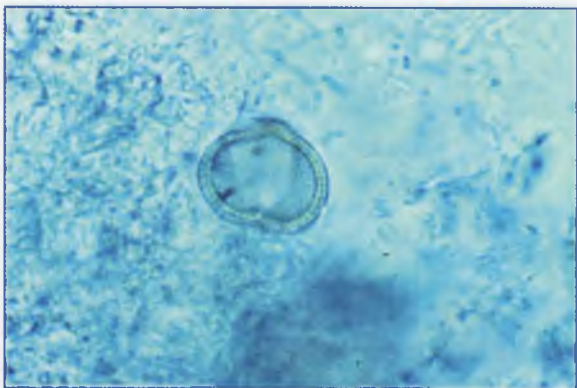
D



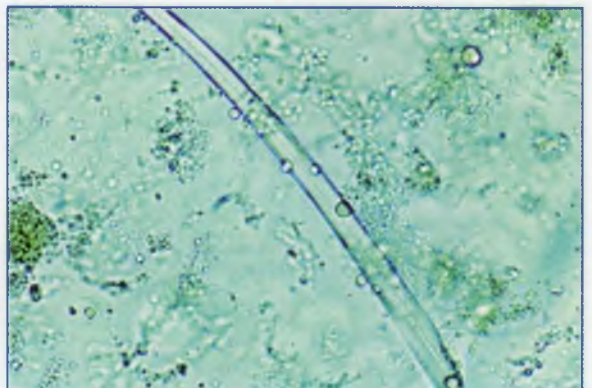
E



F



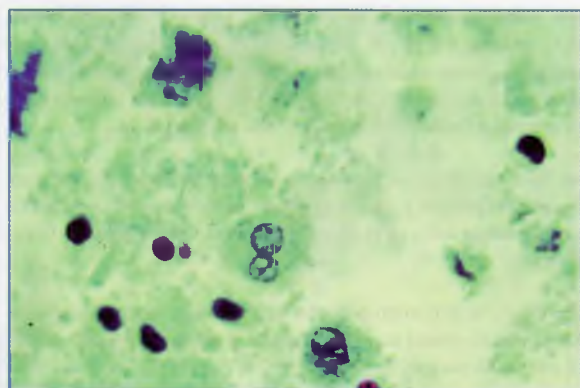
G



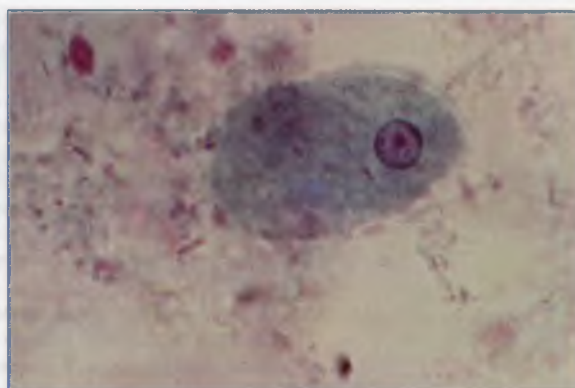
H

AMEBAS/FLAGELADOS INTESTINALES

- A. Microfotografía de un frotis de heces con tinción tricrómica. En el centro del campo hay un neutrófilo segmentado con dos lóbulos que se asemeja a un quiste del tipo *Entamoeba*. Siempre debe tenerse cuidado de que los leucocitos polimorfonucleares en las muestras fecales no se confundan con quistes de amebas.
- B. Microfotografía de un frotis de heces teñido con hematoxilina férrica, que ilustra un trofozoíto único de *Entamoeba histolytica* de 10 μm en su máxima dimensión. Nótese el núcleo esférico que contiene el cariosoma diminuto y compacto ubicado en el centro y la distribución uniforme, como cuentas, de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear (núcleo tipo *Entamoeba*). La extensión de unseudópodo único refleja la movilidad direccional con un propósito definido.
- C. Microfotografía de una preparación en fresco directa con yodo de un quiste de *Entamoeba histolytica*, de 12 μm de diámetro. Se observan cuatro núcleos, cada uno de los cuales contiene un cariosoma pequeño y central, y una delicada banda de cromatina nuclear alrededor de la membrana nuclear.
- D. Corte de la mucosa del colon teñido con hematoxilina y eosina que ilustra la infiltración por gran cantidad de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Los trofozoítos aparecen como cuerpos esféricos irregulares y pálidos en la tinción, algunos de los cuales muestran un núcleo tipo *Entamoeba*. (400 $\times$).
- E. Frotis de heces teñido con hematoxilina férrica que ilustra un trofozoíto solo de *Entamoeba coli*. Nótese el gran cariosoma, la distribución irregular de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear y el citoplasma tosco y “sucio” que contiene detritos sin digerir y varias vacuolas de tamaño irregular. Los trofozoítos de *E. coli* tienden a ser más grandes que los de *E. histolytica*, que varían entre 14 y 25 μm de diámetro.
- F. Quiste de *Entamoeba coli* con tinción tricrómica que ilustra cinco núcleos, cada uno de los cuales contiene un cariosoma relativamente grande ubicado en la parte central o levemente excéntrico. La presencia de más de cuatro núcleos descarta *Entamoeba histolytica*. Se observa un cuerpo cromatoide único intracitoplasmático con forma de barra en la posición en hora 2, teñido de rojo, con extremos puntiagudos.
- G. Tinción con hematoxilina férrica de un prequiste de *Entamoeba histolytica* de 8 μm de diámetro. Los prequistes a menudo tienen una vacuola única que simula un quiste de *Iodamoeba bütschlii*. Nótese en la fotografía la distribución característica “tipo *Entamoeba*” de la cromatina alrededor de la membrana nuclear, lo que descarta *I. bütschlii*.
- H. Tinción con hematoxilina férrica de un quiste pequeño (6 μm de diámetro) de *Entamoeba hartmanni*. El tamaño es similar al de *Endolimax nana*; sin embargo, el núcleo tipo *Entamoeba* y las barras cromatoides con extremos redondeados descartan esa posibilidad.



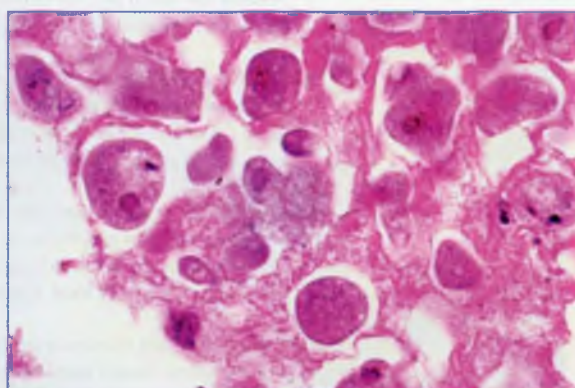
A



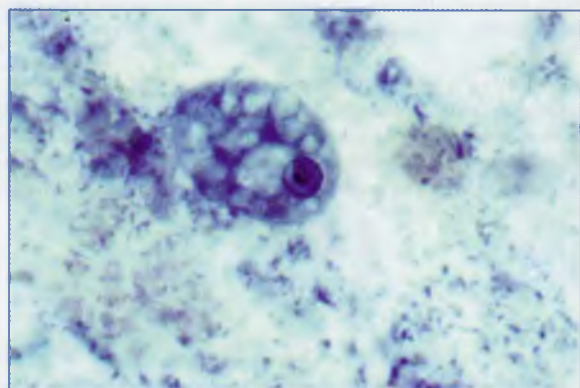
B



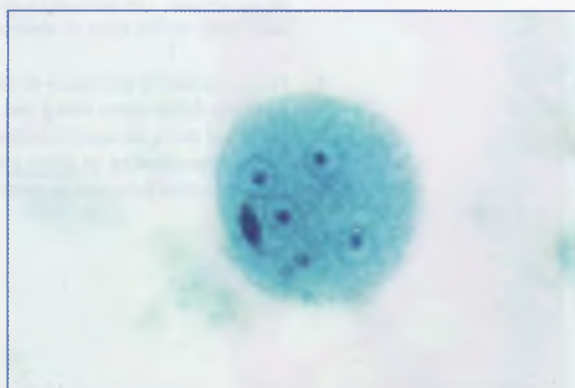
C



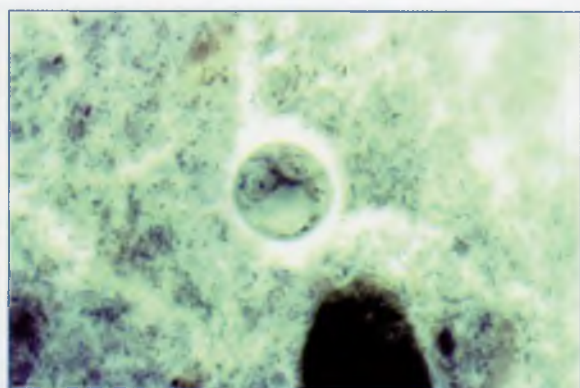
D



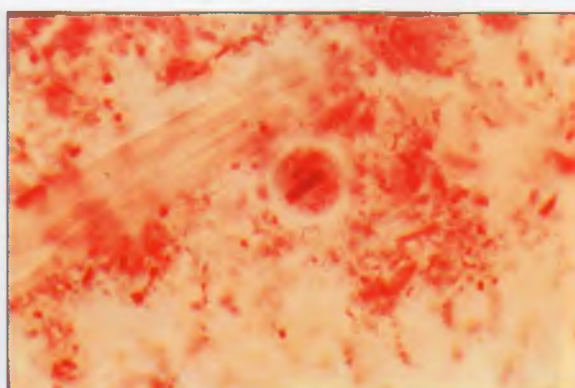
E



F



G

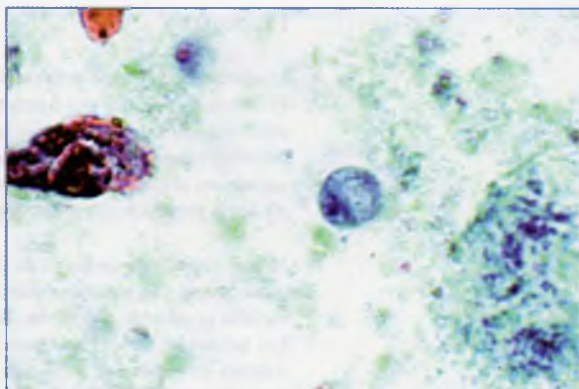


H

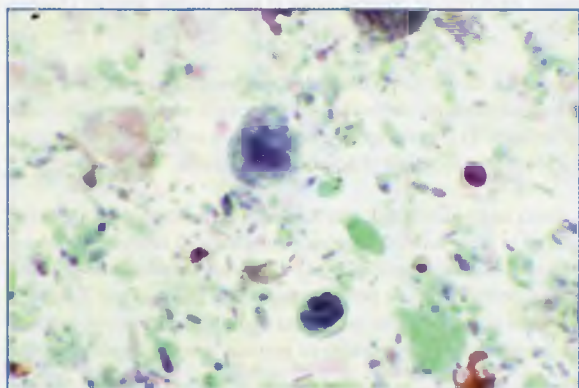
- I. Frotis de heces con tinción tricrómica que ilustra un trofozoíto de *Iodamoeba bütschlii*. Esta forma mide alrededor de 14 µm de diámetro; el tamaño varía de 6 a 25 µm. Nótese el núcleo con un gran cariosoma rodeado por un espacio vacío, sin una membrana nuclear visible (conocido como núcleo en “bola en un hoyo”). Los trofozoítos más pequeños son difíciles de distinguir de los de *Endolimax nana*. Para hacer un diagnóstico definitivo deben examinarse otros campos a fin de detectar quistes más característicos.
- J. Frotis de heces con tinción tricrómica que ilustra un quiste de *Iodamoeba bütschlii* de 10 µm de diámetro. El núcleo tiene un gran cariosoma central rodeado por una zona clara con ausencia de cromatina periférica (núcleo en “bola en un hoyo”). Nótese la gran vacuola única en el citoplasma, que se tiñe positiva con la tinción de yodo, lo que indica su contenido de glucógeno.
- K. Frotis de heces con tinción tricrómica que ilustra un trofozoíto pequeño de *Endolimax nana* (flecha), que mide 8 µm de diámetro. Nótese el pequeño núcleo central con un cariosoma prominente rodeado por un espacio claro y estrecho, y la ausencia de cromatina nuclear.
- L. Preparación teñida con azul de metileno que ilustra un quiste de *Endolimax nana*, de 6 × 8 µm de diámetro. Nótese los cuatro núcleos diminutos, cada uno de los cuales contiene un cariosoma muy pequeño, rodeado por un espacio claro.
- M. Frotis de heces con tinción tricrómica que ilustra una forma esférica de *Blastocystis hominis*, con un cuerpo central prominente rodeado por material nuclear dispuesto en grumos contra la membrana interna de la pared del quiste. La forma aquí mide 10 µm; sin embargo, presentan considerables variaciones de tamaño, entre 5 y 20 µm, presentes en la misma preparación.
- N. Microfotografía de un corte del epitelio del intestino delgado teñido con hematoxilina y eosina. Nótese el pequeño trofozoíto con forma de pera de *Giardia lamblia*, con su familiar “facies simiana”, que aparece como un avión que busca un lugar para aterrizar. De hecho, los trofozoítos de *Giardia* se adhieren a la mucosa, donde causan daño local y producen los síntomas característicos de diarrea y flatulencia.
- O. Frotis con tinción tricrómica que ilustra un trofozoíto de *G. lamblia* reconocido por su forma característica, oval a elíptica, los dos núcleos, con cariosomas centrales prominentes, que yacen en la parte anterior sobre cada lado del axostilo en forma de vara que recorre la longitud del organismo. Nótese también el cuerpo parabasal eosinófilo (el “bigote”) ubicado hacia atrás del axostilo. Estas características dan el aspecto de facies simiana. Los trofozoítos de *G. lamblia* tienen seis flagelos, dos anteriores, dos posteriores y dos caudales; sólo tres de éstos se observan en la fotografía.
- P. Frotis con tinción tricrómica de detritos intestinales que incluye un quiste de *Giardia lamblia*. El quiste presenta una forma típica oval y una pared externa delgada. Mide de 9 a 12 µm de diámetro y de modo típico incluye el doble de orgánulos observados en el trofozoíto. Cada quiste tiene cuatro núcleos, sólo dos o tres suelen observarse en un único plano de foco, dos axostilos, múltiples cuerpos parabasales y flagelos que están envueltos debajo de la pared lisa del quiste; todo esto no puede observarse en un único plano de foco.



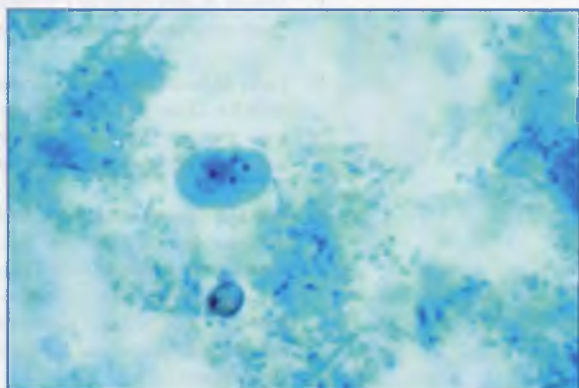
I



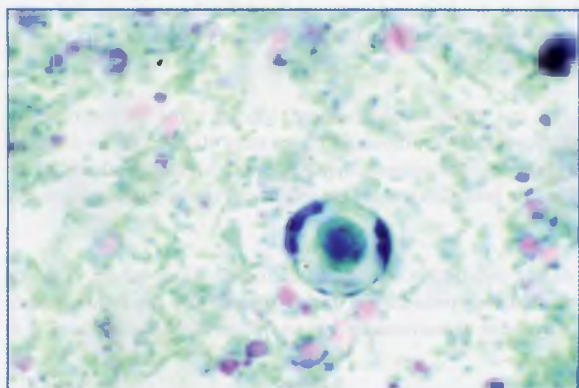
J



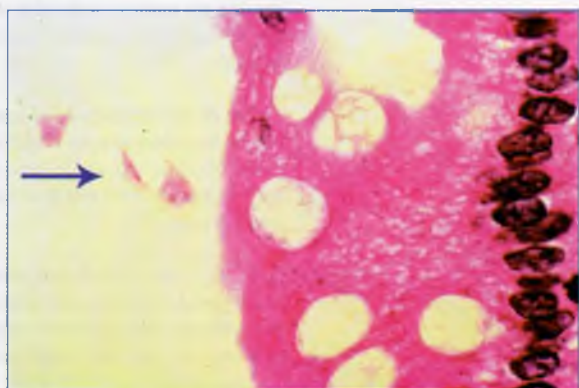
K



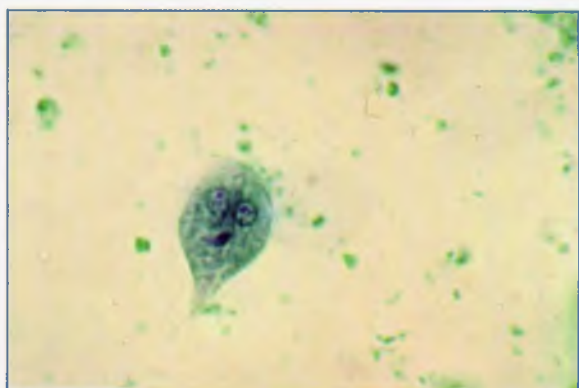
L



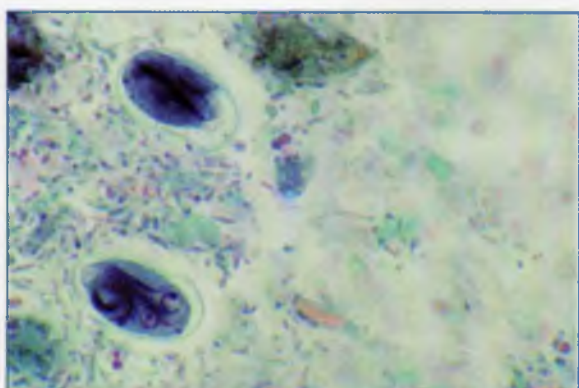
M



N



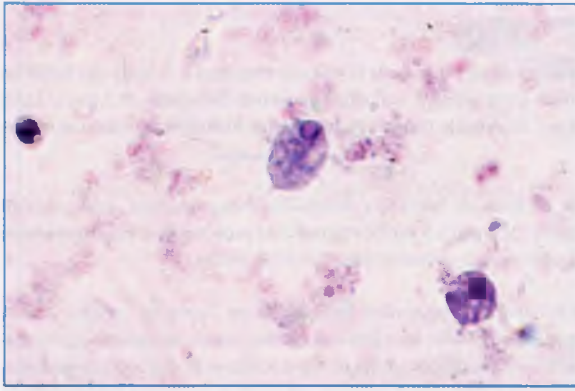
O



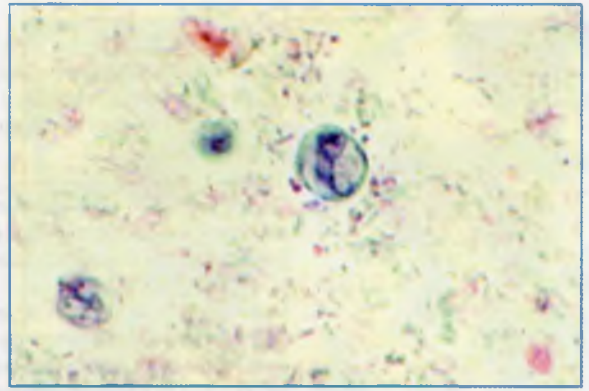
P

FLAGELADOS

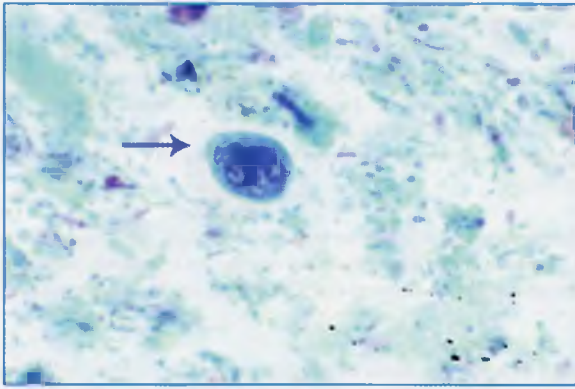
- A. Microfotografía de dos trofozoítos de *Chilomastix mesnili*, uno en un extremo, el otro en una vista lateral. El trofozoíto presenta una forma típica de pera y puede identificarse con facilidad mediante la observación en el extremo anterior de un núcleo único, la protrusión posterior del axostilo y un surco espiralado, que es difícil de observar en las preparaciones en fresco. La presencia de un mechón de tres flagelos anteriores, adyacentes al núcleo, es una característica de identificación adicional que es difícil de observar en la mayoría de las preparaciones microscópicas en fresco.
- B. Microfotografía de un quiste de *C. mesnili* en el que se observan con facilidad un núcleo único, con cariosoma central y un citostoma diferenciado, que aparece como un área clara bien delineada. En esta microfotografía se advierte el contorno del citostoma, descrito como bastón con un extremo en forma de gancho. Los quistes presentan una forma típica de limón, con pared celular lisa y un diámetro de 6 μm a 70 μm . Además del citostoma, a menudo tienen un bulto hialino anterior que, cuando se lo observa, es útil para la identificación (véase lámina en color 22-3C).
- C. Imagen de otro quiste de *Chilomastix mesnili*, en el cual se observa mejor el bulto hialino anterior (flecha). También se observan el núcleo y el citostoma.
- D. Frotis de heces con tinción tricrómica que destaca un trofozoíto único de *Dientamoeba fragilis*. Este quiste mide 8 $\times$ 12 μm y se puede observar con facilidad el núcleo doble característico; cada uno presenta un cariosoma grande y la membrana nuclear poco definida. El citoplasma de este trofozoíto es finamente granular y muestra evidencia temprana de desintegración, como lo refleja el nombre de la especie.
- E. Preparación con hematoxilina férrica que ilustra un trofozoíto único de *Trichomonas hominis*. Nótese la forma típica de gota y el núcleo único ubicado en la parte anterior, pero no contra la pared celular como es característico del trofozoíto de *Chilomastix mesnili* (lámina en color 22-3A). En esta microfotografía se observa el axostilo que corre en sentido longitudinal como un flagelo posterior único. Los típicos es que *T. hominis* tenga tres a cinco flagelos anteriores, un flagelo posterior y una membrana ondulante que recorre la longitud total del cuerpo, una estructura que se advierte con facilidad sólo en preparaciones realizadas de cultivos celulares.
- F. Microfotografía de un corte teñido con hematoxilina y eosina de una biopsia de intestino que ilustra la invasión por muchos trofozoítos de *Balantidium coli*. Nótese el macronúcleo definido con forma de bastón o de herradura, una característica que, junto con su gran tamaño (80 μm de diámetro), es útil para la identificación.
- G. Imagen de un trofozoíto de *Balantidium coli*, que ilustra un contorno oval con una pared lisa recubierta en toda su circunferencia por cilios cortos y delicados. Estos trofozoítos miden entre 40 μm y 70 μm de ancho y entre 50 μm y 100 μm de largo. La presencia de un citostoma anterior, la circunferencia recubierta de cilios y el macronúcleo con forma de bastón o de herradura son las características claves que conducen a la identificación.
- H. Se ilustra un quiste de *Balantidium coli* en una preparación con tinción tricrómica. Estos quistes varían de 50 a 75 μm de diámetro, son esféricos o elipsoidales y presentan un núcleo característico con forma de pesa, observado claramente en esta fotografía. Adyacente al macronúcleo hay un núcleo único poco definido y el citoplasma incluye una vacuola metabólica.



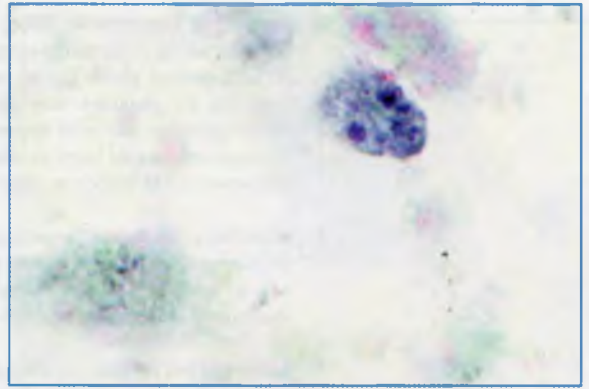
A



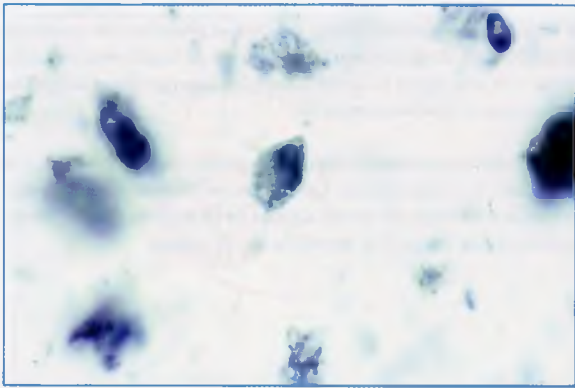
B



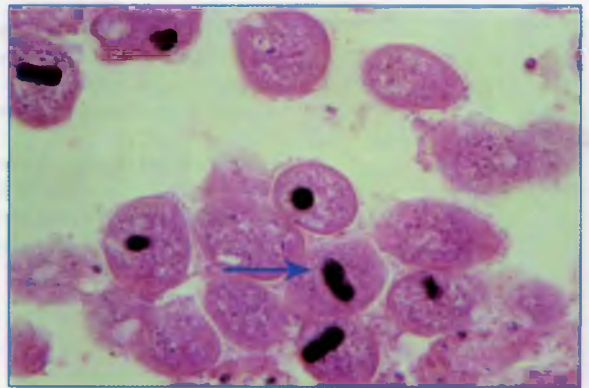
C



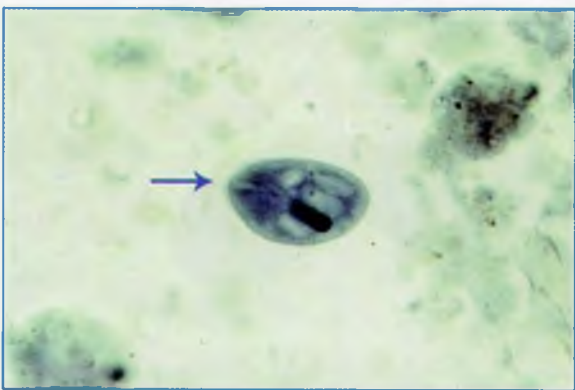
D



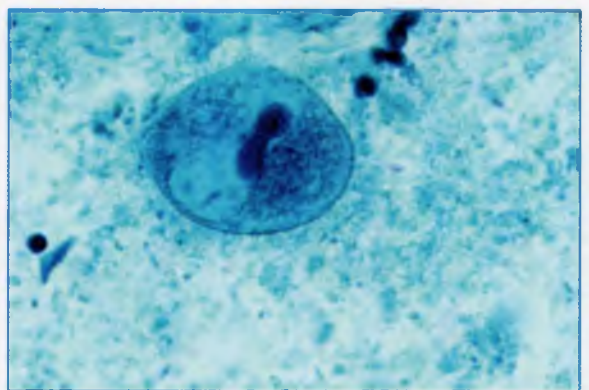
E



F



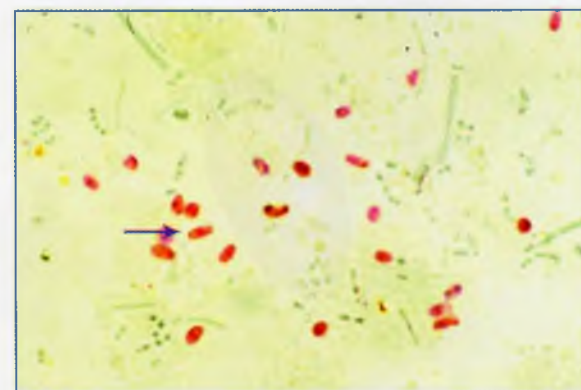
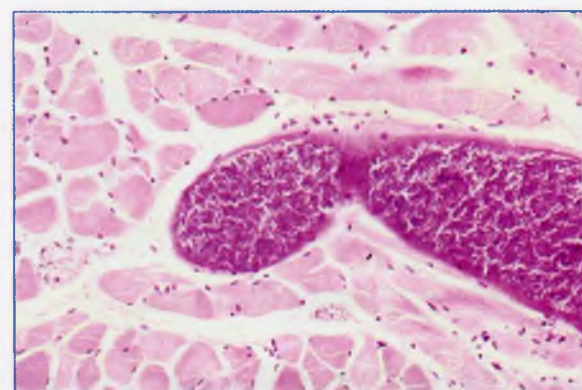
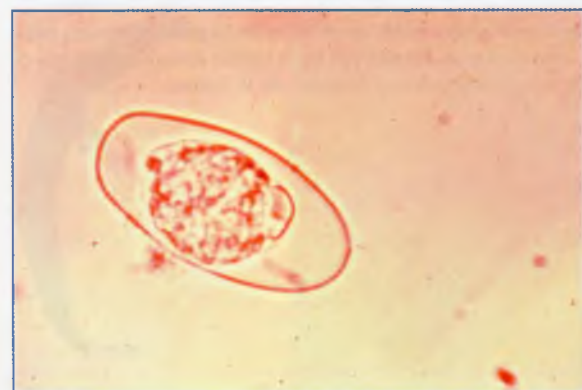
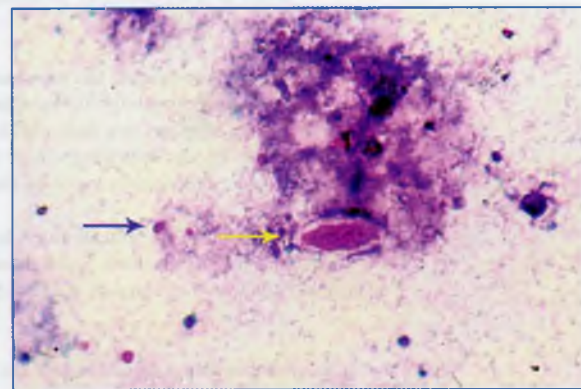
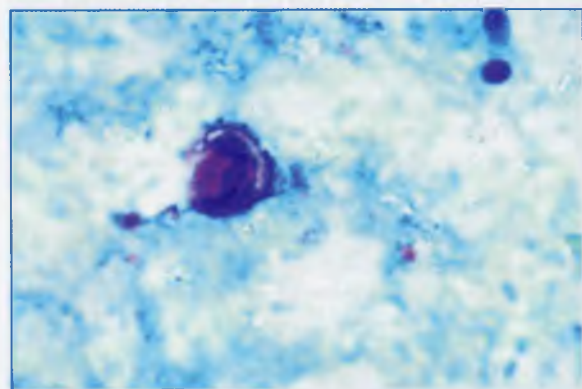
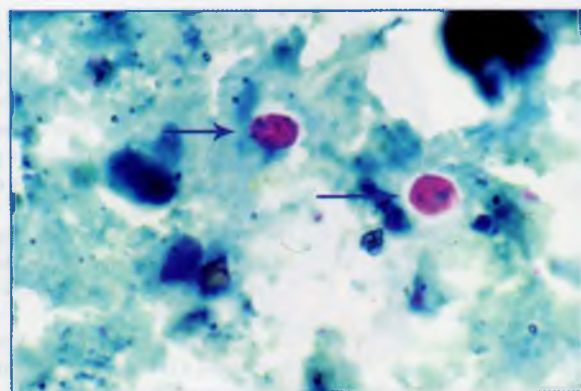
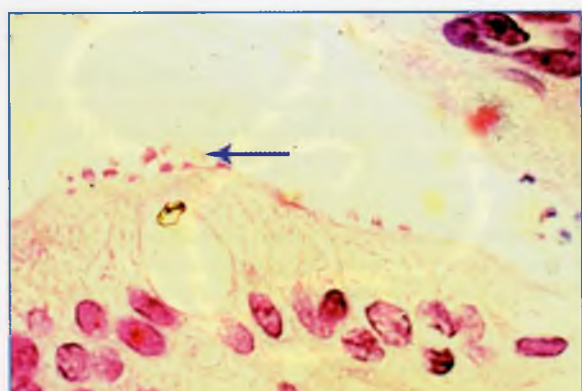
G



H

COCCIDIOS

- A. Microfotografía de un corte teñido con hematoxilina y eosina de la mucosa intestinal a lo largo del borde en cepillo de las células epiteliales a las cuales están adheridos muchos ooquistes diminutos de 2 μm a 3 μm de diámetro de especies de *Cryptosporidium*. Es posible realizar el diagnóstico histológico cuando se observan estos agregados.
- B. Tinción para ácido-alcohol resistencia de un frotis de heces que ilustra dos ooquistes rojos, ácido-alcohol resistentes, con tinción homogénea, esféricos, de 4 μm a 5 μm de diámetro de especies de *Cryptosporidium*. Estas formas son diagnósticas cuando se observan en preparaciones con esta tinción.
- C. Microfotografía de un frotis de heces teñido para ácido-alcohol resistencia que ilustra un ooquiste único, esférico y ácido-alcohol resistente de especies de *Cyclospora*. Estos ooquistes tienen un tamaño aproximado del doble de los de las especies de *Cryptosporidium*, que varían de 8 μm a 10 μm de diámetro. Asimismo, los ooquistes de *Cyclospora* tienen una estructura interna mal definida, en lugar de la tinción homogénea de los de *Cryptosporidium*.
- D. Imagen con bajo aumento (250 $\times$) de un ooquiste ácido-alcohol resistente con forma de huso de *Isospora belli* ubicado en el centro del campo de visión. Estos ooquistes miden de 25 μm a 30 μm de largo, un tamaño relativamente grande que no puede apreciarse en esta imagen con bajo aumento, salvo cuando se compara con los ooquistes muy diminutos como manchas, de 5 μm de diámetro, de las especies de *Cryptosporidium* que están dispersos por el campo microscópico. La coexistencia de estas dos especies en la misma muestra de heces es altamente sugestiva de una persona con infección por HIV y siempre debe descartarse SIDA cuando se observa esta imagen.
- E. Microfotografía de una preparación en fresco directa que ilustra un ooquiste inmaduro, con forma elíptica de *Isospora belli*. Estos ooquistes miden 25-30 μm en el eje longitudinal y cuando son inmaduros, encierran sólo un único esporoquiste esférico, como se muestra en la fotografía. Compárese con el ooquiste maduro ilustrado en la lámina en color 22-4F.
- F. Imagen de una preparación directa en fresco de heces que ilustra un ooquiste maduro de *Isospora belli*, que encierra dos esporoquistes esféricos. Los esporoquistes, ahora maduros, son infectantes para un segundo huésped y están listos para liberar esporozoítos en el intestino cuando se ingieren.
- G. Corte de músculo esquelético teñido con hematoxilina y eosina dentro del cual se observan dos quistes de especies de *Sarcocystis*. Estos quistes miden 300 μm de diámetro y están repletos de bradizoítos enquistados inactivos. Los seres humanos se infectan con esta forma si, como huéspedes intermediarios accidentales, ingieren los ooquistes infectantes en alimentos o agua contaminados.
- H. Tinción de Weber de una preparación de heces que ilustra muchas esporas pequeñas, de 2 μm a 3 μm , con forma de bastón de especies de *Microsporidium*. Con esta tinción, las esporas se tiñen de salmón amarillento. Nótese el tabique transversal y delgado característico que divide algunas de las esporas (*flecha*) observadas en este campo microscópico, una característica útil para la identificación de género.

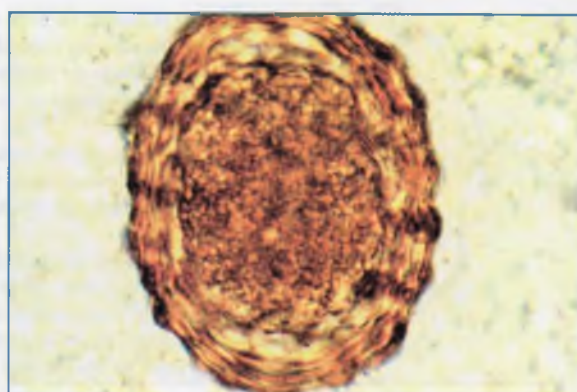


NEMATODOS

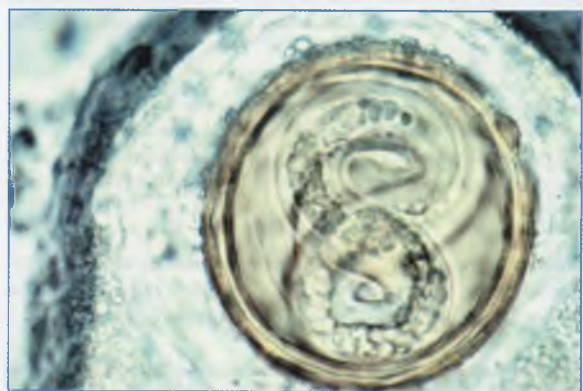
- A. Parásitos adultos machos y hembras de *Ascaris lumbricoides*. Los machos adultos suelen ser más cortos (20-25 cm) que las hembras (25-30 cm) y presentan una cola curva (parásito en la parte inferior de la fotografía). La cutícula lisa y no segmentada es una característica útil para distinguir estos parásitos de los gusanos de la tierra, que en ocasiones pueden encontrarse en inodoros y sistemas de aguas servidas donde pueden confundirse por los parásitos eliminados por las heces.
- B. Huevo de *Ascaris lumbricoides* algo ovoide, amarillo castaño, teñido con bilis, que mide de 45 μm a 60 μm de diámetro. Tiene una cáscara gruesa recubierta por una membrana albuminoide ondulante característica. La retracción y el desarrollo de la división interna indican fecundación y posible capacidad infectante.
- C. Se observa un huevo esférico, decorticado, de *Ascaris lumbricoides* que muestra una larva bien desarrollada próxima a la eclosión. Es obvio que este huevo es altamente infectante.
- D. Huevo fecundado de *Ascaris lumbricoides* que muestra una cáscara externa lisa. Cuando se expone a la bilis dentro de la luz intestinal, la cubierta externa albuminosa se disuelve y deja una superficie decorticada como la que se observa aquí.
- E. Fotografía compuesta que ilustra un parásito adulto de *Enterobius vermicularis* en el recuadro de la izquierda. Estos parásitos, que miden entre 0,3 mm y 0,5 mm de diámetro y entre 8 mm y 1,3 mm de largo, tienen un tubo digestivo bien desarrollado y órganos de reproducción interna. La cola puntiaguda y las alas parabucales (*flecha* en la fotografía de la izquierda) son diagnósticas. La imagen en primer plano en el recuadro de la derecha muestra mejor las alas parabucales.
- F. Fotografía en dos recuadros que ilustra huevos de *Enterobius vermicularis* grávido, el de la derecha tiene la larva bien desarrollada. Estos huevos tienen una pared delgada y lisa, y miden alrededor de 55 μm $\times$ 25 μm . Cada huevo es alargado y aplanado en uno de los lados, que se asemeja a un balón de fútbol americano desinflado.
- G. Fotografía de parásitos adultos *Trichuris trichiura* que muestra el segmento anterior largo, con forma de látigo característico y el cuerpo posterior más corto y grueso que se asemeja a un mango. Estos parásitos son relativamente pequeños; miden alrededor de 35-45 mm de longitud.
- H. Microfotografía de un huevo típico de *Trichuris trichiura* teñido con bilis, amarillo castaño, con una pared lisa, relativamente gruesa. Nótese la característica forma de barril y el tapón hialino distintivo con forma de cúpula en cada extremidad polar. De *A Pictorial Presentation of Parasites*, de H. Zaiman.



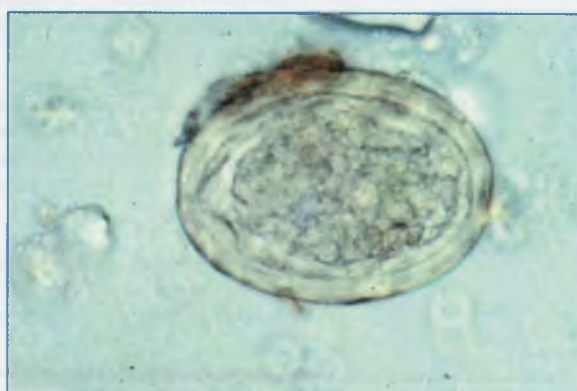
A



B



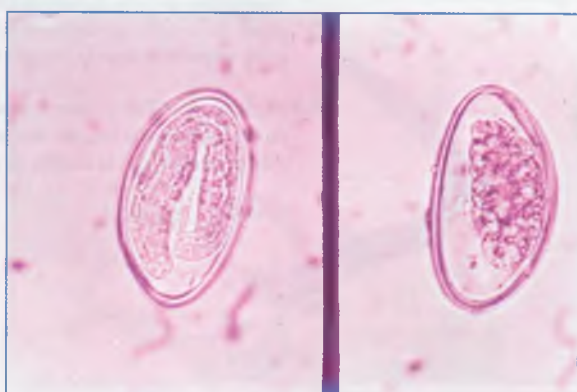
C



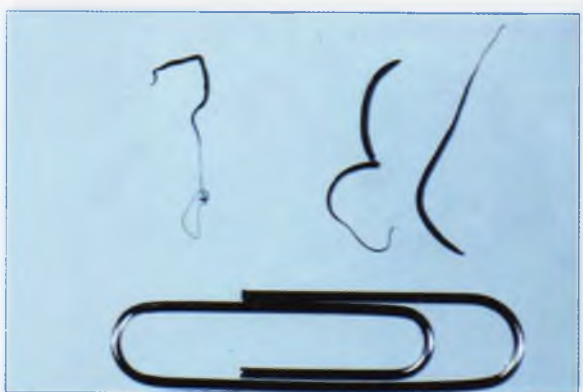
D



E



F



G

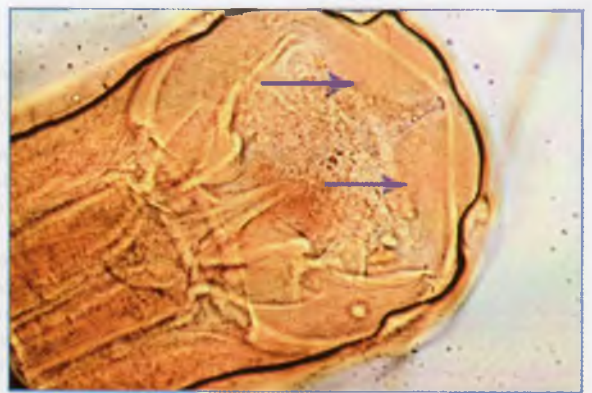


H

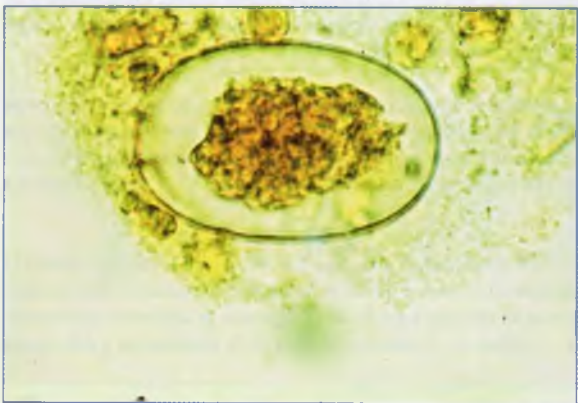
- I. Fotografía de la cápsula bucal de una uncinaria adulta. Los dientes quitinosos observados aquí son característicos de la uncinaria del Viejo Mundo, *Ancylostoma duodenale*. Esta cápsula bucal está bien adaptada para la adherencia profunda del parásito a la mucosa intestinal y producir la rotura de capilares, lo que le permite alimentarse con la sangre de la circulación.
- J. Imagen similar de la cápsula bucal de la uncinaria del Nuevo Mundo, *Necator americanus*, que ilustra las láminas cortantes características. Como sucede con *Ancylostoma duodenale*, esta cápsula bucal está bien adaptada para la adherencia profunda del parásito a la mucosa intestinal.
- K. Microfotografía de una preparación directa en fresco con yodo de heces que contiene un huevo ovalado típico de uncinarias, que mide alrededor de $40\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$, con su pared delgada y lisa característica, que al desprenderla en el proceso de división interno deja un espacio claro debajo de la cáscara. Estos huevos no pueden distinguirse de los de *Strongyloides stercoralis*. Por lo general esta identificación diferencial no es necesaria, ya que los huevos de *S. stercoralis* rara vez se eliminan por las heces.
- L. Microfotografía en dos recuadros en los que se comparan las cavidades bucales de las larvas rabditoides de uncinarias (*izquierda*) y de strongiloides (*derecha*). La cavidad bucal de la larva rabditoide de uncinaria es larga cuando se la compara con la de strongiloides. Las larvas rabditoides de las uncinarias rara vez se observan en las muestras fecales.
- M. Campo microscópico de una preparación directa de heces en la que se observa una larva rabditoide pequeña y enrollada de *Strongyloides stercoralis*, vista con bajo aumento ($100\times$). Estas larvas son muy móviles cuando se las observa en preparaciones en fresco. Es necesaria la observación de la cavidad bucal como se describió antes para confirmar el diagnóstico. Estas larvas miden en promedio $15\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y más de $200\text{ }\mu\text{m}$ de largo.
- N. Larvas rabditoides que, tras un breve período de alimentación de 2 a 3 días, evolucionan en larvas filariformes infectantes largas y delgadas que no se alimentan y que pueden alcanzar $700\text{ }\mu\text{m}$ de largo. Estas larvas filariformes pueden penetrar directamente por la piel del huésped humano con el contacto directo.
- O. Corte de intestino delgado teñido con hematoxilina y eosina en el que se observan larvas filariformes redondas y lisas de *Strongyloides stercoralis*, características de los hallazgos histológicos de individuos con reinfección de strongiloidiasis, que horadan en la lámina propia. En los pacientes con strongiloides e inmunodeprimidos, el ciclo de vida desde la oviposición, la formación de larva rabditoide y la de larva filariforme puede ser lo suficientemente breve para causar la autoinfección dentro del intestino antes de que las heces estén formadas, como se observa en esta fotografía.
- P. Microfotografía de un huevo amarillo castaño, teñido con bilis de *Capillaria philippinensis*. Estos huevos presentan forma de limón o alargados; miden alrededor de $60\text{ }\mu\text{m} \times 35\text{ }\mu\text{m}$, y se asemejan a los de *Trichuris trichiura*, salvo que la cáscara es estriada y las protuberancias polares son amplias y planas.



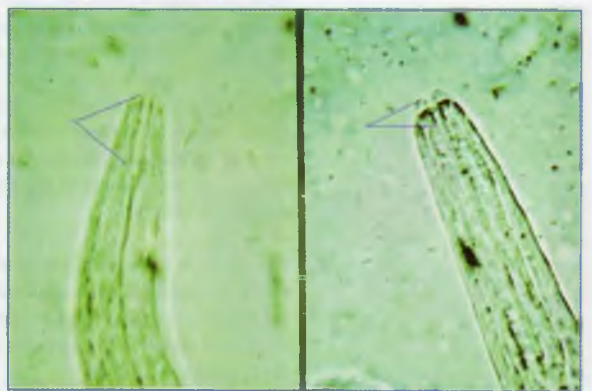
I



J



K



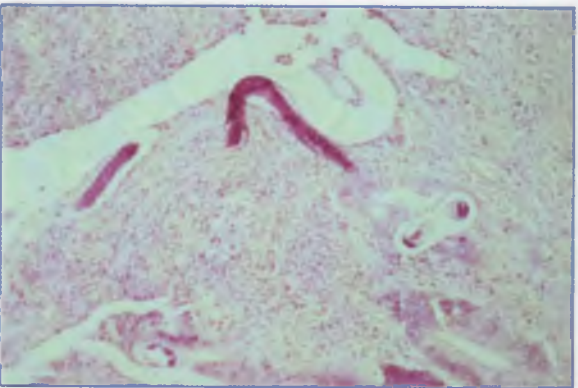
L



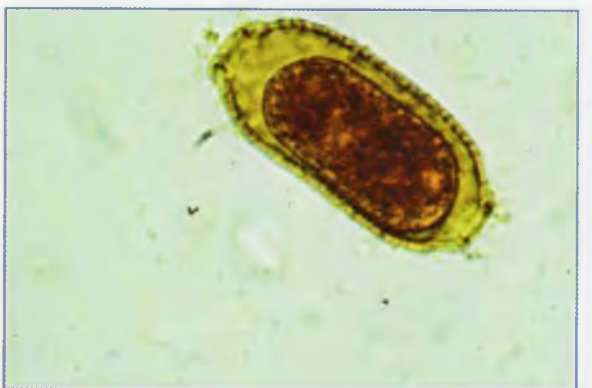
M



N



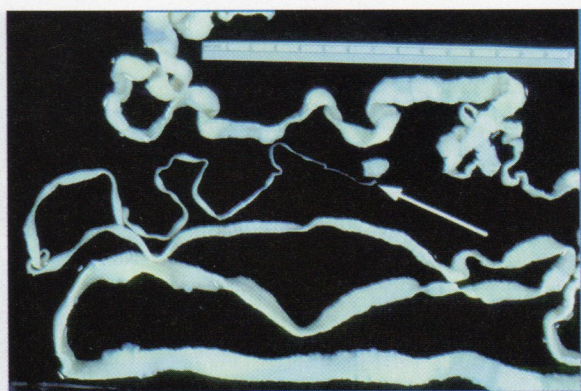
O



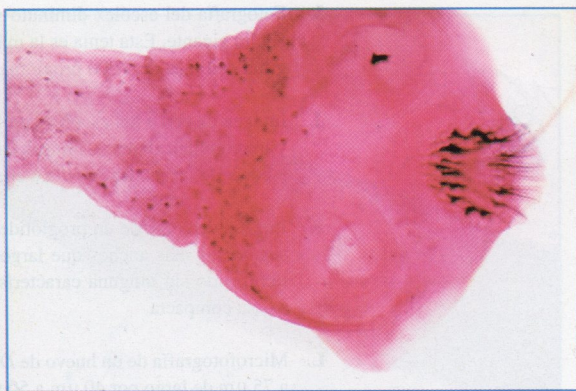
P

CESTODOS

- A. Ejemplar adulto de *Taenia saginata* que ilustra el escólex pequeño (*flecha blanca*) y el estróbilo que se extiende a varios metros de largo y está compuesto por una cadena larga de proglótides.
- B. Imagen de cerca del escólex de *Taenia solium* que muestra las cuatro ventosas características del género. El roseto armado protruye y presenta una corona de ganchos que permite la identificación de *Taenia solium*. El escólex de *Taenia saginata* no es armado.
- C. Imagen ampliada de un proglótide aislado de *Taenia saginata* al que se le ha inyectado tinta china a través del poro genital para marcar el contorno de las ramificaciones uterinas. Los proglótides de *T. saginata* tienen más de 13 ramas uterinas laterales, como se muestra en la fotografía, para diferenciarlos de los de *Taenia solium*, que de modo típico presentan menos de 13 ramas. Esta observación permite la identificación de especie sobre la base del examen de los proglótides que fueron eliminados intactos por las heces.
- D. Fotografías en dos recuadros de un trozo de carne de cerdo con cisticercosis (*izquierda*) que presenta varios espacios quísticos pequeños, cada uno habitado por una larva cisticerco de *Taenia solium*. En el recuadro de la derecha se observa el cisticerco con más detalle. Dentro del saco lleno de líquido está el escólex invaginado. Las ventosas y los ganchos están ocultos por el colorante.
- E. Corte de tejido teñido con hematoxilina y eosina que ilustra el espacio quístico ocupado por el cisticerco de *Taenia solium*. El quiste tiene dos paredes: la externa compuesta por tejido fibroso reactivo producido por el tejido del huésped y la segunda es una membrana delgada interna producida por el parásito (parásito vesicular). En esta fotografía se observa un corte transversal del escólex invaginado y no se identifican las estructuras internas.
- F. Fotografía de un cisticerco de la tenia de la rata *Hymenolepis diminuta*. En este campo se visualiza mejor el escólex invaginado. Estos cisticercos se forman en el insecto que es el huésped intermediario, como pulgas, cucarachas y escarabajos. Los seres humanos se infectan a través de la ingestión de alimentos contaminados con el insecto y los parásitos adultos se forman en el intestino después de la evaginación y adherencia del escólex a la mucosa.
- G. Fotografía del útero de una hembra grávida de una especie de *Taenia*, que ilustra la agregación densa de huevos esféricos de pared gruesa, algunos los cuales muestran las estriaciones características.
- H. Imagen de cerca de huevos de especies de *Taenia* como se podrían observar en la microscopia de preparaciones en fresco de material infectado. Estos huevos miden en promedio 30 μm a 45 μm de diámetro y presentan una pared lisa y gruesa, interrumpida por estriaciones radiadas características. Muchos huevos también encierran tres pares de ganchos (embrión hexacanto) no observados en esta fotografía, pero con un aspecto similar a los de la membrana interna del huevo de *Hymenolepis diminuta* de la lámina en color 22-6N. Estos huevos no son específicos de especie y también presentan un aspecto similar a los de las especies de *Echinococcus*.



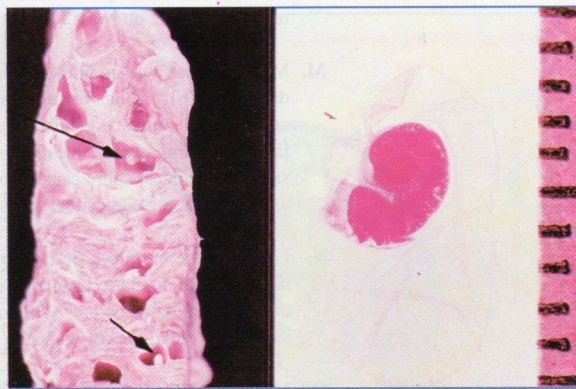
A



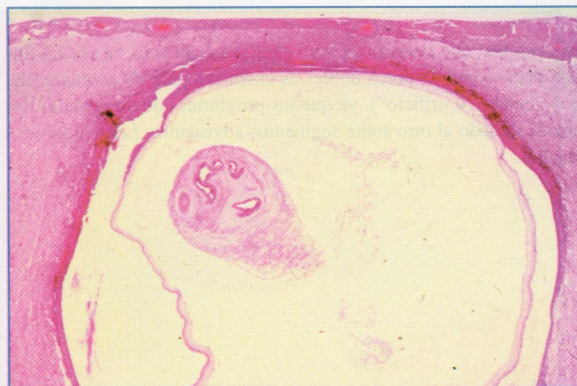
B



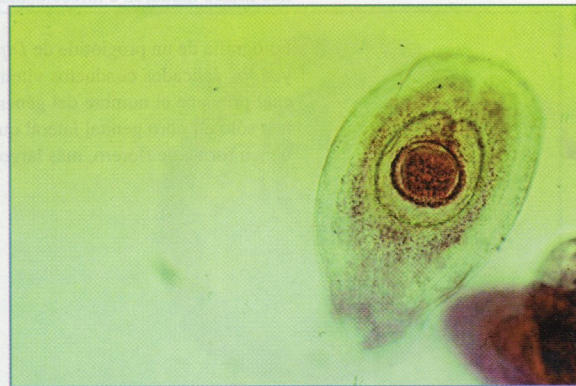
C



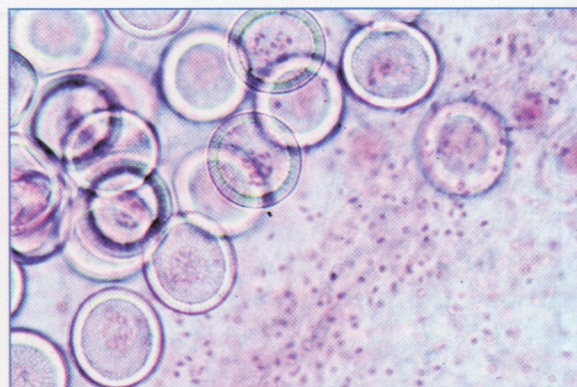
D



E



F

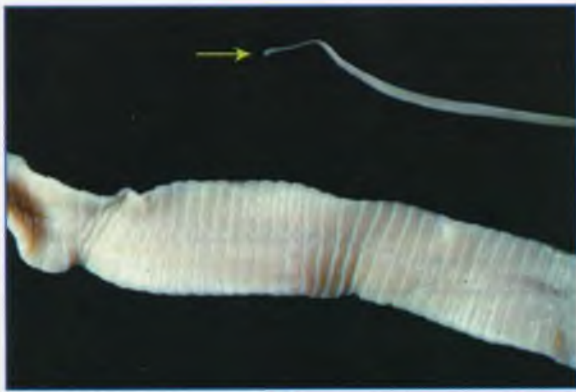


G

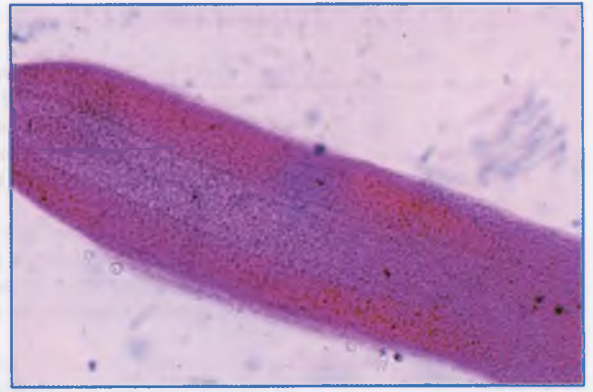


H

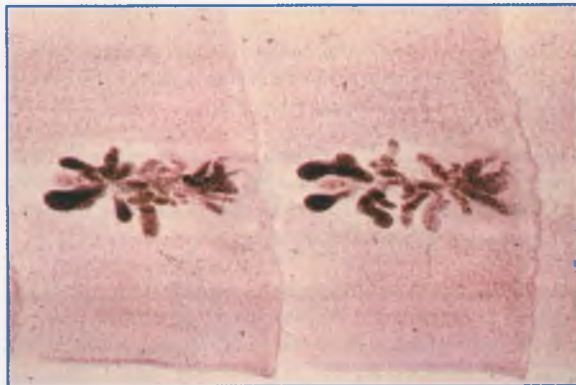
- I. Fotografía del escólex diminuto y los proglótides anchos y estrechos de *Diphylobothrium latum*, la tenia adulta gigante. Esta tenia es la más larga que infecta a los seres humanos y alcanza entre 3 m y 10 m de longitud con más de 3 000 proglótides.
- J. Imagen de cerca del escólex con forma de espátula de *D. latum*, que muestra el surco característico central y longitudinal (botrio), limitado a cada lado por un pliegue característico (*phyllo* = “hoja”), las estructuras a partir de las cuales proviene el nombre del género *Diphylobothrium*.
- K. Imagen de cerca de un proglótide de *Diphylobothrium*, que muestra las dimensiones características de los segmentos más anchos que largos de los cuales proviene el nombre del género “latum”. Nótese el útero ramificado sin ninguna característica definida ubicado en el centro y linealmente, que aparece como una roseta compacta.
- L. Microfotografía de un huevo de *Diphylobothrium latum*. Estos huevos son relativamente grandes, de 60 μm a 75 μm de largo por 40 μm a 50 μm de ancho. Son ovales y presentan una cáscara delgada y lisa, y la división se extiende hasta la membrana interna de la cáscara. La característica es la presencia de un opérculo oculto y no saliente que lo diferencia del huevo de *Paragonimus westermani*, con un opérculo saliente característico (lámina en color 22-7P).
- M. Microfotografía de un huevo de *Hymenolepis nana*, compuesto por una membrana doble: la cáscara delgada externa y lisa, y una membrana interna que encierra la oncosfera. Como se observa en la fotografía, suele contener tres pares de ganchos (hexacanto). Estos huevos miden de 40 μm a 60 μm de diámetro y presentan un contorno oval a subsférico. Los huevos de *H. nana* también se distinguen por la presencia de engrosamientos polares sobre cada lado de la membrana interna del hexacanto, a partir de los cuales salen cuatro a ocho filamentos delgados, que se extienden en el espacio intermembrana (véase la fotografía).
- N. Fotografía de un huevo de *Hymenolepis diminuta*. Estos huevos son más grandes que los de *Hymenolepis nana*, con un diámetro promedio de 60-80 μm y presentan un contorno esférico característico. La ausencia de engrosamientos polares y filamentos intermembrana también los diferencia de los de *H. nana*. Se observan con claridad los seis ganchos (*flecha*).
- O. Microfotografía de un conjunto de huevos de *D. caninum*, que demuestra el agregado de huevos esféricos sostenidos en una matriz. Los huevos mostrados aquí son inmaduros, ya que la presencia de ganchos internos indica madurez e infeciosidad.
- P. Fotografía de un proglótide de *Dipylidium caninum*, que muestra un poro genital a cada lado, en el cual fluyen los delicados conductos vitelinos. Esta disposición de poros dobles es exclusiva para *D. caninum* (del cual proviene el nombre del género, *pyle* = “entrada u orificio”), ya que los proglótides de otras tenias tienen sólo un poro genital lateral que alterna de un lado al otro sobre segmentos adyacentes. Los proglótides tienen forma de florero, más largos que anchos.



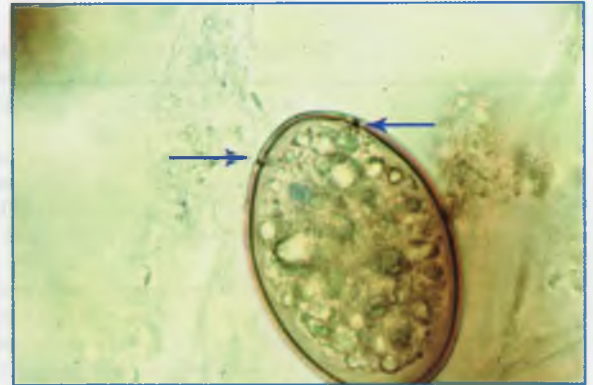
I



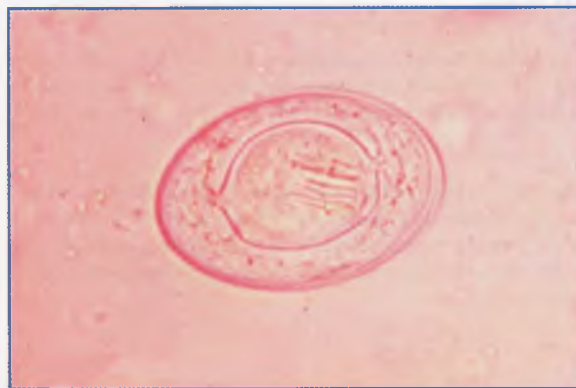
J



K



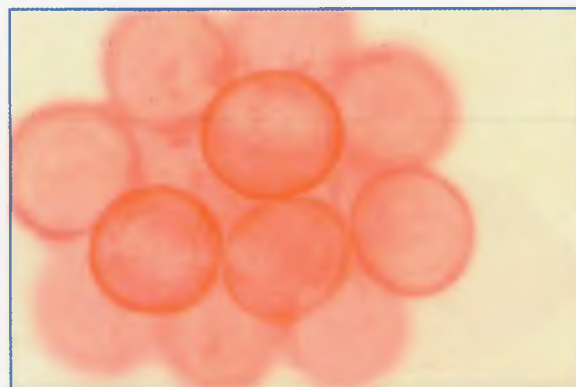
L



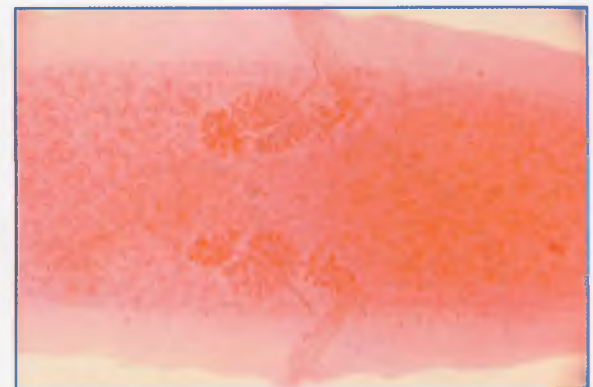
M



N



O



P

TREMATODOS

- A. Fotografía de parásitos adultos macho y hembra de *Schistosoma*. El macho en esta fotografía es más pálido y tiene un canal ginecóforo por el cual copula la hembra, más oscura, que se ha desprendido. Los machos adultos miden de 20 mm a 30 mm de longitud, y las hembras, de 17 mm a 14 mm. Estos trematodos presentan el diámetro de una hebra, lo que les permite ocupar la luz de las vénulas y causar el bloqueo del flujo sanguíneo que produce un edema mínimo.
- B. Microfotografía de un huevo de *Schistosoma mansoni*, con su pared lisa y delgada característica, y el contorno oval con una espícula lateral prominente. Estos huevos son relativamente grandes, de 115 μm a 180 μm de largo por 45 μm a 70 μm de ancho. Cuando llegan a la madurez, eclosiona la larva miracidio intacta, lo que evita el período de desarrollo en el ambiente externo.
- C. Microfotografía de un huevo de *Schistosoma haematobium*, que también tiene una cáscara delgada y lisa, y un contorno oval, pero se diferencia del huevo de *S. mansoni* porque tiene una espícula terminal en lugar de lateral. Estos huevos también son relativamente grandes, de 110 μm a 170 μm de largo y 40 μm a 70 μm de ancho.
- D. Aquí se ilustra un huevo de *Schistosoma japonicum*, que es más pequeño (80 a 100 μm de diámetro), más oval a esférico y tiene una división interna que se extiende hasta la cáscara interna. Aunque no se observa la espina, es característico el pequeño botón lateral (no presente en esta fotografía).
- E. Microfotografía de una cercaria con cola bifurcada, el estadio infectante en el ciclo de vida de *Schistosoma*. Estas cercarias que nadan libremente se liberan a partir de las redias, presentes en los caracoles infectados y tienen la capacidad, a través de la actividad enzimática, de penetrar directamente la piel de un ser humano desprevenido que puede vadear o nadar en estuarios de agua dulce infestados.
- G. Ejemplar de la duela adulta *Fasciola hepatica*. Estas duelas son hermafroditas y tienen órganos reproductores femeninos y masculinos. La porción anterior de *F. hepatica* se proyecta en un cono cefálico, justo por detrás del cual se encuentra la ventosa anterior. Inmediatamente por detrás de la ventosa y oscuro en esta fotografía, se observa el útero convoluto ramificado. Por detrás del útero se encuentra la ventosa ventral. La parte más gruesa de la porción posterior de la duela incluye los testículos, que aparecen como una malla rosada en la fotografía. Estos parásitos miden cerca de 3 cm $\times$ 1 cm (casi el tamaño de un portaobjetos). De *A Pictorial Presentation of Parasites*, de H. Zaiman.
- G. Ejemplar adulto del trematodo *Fasciolopsis buski*, la duela intestinal gigante, que también es hermafrodita y tiene estructuras similares a las descritas para *F. hepatica*. En contraposición, el extremo cefálico es redondeado y desprovisto de la protrusión cónica. Estas duelas miden alrededor de 2 cm a 7,5 cm de largo y 0,8 cm a 2 cm de ancho.
- H. Microfotografía de un huevo de *F. hepatica* (que no puede distinguirse del de *F. buski*), que muestra una pared delgada y lisa, y una división interna que se extiende a la membrana interna de la cáscara. Nótese la muesca sobre cada lado de la cáscara hacia el extremo estrecho, que representa el opérculo, una estructura similar a una tapa que se abre en el momento en que eclosiona la larva. Estos huevos son grandes, alrededor de 150 μm $\times$ 80 μm en su máxima dimensión.



A



B



C



D



E



F

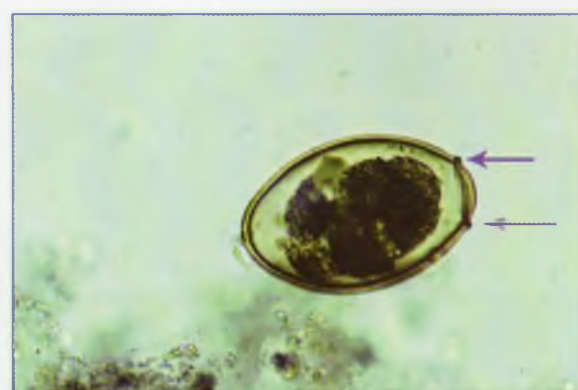
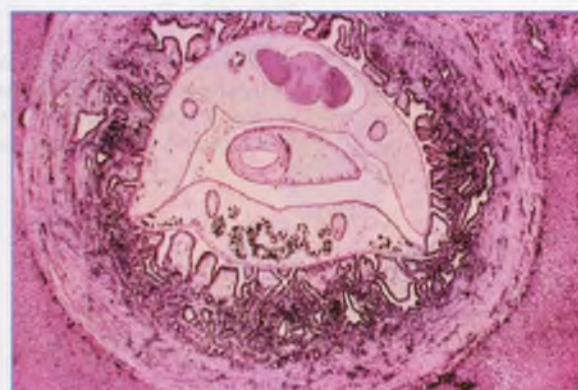
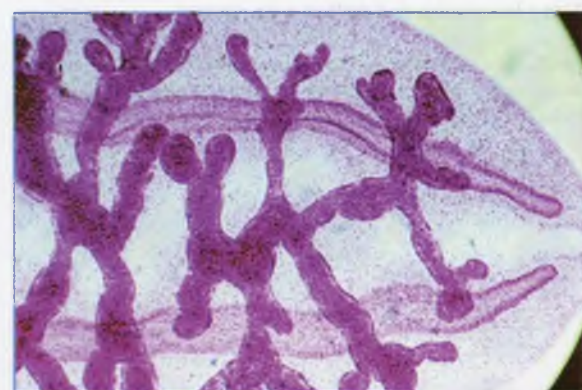
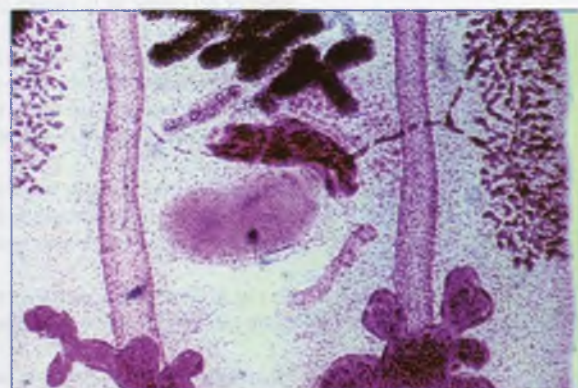
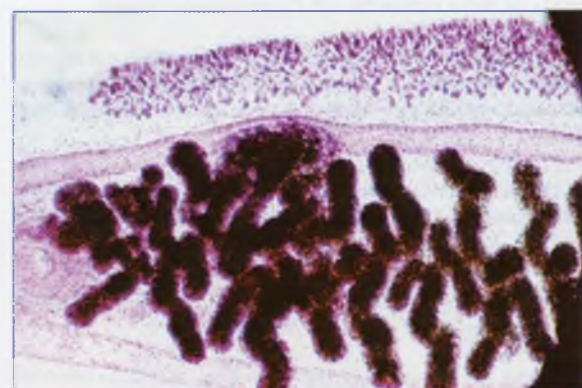


G



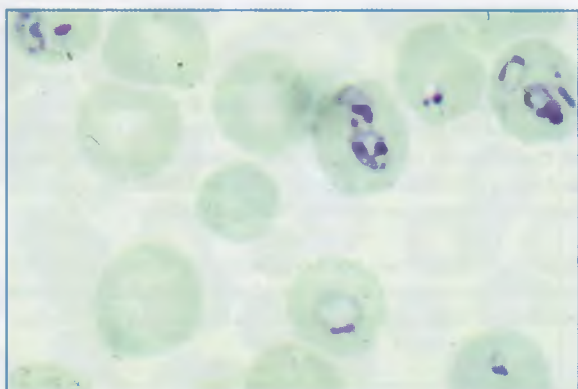
H

- I. Fotografía de un ejemplar adulto del trematodo *Clonorchis sinensis*, en el que se observa el extremo cefálico largo, con forma de botella y una ventosa terminal prominente, con el útero color castaño oscuro y los testículos ampliamente ramificados, rosa pálido en la parte posterior. Estas estructuras internas, que se mueven desde la boca hasta la cola, se ilustran con más detalle en la lámina en color 22-7J-M.
- J. En esta fotografía se ilustra la boca anterior o ventosa oral, que lleva a un tubo digestivo en fondo de saco denominado ciego, una rama del cual transcurre por los bordes laterales del parásito.
- K. Posterior a la ventosa oral se encuentra la ventosa ventral, ubicada exactamente enfrente del útero que presenta una tinción oscura, limitada a cada lado por las ramas del ciego. Las glándulas vitelinas con tinción pálida se observan en el borde superior del parásito entre el ciego y el tegumento externo. Estas glándulas producen la yema de los huevos formados en los ovarios.
- L. Este campo de la imagen es posterior al útero y muestra el ovario. Nótese el delicado conducto vitelino que ingresa en el ovario en el lado derecho.
- M. Este campo de la imagen es la parte posterior del parásito y destaca los testículos extensamente ramificados, a partir de los cuales proviene el nombre del género (*clon* = dividido; *orchis* = testículos). Nótese que el ciego termina como un conducto sin salida. La vejiga excretora es el espacio blanco y mal definido en el borde inmediato posterior.
- N. Corte teñido con hematoxilina y eosina a través del conducto biliar dilatado dentro del cual residen tres ejemplares adultos de *Clonorchis sinensis* que se observan en un corte transversal. Aunque hay un infiltrado inflamatorio crónico leve en la mucosa circundante, no se evidencia fibrosis extensa ni oclusión de la luz.
- O. Microfotografía de un huevo de *Clonorchis sinensis*, que ilustra una pared delgada y lisa. Lo característico es el opérculo prominente y saliente del extremo más ancho. Un pequeño botón posterior, no visible en esta fotografía, puede observarse en el extremo más estrecho, antiopercular del huevo. Estos huevos son relativamente pequeños; miden de 25 μm a 35 μm de largo por 14 μm a 17 μm de ancho.
- P. Microfotografía de un huevo de *Paragonimus westermani*. La cáscara es lisa, relativamente delgada e interrumpida en uno de los extremos por un opérculo prominente y saliente. Este huevo presenta un aspecto morfológico similar al de *Clonorchis sinensis*; sin embargo, estas fotografías comparativas son engañosas, ya que los huevos de *P. westermani* tienen un tamaño dos a tres veces mayor; miden de 65 μm a 120 μm de largo por 40 μm a 70 μm de ancho. Con este gran tamaño, los huevos de *P. westermani* parecen similares a los de *Diphylllobothrium latum*; sin embargo, este último puede distinguirse por su opérculo saliente plano en lugar de sobrelevado.

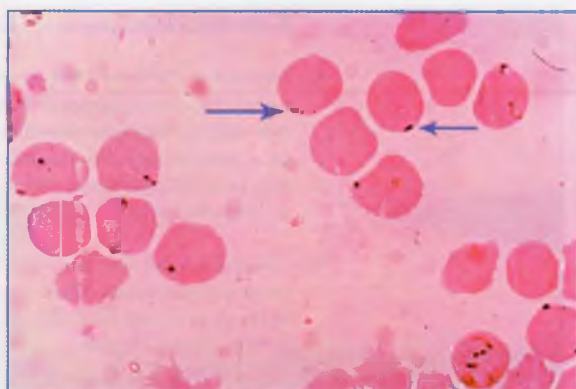


PLASMODIUM

- A. Microfotografía de un frotis de sangre periférica con tinción de Wright-Giemsa que ilustra varios eritrocitos infectados por formas anulares de especies de *Plasmodium*. Los eritrocitos infectados no presentan un tamaño mayor que las células que los rodean y no hay presencia de gránulos de Schüffner. El tamaño pequeño de los anillos sin el desarrollo en formas de trofozoítos y la infección intensa indica una infección por *Plasmodium falciparum*.
- B. Los eritrocitos infectados en esta microfotografía de un frotis de sangre periférica teñido también indica a *Plasmodium falciparum*, tanto por el intenso compromiso como por la ubicación de los diminutos anillos junto a las membranas celulares internas, conocido como aspecto en “anillo de sello”. De hecho, este frotis se obtuvo de un paciente con paludismo fulminante por la especie *P. falciparum*.
- C. El paludismo por *P. falciparum* puede identificarse de modo definitivo si en el frotis de sangre periférica se observa el gametocito grande en forma de plátano o de media luna, como se ilustra en la parte inferior de esta fotografía (flecha azul). También nótese el pequeño anillo del plasmodio en la célula cerca de la parte superior del campo de la imagen (flecha roja), de nuevo compatible con *Plasmodium falciparum*.
- D. El eritrocito infectado ilustrado en este frotis de sangre periférica teñido es más grande y pálido que las células circundantes y también tiene un citoplasma característico punteado por la presencia de gránulos de Schüffner. Nótese también que el trofozoito anular es relativamente grande. Estas características son diagnósticas de infección por *Plasmodium vivax*.
- E. *Plasmodium vivax* también puede sospecharse si en el frotis de sangre periférica teñido se observa el esquizonte multicelular como el que se ilustra por el eritrocito agrandado en el centro de esta microfotografía. De modo típico, estos esquizontes tienen más de 13 segmentos.
- F. En este frotis de sangre periférica teñido se observa un eritrocito agrandado y pálido que contiene un gametocito con un solo núcleo de *Plasmodium vivax*.
- G. Microfotografía de un frotis de sangre periférica con tinción de Wright-Giemsa que ilustra un eritrocito infectado por un trofozoito de *Plasmodium malariae*. Nótese que el citoplasma está condensado, no se desarrolla en una forma ameboides y adopta la forma de bandas que se extienden de un lado al otro de la membrana celular. El eritrocito no está agrandado y los gránulos de Schüffner están ausentes.
- H. *Plasmodium malariae* también puede sospecharse si se observa un esquizonte multinucleado con menos de 13 segmentos. De modo característico, los segmentos están dispuestos en un patrón de roseta circular como se observa en esta fotografía, a menudo rodeado por una masa densa de pigmento palúdico que está ausente en esta célula infectada particular.



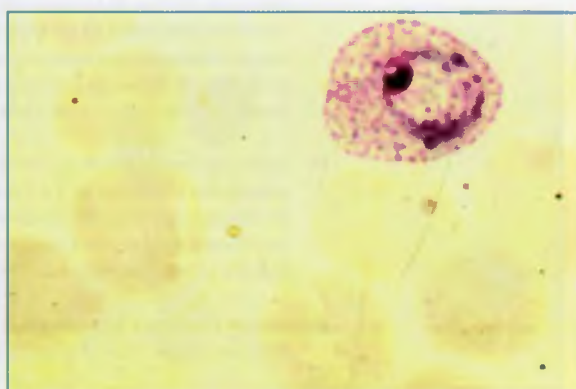
A



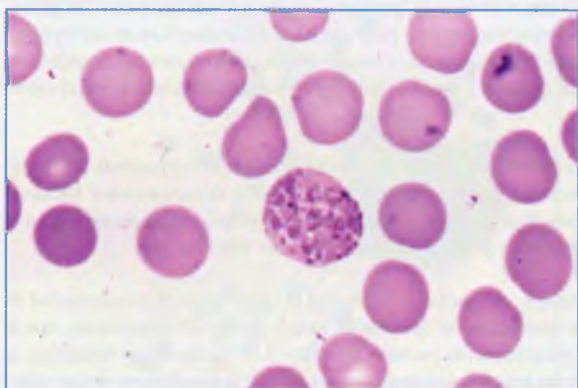
B



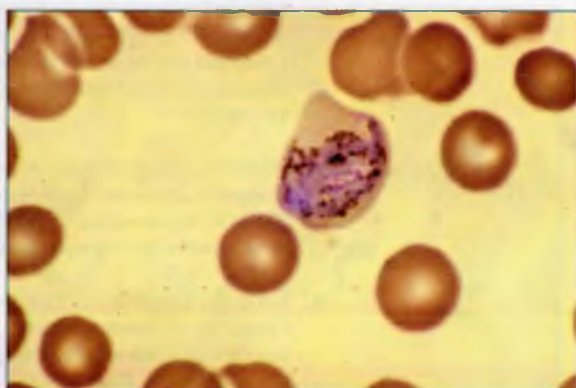
C



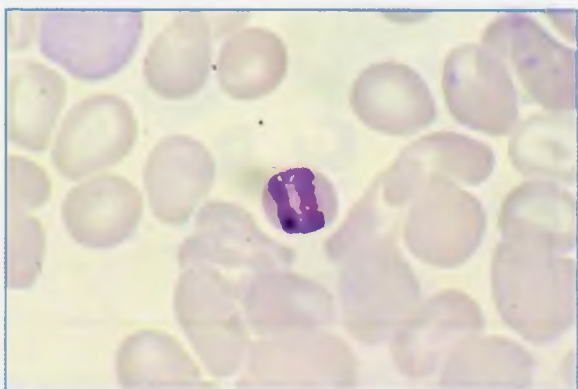
D



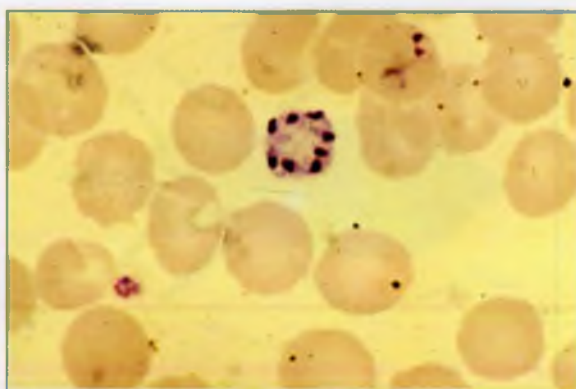
E



F



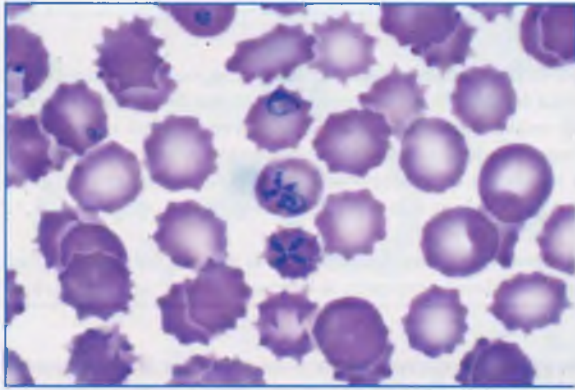
G



H

BABESIOSIS/LEISHMANIASIS/TRIPANOSOMIASIS

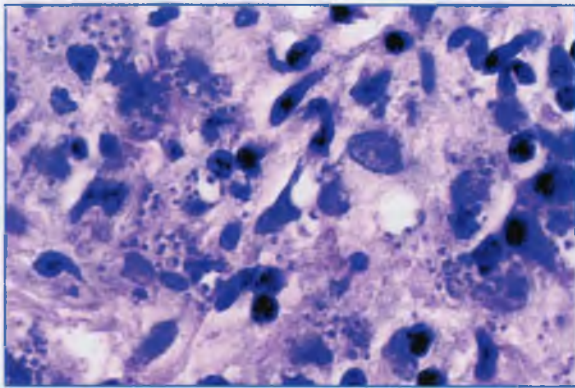
- A. Microfotografía de un frotis de sangre periférica con tinción de Wright-Giemsa que ilustra varios eritrocitos infectados por especies de *Babesia* con diminutas formas anulares pleomórficas. Pueden observarse formas anulares diminutas sugestivas de *Plasmodium falciparum*, como se observan en uno de los eritrocitos en la parte central inferior de esta imagen. Los eritrocitos infectados no están agrandados, no son pálidos y nunca acumulan pigmento palúdico. Cabe destacar la disposición de estas formas en dobletes que recuerdan las orejas de conejos; o más característico aún, en tétradas que recuerdan la cruz de Malta.
- B. Fotografía de los miembros inferiores de un paciente infectado por *Leishmania tropica*, una especie que causa la leishmaniasis cutánea, también conocida como úlceras de Chiclero. Las lesiones ulcerativas como se observan en esta fotografía son el resultado de la inflamación granulomatosa causada por los amastigotos que infiltran el tejido.
- C. Corte de tejido subcutáneo teñido con hematoxilina y eosina tomado del borde de una úlcera similar a la mostrada en la lámina en color 22-9B. Nótese las diminutas formas levaduriformes observadas en el citoplasma de muchos de los histiocitos y macrófagos que infiltran el tejido. Éstos representan los amastigotos, las formas infectantes de las leishmaniasis visceral y cutánea. Estas formas son difíciles de diferenciar de las formas levaduriformes intracitoplasmáticas de *Histoplasma capsulatum*, pero a menudo pueden diferenciarse en frotis de aspirados teñidos mediante la demostración de los cinetoplastos en forma de bastón, como se ilustra en la lámina en color 22-9D y E.
- D. Frotis por impronta con tinción de Wright-Giemsa que ilustra escasos macrófagos de fondo y numerosos amastigotos diminutos de 2 a 3 µm de especies de *Leishmania*. Como ya se mencionó, estas formas suelen ser difíciles de diferenciar de las formas levaduriformes de *Histoplasma capsulatum*. Sin embargo, la observación cuidadosa revelará que muchas de ellas tienen cinetoplastos en forma de bastón (flecha azul), característica de los amastigotos de *Leishmania*.
- E. Imagen con mayor aumento de un aspirado teñido que ilustra amastigotos de especies de *Leishmania*, identificados por los cinetoplastos característicos dentro de muchas de estas formas.
- F. Microfotografía de un frotis de sangre periférica con tinción de Wright en el que se observan varios tripanosomas extracelulares. Este frotis se obtuvo de un paciente con tripanosomiasis africana. Cada organismo individual es largo, delgado y mide de 15 µm a 30 µm de largo por 1,5 µm a 4 µm de ancho. La estructura más oscura observada en la parte posterior, similar a un punto, de cada tripanosoma es el cinetoplasto, a partir del cual se origina el flagelo. Cada flagelo sigue el contorno externo de una membrana ondulante que recorre toda la longitud del cuerpo del parásito y luego se extiende cierta distancia más desde el extremo anterior.
- G. Microfotografía de un frotis de sangre periférica con tinción de Wright obtenido de un paciente con tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas. Nótese la característica forma de "C" de los tripanosomas. Cada tripanosoma tiene una estructura similar a un punto, teñida de oscuro, en la parte posterior que corresponde al cinetoplasto, a partir del cual se origina un único flagelo.
- H. Fotografía de un triatoma (chinche reduvída o vinchuca), el vector para la transmisión de la enfermedad de Chagas. En el intestino posterior de este triatomídeo se desarrollan los tripanosomas metacíclicos, tras la ingestión de tripanosomas a través de la picadura de un paciente infectado. Los tripanosomas reingresan al tejido subcutáneo después de la picadura del segundo huésped humano, no por la picadura en sí sino cuando las deyecciones contaminadas de la vinchuca penetran en la herida dolorosa por el rascado.



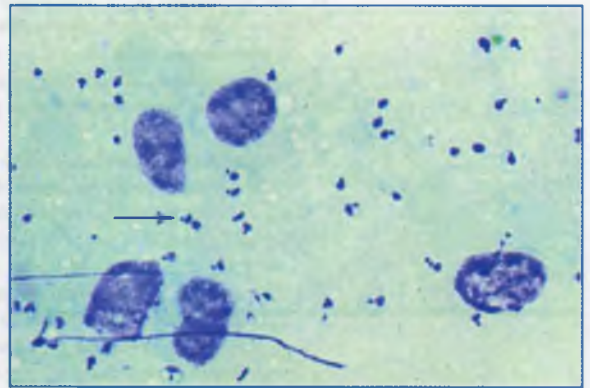
A



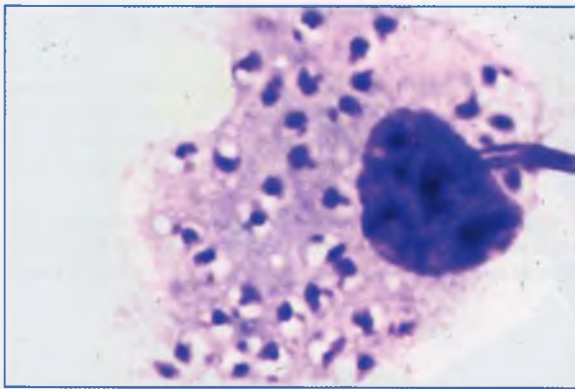
B



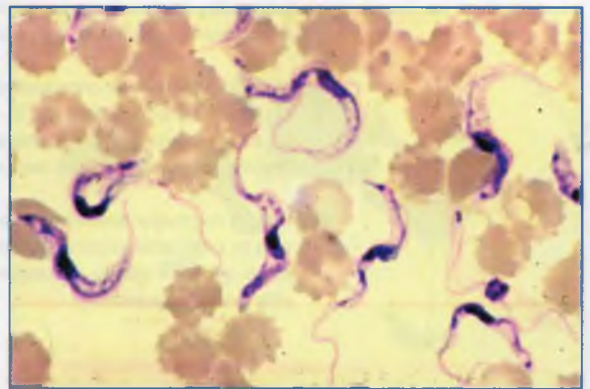
C



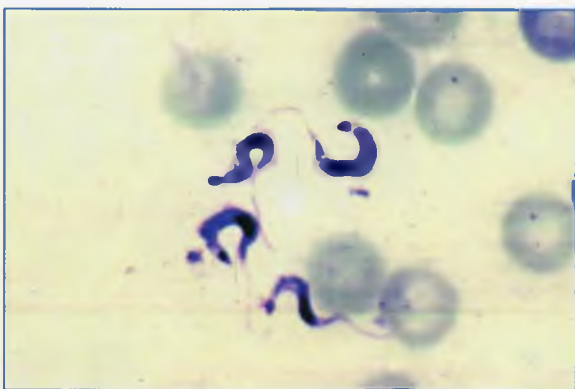
D



E



F



G



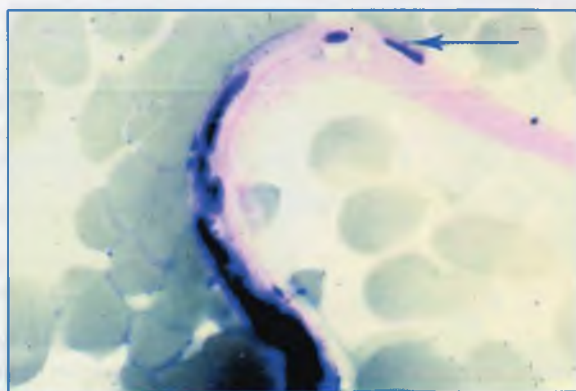
H

FILARIAS

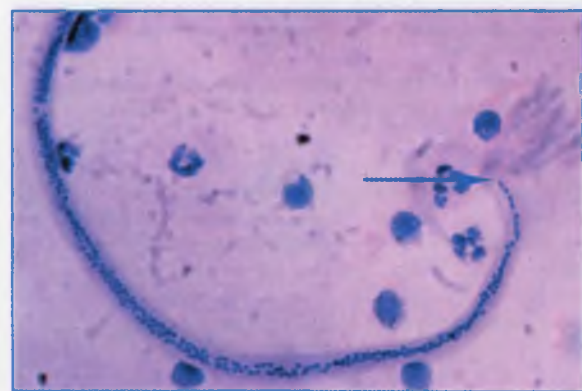
- A. Microfotografía de un frotis de sangre periférica que muestra una microfilaria con vaina. Las microfilarias son parásitos extracelulares que miden cerca de 245-295 μm de longitud y 7-10 μm de ancho. Se liberan a la circulación de las hembras grávidas que residen dentro de los vasos linfáticos en las partes infectadas del cuerpo. Las microfilarias liberadas por especies patógenas para los seres humanos tienen vaina, como se ilustra en esta fotografía (*flecha*). Como la columna de núcleos observada en el parásito de esta fotografía no parece extenderse hasta la punta de la cola, la especie más probable es *Wuchereria bancrofti*.
- B. Microfotografía de un frotis de sangre periférica que ilustra el corte de la cola de una microfilaria y destaca la disposición nuclear. Nótese que los dos núcleos se extienden al interior de la cola, un rasgo característico de *Brugia malayi*.
- C. Una columna de núcleos que se extienden a la cola de una microfilaria, como se observa en esta microfotografía, es característica de *Loa loa*.
- D. Microfotografía de un corte teñido con hematoxilina y eosina de un nódulo subcutáneo que muestra el corte transversal de la filaria hembra *Onchocerca volvulus*. Dentro de la cavidad de este organismo se observan numerosas microfilarias, que por último se liberan en el tejido circundante donde producen una reacción inflamatoria que termina en fibrosis. Las microfilarias de *O. volvulus* rara vez circulan en la sangre periférica, o lo hacen en cantidades tan pequeñas que casi nunca pueden detectarse en frotis teñidos.
- E. Fotografía de un corazón de perro infestado con gran cantidad de parásitos adultos *Dirofilaria immitis*. Los cánidos actúan como huéspedes definitivos de este nematodo tisular. En los seres humanos, que pueden actuar como huéspedes accidentales, las formas larvarias nunca alcanzan el corazón ya que los pulmones actúan como filtros, en los que producen granulomas inflamatorios multifocales.
- F. Microfotografía de un frotis por impronta con tinción de Giemsa en la que se observan numerosos taquizoítos con forma de arco, teñidos de azul de *Toxoplasma gondii*. Cada taquizoíto mide alrededor de 3-6 μm , presenta forma piriforme o de arco y tiene un núcleo y diversos orgánulos internos, como mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, observado sólo con el microscopio electrónico. Los taquizoítos son las formas infectantes del parásito, los cuales ingresan en la circulación y son transportados a varios órganos, en especial el sistema nervioso central donde causan lesiones inflamatorias microfocales. Los taquizoítos pueden atravesar la placenta de una mujer embarazada, ingresar en la circulación fetal y causar infecciones congénitas en los recién nacidos.
- G. Microfotografía de un corte histológico teñido con Giemsa de una biopsia de cerebro obtenida de un paciente con toxoplasmosis cerebral. Se observan tres quistes, que miden entre 15 μm y 30 μm de diámetro, dentro de los cuales hay gran cantidad de bradizoítos teñidos de azul. En los seres humanos con un sistema inmunitario competente, los taquizoítos se enquistan e inactivan como se muestra en la fotografía.
- H. Imagen con mayor aumento del quiste de toxoplasma repleto de bradizoítos. Si bien la enfermedad está determinada en esta forma quística, la supresión de la inmunidad en una persona infectada previamente puede determinar que estos quistes se rompan y liberen de nuevo taquizoítos activos que, ya libres, causan la reinfección por toxoplasmosis.



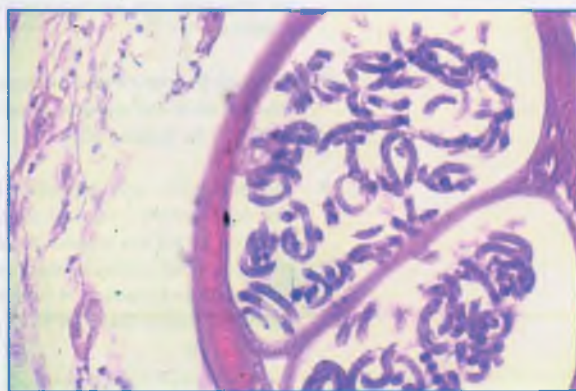
A



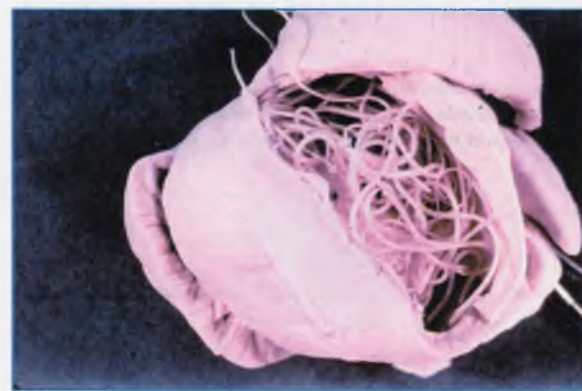
B



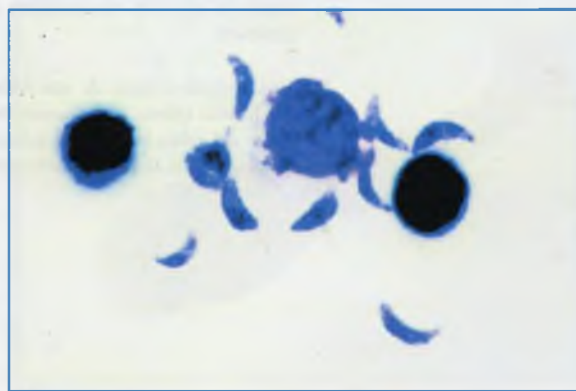
C



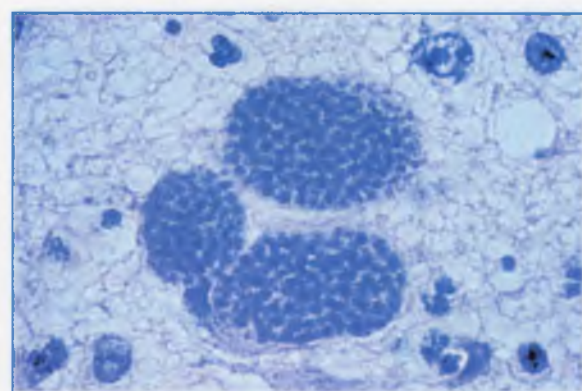
D



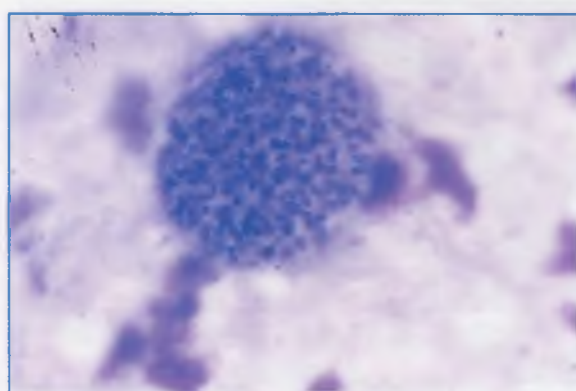
E



F



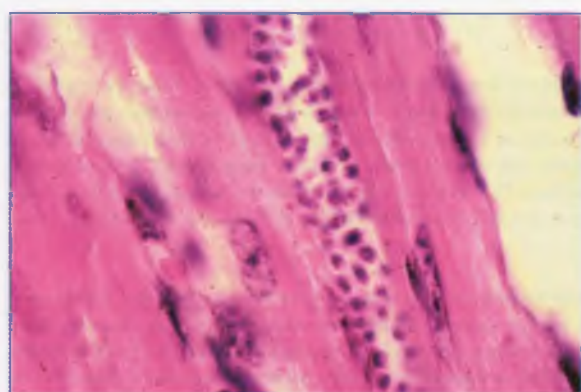
G



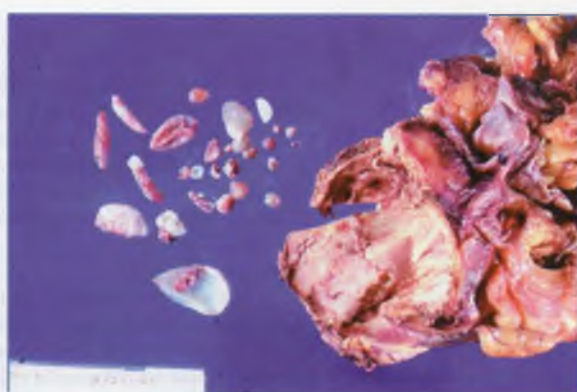
H

PARÁSITOS TISULARES

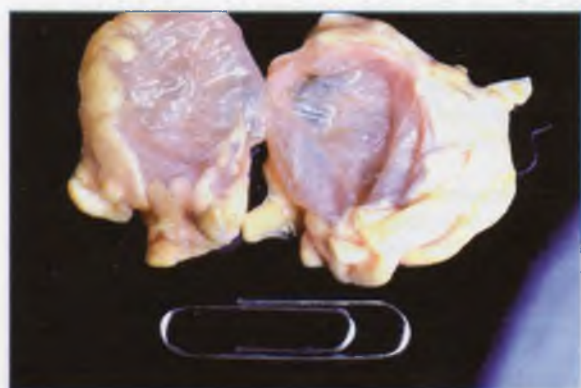
- A. Corte de músculo cardíaco teñido con hematoxilina y eosina, que incluye una fibra de mayor tamaño desde la parte superior a la inferior a lo largo del centro del campo de la imagen que está habitada por una colección densa de formas de amastigotos de *Trypanosoma cruzi*. La afectación cardíaca en pacientes con enfermedad de Chagas suele producir insuficiencia cardíaca y muerte.
- B. Fotografía de un quiste hepático que contiene múltiples quistes hidatídicos pequeños, de tamaño variable.
- C. Imagen de cerca de dos quistes hidatídicos extirpados del mesenterio de una persona con hidatidosis, que ilustra la membrana externa delgada y lisa de la superficie externa con agregados de grasa adheridos.
- D. Corte teñido con hematoxilina y eosina a través del quiste hidatídico. La pared del quiste está compuesta por una capa densa de tejido fibroso proveniente de la reacción del huésped. La membrana interna del parásito es la membrana germinativa, a partir de la cual se formaron tres embriones hijos (cápsulas prolíferas), cada uno con un escólex invertido. Cuando los embriones se liberan de la membrana germinativa, estos quistes hijos junto con los protoescólices liberados flotan en el líquido dentro del quiste y forman la arenilla hidatídica.
- E. Se observan protoescólices (fragmentos de la "arenilla hidatídica"), cada uno de los cuales contiene un rostelo invertido con una corona de ganchos prominente, que representa el germen del rostelo armado que sobresale del parásito adulto.
- F. Microfotografía de la tenia adulta *Echinococcus granulosus*. Estos parásitos adultos, que residen en el intestino de los perros y otros cánidos, son muy pequeños, miden no más de 6 mm de longitud, y están compuestos sólo por tres segmentos: un escólex armado, un cuello y un proglótide único, a partir del cual se libera una cantidad relativamente pequeña de huevos. Sin embargo, como hay varios cientos de estos parásitos en el intestino del perro y el tiempo de supervivencia de cada parásito puede alcanzar los 20 meses, el número total de huevos liberados en un período prolongado puede ser enorme, lo que da garantía de completar el ciclo de vida.
- G. Corte de músculo esquelético teñido con hematoxilina y eosina que muestra una larva enquistada y enrollada de *Trichinella spiralis*. La infiltración densa de células inflamatorias en el tejido circundante del quiste indica la infección relativamente reciente, asociada con más probabilidad con síntomas locales y tal vez generales.
- H. Una segunda imagen de una muestra de biopsia de músculo en la que se observa la larva enrollada de *Trichinella spiralis*. La ausencia de reacción inflamatoria y la menor cantidad de tejido fibroso denso alrededor del quiste indican una infección crónica. Con el tiempo este quiste inactivo se calcifica, lo que representa la última etapa de la infección.



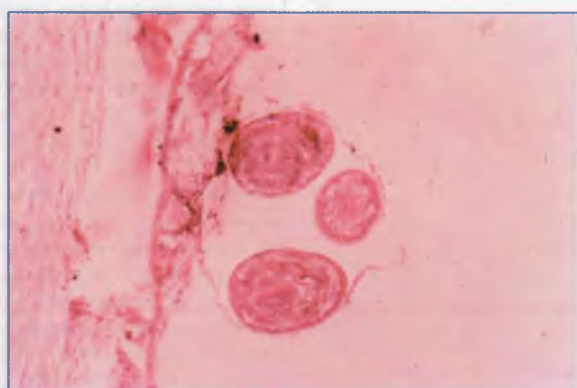
A



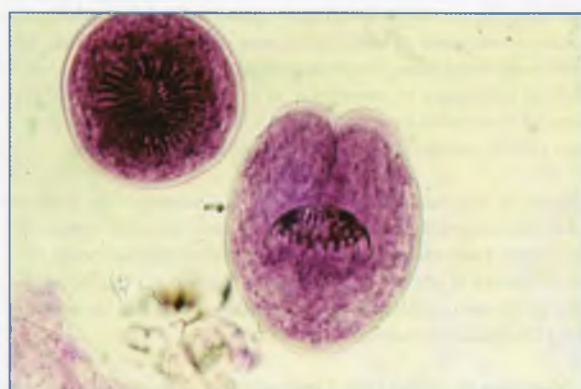
B



C



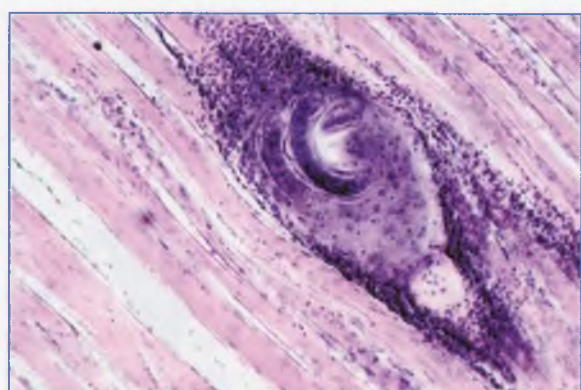
D



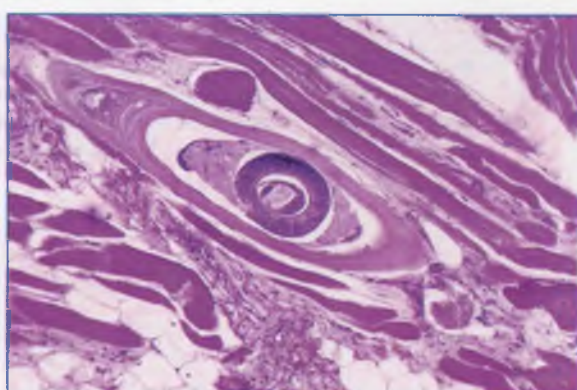
E



F



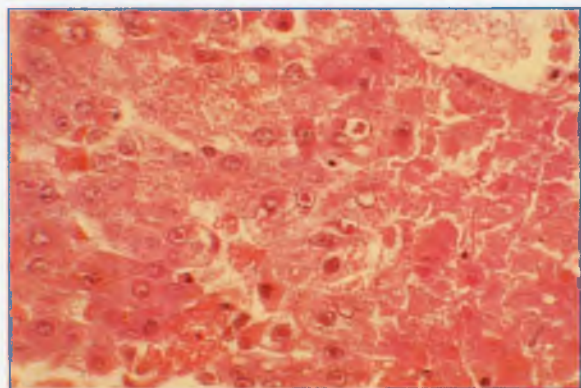
G



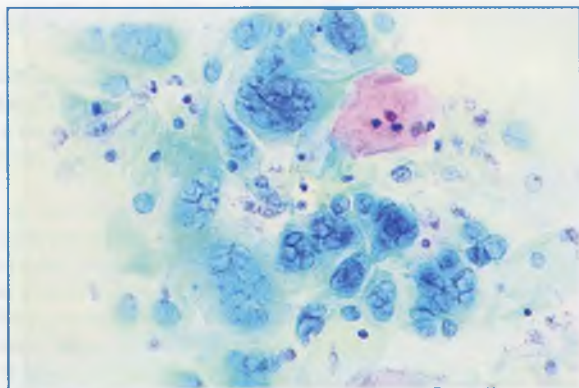
H

INCLUSIÓN VIRAL

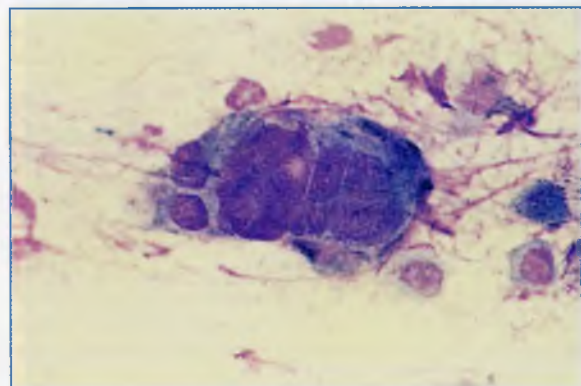
- A. Hepatitis por virus de la varicela-zóster. Los núcleos de varios hepatocitos contienen inclusiones típicas de los herpes virus. La masa de la inclusión es eosinófila y adquiere un color rojo, y la cromatina nuclear residual, que es basófila y está coloreada de azul, se agrupa alrededor del borde de la membrana nuclear. La inclusión se destaca debido a un halo nítido, que se debe a un artefacto de técnica, entre la inclusión y la cromatina nuclear desplazada hacia la periferia. Este artefacto está producido por la fijación con formol. Las inclusiones del virus del herpes simple y de la varicela-zóster no pueden diferenciarse. (Tinción con hematoxilina y eosina).
- B. Cervicitis por herpes simple. La tinción de Papanicolaou muestra numerosas células gigantes multinucleadas en el raspado de cuello uterino. Los núcleos aparecen moldeados contra los otros y se observan inclusiones. Éstas aparecen homogéneas y la cromatina nuclear está desplazada hacia la periferia sobre la membrana nuclear. La preparación citológica se fijó enseguida con etanol y no se observa el halo, como resultado del artefacto por la fijación con formol. La célula madura del epitelio pavimentoso se tiñe de rosa.
- C. Lesión vesicular por herpes simple; prueba de Tzanck. Estas células provienen del raspado de la base de una vesícula herpética. La célula multinucleada es característica de la infección por herpes, pero no se pueden diferenciar los efectos del virus del herpes simple de los de los virus de la varicela-zóster. Los múltiples núcleos están moldeados con los otros y son homogéneos, pero las inclusiones son difíciles de observar en los frotis secados al aire y con tinción de Giemsa o similar. Los raspados directos también pueden teñirse con el método de Papanicolaou o hematoxilina y eosina.
- D. Sialadenitis por citomegalovirus. Las células epiteliales de la glándula salival contienen las inclusiones de citomegalovirus. Las grandes inclusiones basófilas (azul o púrpura) ocupan gran parte del núcleo. En algunas células se observan halos claros entre la inclusión y la membrana nuclear debidos al artefacto causado por la fijación con formol. En algunas células también se observan inclusiones citoplasmáticas granulares. La arquitectura de la glándula salival está distorsionada por un intenso infiltrado linfocítico. El aumento de tamaño de las células infectadas y de los núcleos inspiró la denominación del virus. El nombre original fue virus de la glándula salival y la infección que producía se conoció como enfermedad por inclusión de la glándula salival, debido a la prominencia de la infección de este órgano en la enfermedad neonatal. (Tinción con hematoxilina y eosina).
- E. Neumonía por adenovirus. En este caso de infección por adenovirus hay una gran cantidad de exudado proteináceo (que es eosinófilo) en los espacios aéreos, pero se observan escasas células inflamatorias. Los núcleos de las células infectadas del epitelio respiratorio están completamente reemplazados por DNA viral, que produce una inclusión basófila densa. Las inclusiones se asemejan a las causadas por el virus del herpes simple. Las inclusiones maduras, como las observadas aquí, ocupan el núcleo y desdibujan el contorno de la membrana nuclear. Se conocen como *células manchadas*. (Tinción con hematoxilina y eosina).
- F. Neumonía por sarampión. En las vías aéreas de este paciente con neumonía por sarampión se observan varias células multinucleadas gigantes. Los núcleos múltiples contienen inclusiones nucleares eosinófilas que se asemejan a las del virus del herpes simple. La cromatina nuclear está desplazada hacia el borde de la membrana nuclear, pero en este corte no se observa el artefacto del halo claro causado por la fijación con formol. Además, en este caso hay también inclusiones citoplasmáticas eosinófilas, algunas de las cuales se fusionan o se rodean por un espacio claro. (Tinción con hematoxilina y eosina).
- G. Infección por virus sincitial respiratorio. Monocapa de células HEP-2 infectadas por el virus sincitial respiratorio. En la monocapa se han formado dos células sincitiales gigantes. No se observan inclusiones en los núcleos, pero pueden verse varias inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas brillantes. (Tinción con hematoxilina y eosina).
- H. Encefalitis por rabia. En dos neuronas se observan inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas conocidas como cuerpos de Negri. En la inclusión se evidencian algunas vacuolas. El aspecto irregular proviene de la combinación de estructuras citoplasmáticas normales con masas de ácido ribonucleico viral. (Tinción con hematoxilina y eosina). (Gentileza de Daniel Perl).



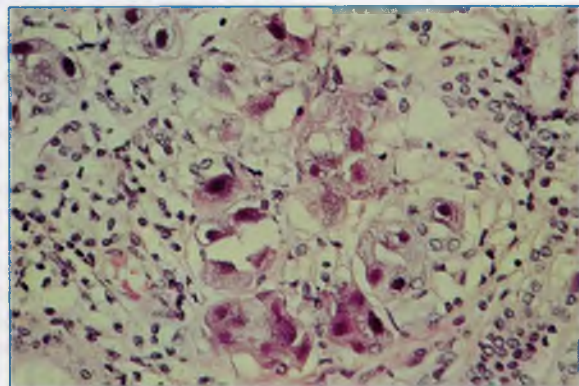
A



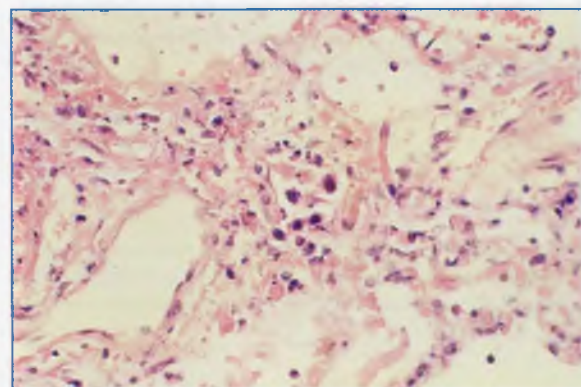
B



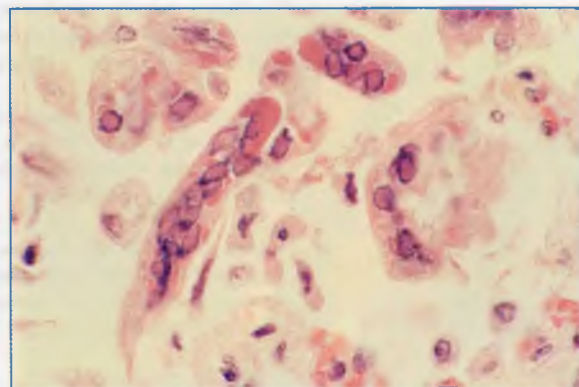
C



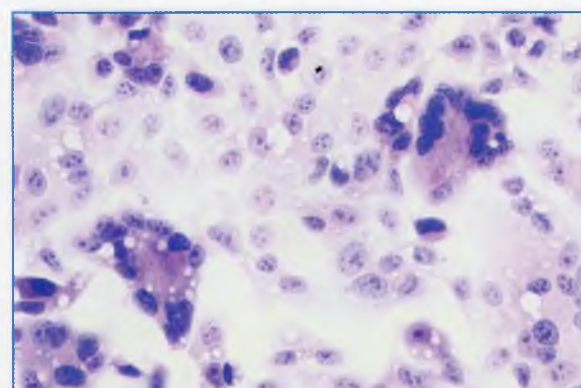
D



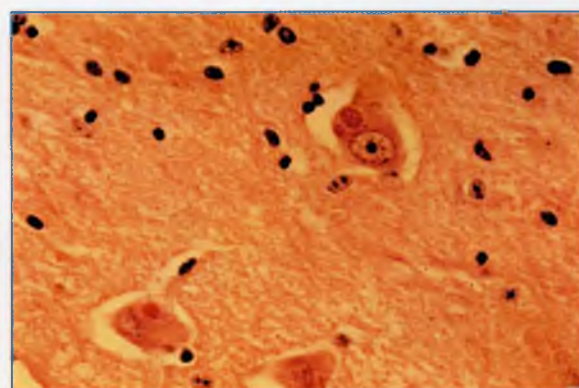
E



F



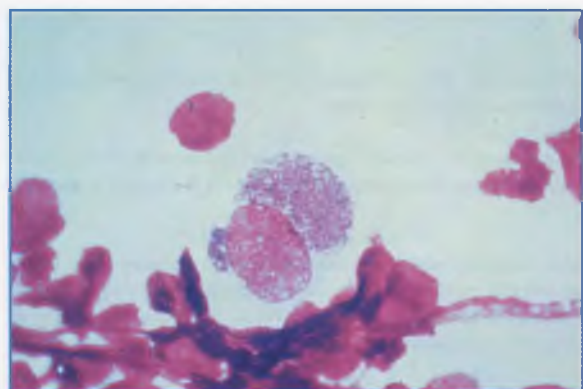
G



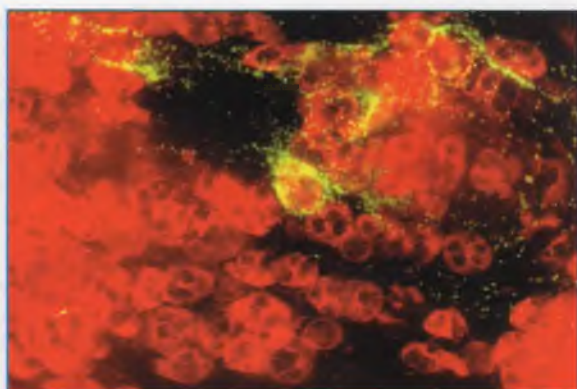
H

DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR VIRUS *CHLAMYDIA* Y *EHRlichia*

- A. Conjuntivitis de inclusión por *Chlamydia trachomatis*. Se observa una célula epitelial que contiene un cuerpo de inclusión clamidial. La célula sufrió un proceso de degeneración y dejó sólo el núcleo y la gran inclusión. Esta última está amoldada o recubre al núcleo subyacente. Frotis con tinción de Giemsa. (Fotografía reproducida con autorización de Julius Schachter y PSG Publishing Company, Inc., Littleton, MA).
- B. Cervicitis por *C. trachomatis*. En esta infección con abundante cantidad de microorganismos se observan innumerables cuerpos elementales. La tinción de contraste con azul de Evans determina que la célula presente fluorescencia roja y las inclusiones aparezcan amarillas en la microfotografía. En las zonas con menor cantidad de material de fondo o sin tinción de contraste, el anticuerpo marcado con fluoresceína determina que los cuerpos elementales presenten fluorescencia verde manzana. En el centro de la fotografía se observa una célula con infección intensa. Estos casos no plantean problemas diagnósticos, pero la detección de muestras positivas en las cuales sólo hay escasos cuerpos elementales es mucho más difícil.
- C. Monocapa de células de McCoy infectadas por *C. trachomatis*. La muestra se centrifugó sobre esta monocapa de células tratadas con cicloheximida, incubadas durante 48 horas. Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína contra una proteína mayor de la membrana externa (MOMP) de *C. trachomatis*. Múltiples inclusiones intracitoplasmáticas, que corresponden a la inclusión mostrada en la lámina en color 23-2A, se tiñen de verde brillante.
- D. Células HEP-2 infectadas por el virus del herpes simple tipo 1. Cuando se hizo evidente el efecto citopático, las células se separaron de la monocapa y se colocaron en un portaobjetos. Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína contra virus del herpes simple tipo 1. Se observa fluorescencia brillante específica, tanto nuclear como citoplasmática.
- E. Aspirado nasal infectado por virus sincitial respiratorio. Dos células en el frotis muestran fluorescencia citoplasmática verde brillante. Además de la fluorescencia difusa, la que se presenta como un punteado diferenciado representa inclusiones virales, característico de este virus y ayuda a confirmar la especificidad de la fluorescencia. (Anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína contra virus sincitial respiratorio).
- F. Fibroblastos diploides humanos infectados por citomegalovirus en cultivos por la técnica *shell vial*. Los fibroblastos alargados se colorean con la tinción de contraste. Las células infectadas se distinguen por la fluorescencia verde brillante de los núcleos ovales. (Anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína contra el antígeno temprano-intermedio del citomegalovirus).
- G. Ehrliquiosis monocítica humana causada por *Ehrlichia chaffeensis*. Una célula mononuclear circulante contiene una inclusión citoplasmática bien definida (mórula) formada por células bacterianas individuales. Las inclusiones rara vez se observan en casos de ehrliquiosis monolítica. (Tinción de Wright. Material proporcionado por J. Stephen Dumler).
- H. Ehrliquiosis granulocítica humana causada por una especie de *Ehrlichia* sin nombre particular. Se observa una inclusión azulada en el citoplasma de un neutrófilo circulante. No está clara la frecuencia con la cual se encuentran inclusiones en la ehrliquiosis granulocítica humana. (Tinción de Wright. Material proporcionado por J. Stephen Dumler).



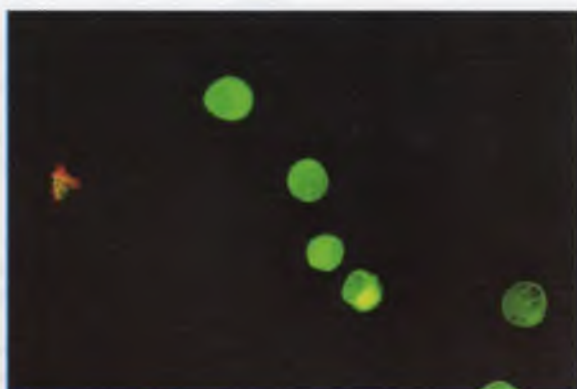
A A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells.



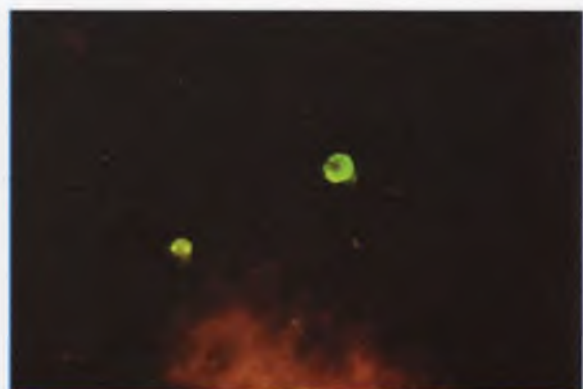
B A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells. The cell is stained with a red dye, and the granules are stained with a yellow dye.



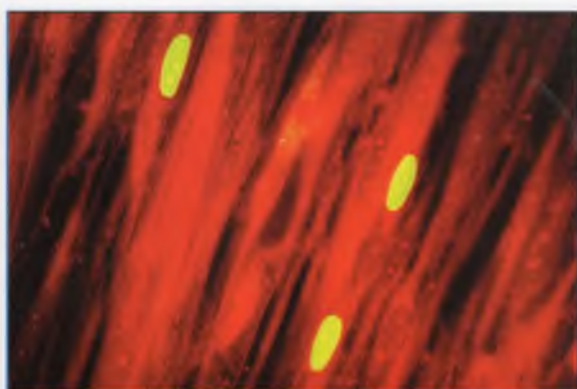
C A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells. The cell is stained with a red dye, and the granules are stained with a yellow dye.



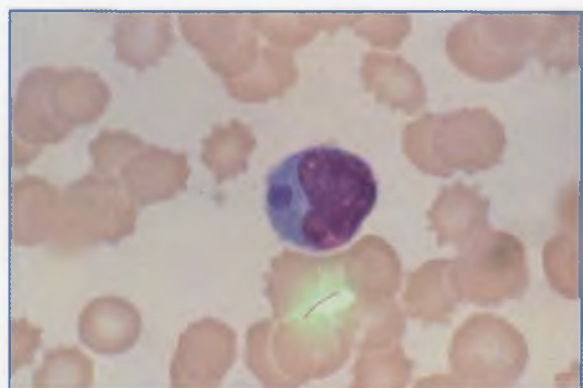
D A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells. The cell is stained with a red dye, and the granules are stained with a yellow dye.



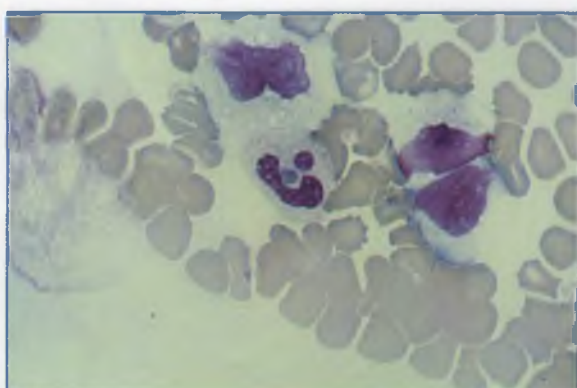
E A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells. The cell is stained with a red dye, and the granules are stained with a yellow dye.



F A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells. The cell is stained with a red dye, and the granules are stained with a yellow dye.



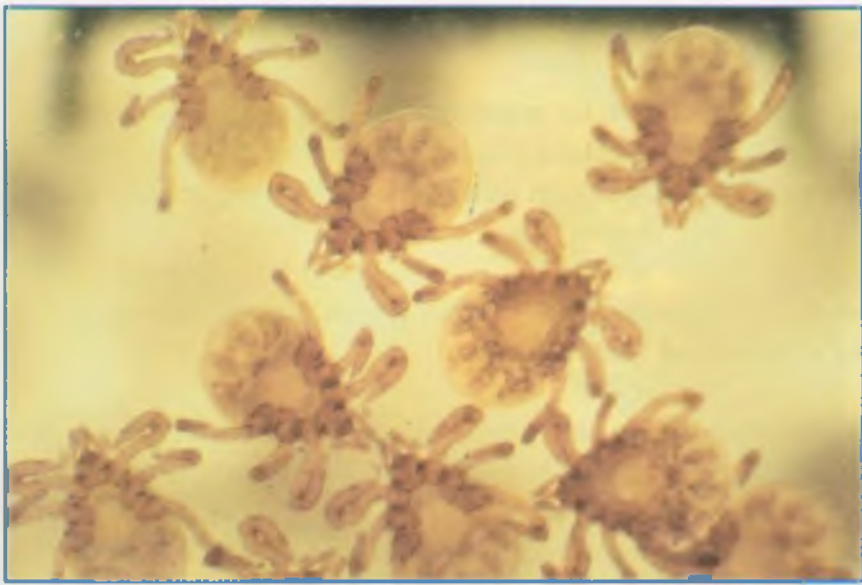
G A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells.



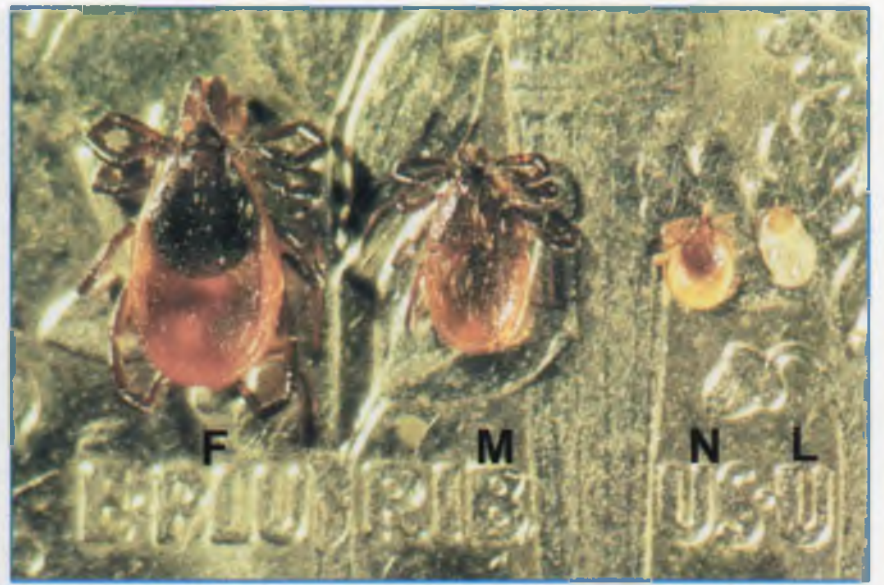
H A large, dark, circular cell with a granular interior, surrounded by smaller, pinkish cells.

IDENTIFICACIÓN DE GARRAPATAS

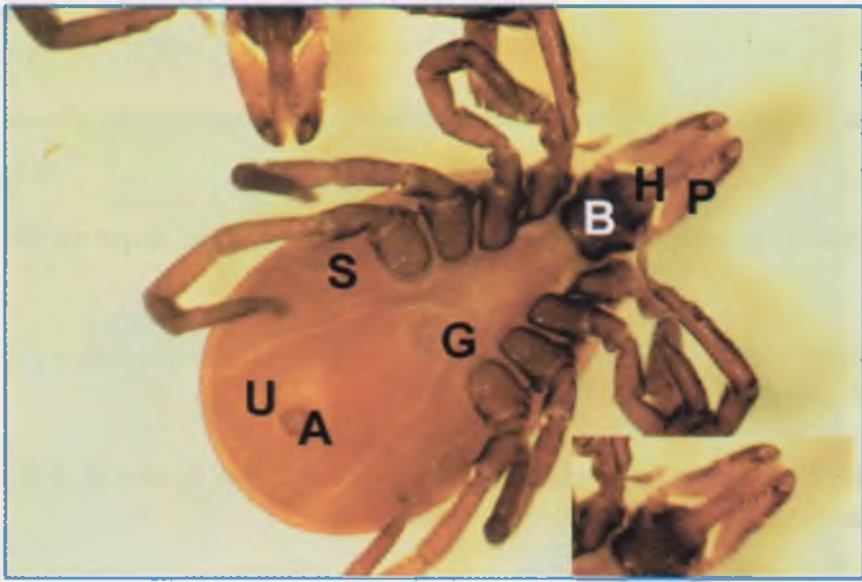
- A. Larvas de garrapatas, en este caso *Ixodes scapularis*, que se distinguen por la presencia de seis patas, tres de cada lado. Las ninfas y los adultos presentan un total de ocho patas.
- B. *Ixodes scapularis* en distintos estadios de su desarrollo ("instares") vistos sobre una moneda de diez centavos de dólar para la comparación del tamaño. De izquierda a derecha: hembra adulta (F), macho adulto (M), ninfa (N) y larva (L).
- C. Cara ventral de la hembra adulta de *Ixodes scapularis* que demuestra la relación del aparato bucal con la base del capitulum (B), palpos (P), hipostoma (H), poro genital (G), ano (A), surco anal (U) y placa de los espiráculos (S). Los agregados muestran detalles de los aparatos bucales. Nótese los denticulos similares a dientes que sobresalen desde los bordes laterales del hipostoma.
- D. Espolones coxales de un ejemplar adulto de *Ixodes scapularis*. El espolón coxal es largo, con extremo en punta y orientado hacia adentro. Los espolones en los coxales I a IV son cortos, romos y se orientan hacia afuera.
- E. Dorso de un ejemplar hembra de *Ixodes cookei*. El escudo (S) es angular. La longitud de los palpos (P) es casi igual que la base del capitulum (B). En este ejemplar el hipostoma (H) está roto.
- F. Dorso de un ejemplar hembra de *I. marxi*. El escudo (S) es angular y se asemeja al de *I. cookei* (compárese con lámina en color A-1F), pero el escudo de *I. marxi* es más largo que ancho cuando se lo compara con *I. cookei*.
- G. Hembras adultas de *Dermacentor variabilis*. El escudo muestra ornamentación (O). Los festones (F) están presentes en el margen posterior. Uno de los ejemplares está considerablemente ingurgitado (E), lo que produce un cambio de color del dorso del castaño al crema.
- H. Hembras adultas de *Dermacentor variabilis*. El escudo está intensamente ornamentado (O). La base del capitulum (B) es más ancha que alta. Nótese los "ojos" en ambos márgenes laterales (*flechas*).



A



B



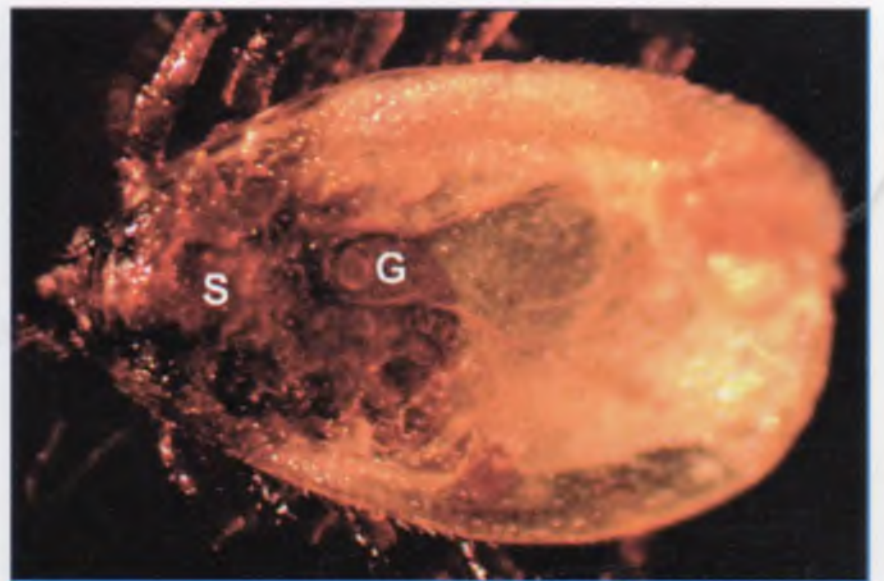
C



D



E



F



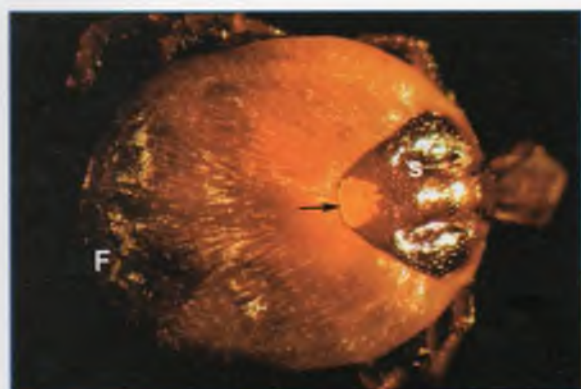
G



H

IDENTIFICACIÓN DE GARRAPATAS Y OTROS ARTRÓPODOS

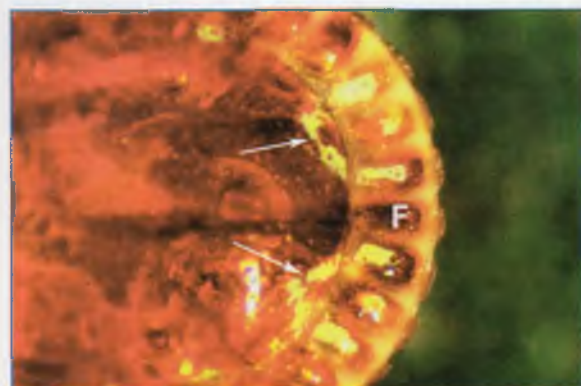
- A. Dorso de un ejemplar hembra de *Amblyomma americanum*. La ornamentación sobre el escudo (S) adquiere la forma de una placa en el borde posterior: la estrella solitaria (*flecha*). Se observan festones (F) alrededor del borde posterior de la garrapata. Presenta "ojos", pero son difíciles de ver en este ejemplar parcialmente ingurgitado.
- B. Dorso de un ejemplar macho de *Amblyomma americanum*. Un "ojo" muy prominente (*flecha*) en el borde lateral del escudo cubre todo el dorso. No se observa el aparato bucal.
- C. Dorso de un ejemplar macho de *Amblyomma americanum*. Los festones (F) prominentes se observan en el margen posterior. Las flechas indican dos marcas con forma de herradura a ambos lados de la línea media.
- D. Superficie ventral de un ejemplar macho de *Amblyomma americanum*. Se observa un espolón interno prominente en el coxal IV (*flechas*). En el recuadro (I) se muestra el detalle del espolón. El ano (A) está rodeado por una ranura de concavidad posterior (GR), en contraste con la ranura de concavidad anterior de las especies de *Ixodes*. El poro genital (G) es prominente. En este ejemplar faltan los aparatos bucales y la base del capitulum.
- E. Vista dorsal de especies de *Ornithodoros*. Esta garrapata blanda carece de escudo y los aparatos bucales no se observan desde arriba.
- F. *Sarcoptes scabiei* en su galería. El ácaro ha depositado huevos y defecado en su nuevo hábitat, lo que molesta a quien lo padece.
- G. *Loxosceles reclusa*, la araña parda. El color castaño y la marca característica en la cabeza distinguen a esta araña venenosa. (Fotografía cortesía de Robert Suter).
- H. Araña viuda negra. Se observan con claridad el color negro intenso y la marca roja en forma de reloj de arena característica en el abdomen. (Fotografía cortesía de Robert Suter).



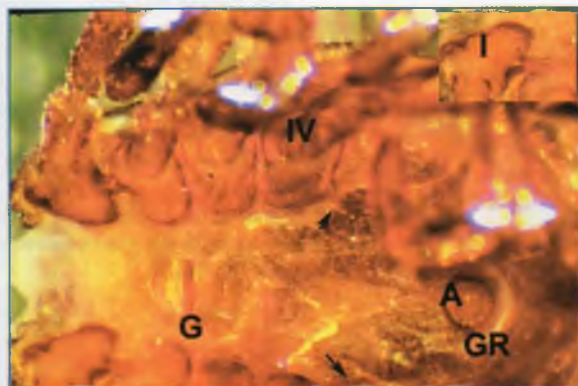
A



B



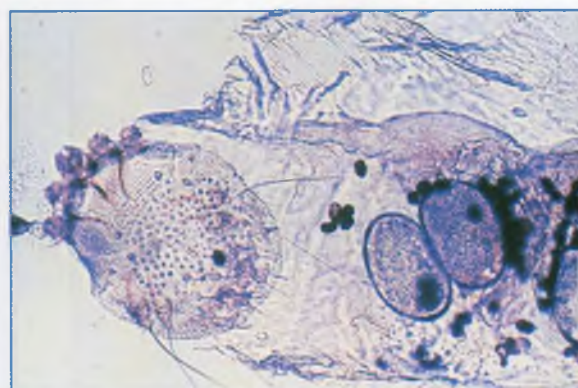
C



D



E



F



G



H

IDENTIFICACIÓN DE OTROS ARTRÓPODOS

- A. *Dermatobia hominis*. La larva de mosca humana se ha extraído de una lesión pustular. Se observan la forma de “frasco” bien definida, con un cuello largo que se adelgaza progresivamente y las espinas que la rodean. El cuello fue dañado en el momento de la extirpación quirúrgica.
- B. Vista ventral de especies de *Cimex*, la chinche de cama. El color naranja amarronado y la forma proporcionan las características útiles para la identificación.
- C. Vista dorsal de especie de *Triatoma*, una chinche reduvída (vinchuca). Su característica es el cuerpo alargado y la cabeza larga y delgada. Se observa un par de alas.
- D. *Tunga penetrans*, la pulga “jigger”. La mayoría pica a su huésped rápidamente y lo abandona para completar su ciclo de vida, pero esta pulga permanece incrustada en la piel donde se desarrollan sus huevos.
- E. Ejemplar hembra de especies de *Ctenocephalides*, la pulga del perro o del gato. Las patas largas y musculosas cuelgan del cuerpo y convierten a la pulga en un extraordinario saltarín. Se observa el aspecto “encorvado” del cuerpo.
- F. Ejemplar hembra de *Pediculus humanus*, el piojo del cuerpo humano. El cuerpo largo y delgado se apoya en tres pares de patas, cada una de las cuales presenta ganchos similares a tenazas en la punta.
- G. Liendre del piojo de la cabeza. El huevo se adhiere con firmeza al tallo del pelo.
- H. Ejemplar hembra de *Phthirus pubis*, el piojo cangrejo o pubiano. El cuerpo corto y redondeado y las tenazas sobre los tres pares de patas justifican el nombre popular. El piojo cuelga sobre el tallo piloso, que sostiene una liendre.



A



B



C



D



E



F



G



H

Índice analítico

A

Abbott LCx, ensayo para *M. tuberculosis*, identificación de micobacterias, 1060

Abceso(s), 7, 94

- diagnóstico, 92
- encefálico, 91
- presentación clínica, 94
- pulmonar, 75

Abiotrofia, especies, 671

- identificación, 693, 698c

Absidia, especies, identificación, 1119, 1120f

Abuso sexual en niños, infecciones por *C. trachomatis* y, 1348

Ácaros, identificación, 1365, 1366f

Achromobacter, especies, 324, 325c, 326c

- asacarolíticos, 324, 325c
- grupos B, E y F, 292c
- sacarolíticos, 324, 326c

Ácido 2-ceto-3-desoxioctonoico (CDO), 181

Ácido desoxirribonucleico (DNA), Véase también DNA

- bases de nucleótidos, 130, 132f
- definición, 130
- estructura, 129, 131f
- función, 131, 131f
- monofosfatos de nucleótidos, 130, 131f
- ramificado, 135
- replicación, 132, 132f
- - bacterias y, 172

Ácido dipicolínico, 184

Ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), tripsina y, diagnóstico de infección viral, 1320

Ácido hialurónico liasa, 198, 650

Ácido L-acetilmurámico, 178, 178f

Ácido lipoteicoico, 650

- factor de virulencia en especies de *Enterococcus*, 667

- *S. pneumoniae*, 656

Ácido meso-diaminopimélico, 750

Ácido micólico, 182

Ácido ribonucleico (RNA)

- bases de nucleótidos, 130, 132f
- estructura, 130
- función, 131, 131f

Ácido teicoico

- de *S. aureus*, 600r
- de *S. pneumoniae*, 656

Ácidos grasos

- celulares, especies de *Legionella*, 533c, 534c
- del glicerol en presencia de eritromicina, diferenciación de micrococos y estafilococos, 613
- volátiles, identificación, determinación de productos metabólicos de anaerobios, 864, 867f, 867r

Ácidos micólicos, 182

Ácidos no volátiles, en determinación de productos metabólicos de anaerobios, 866, 869r

Ácidos nucleicos, 129, 130f

- *C. trachomatis*, detección, 1348
- categorías, 130
- especies de *Legionella*, examen, 531, 531r, 533c, 534c
- especies de *Rickettsia*, detección, 1351

- infecciones del SNC, detección, 92

Acinetobacter, especies, 341, 344c, 345, 541

- *A. baumannii*

- - identificación, 340

Acremonium, especies, grupos de conidios producidos, 1132, 1133f

Acrópeta, 1107r

Acroteca, 1163, 1163f

Actinobacillus, especies, 429

- *A. actinomycetemcomitans*, 429, 431r

- - características de cultivo, 432, 433c

- - factores de virulencia, 431r

- - importancia clínica, 430, 431r

- - sensibilidad a los antibióticos, 432

- *A. hominis*, 434

- *A. ureae*, 434

- descritas, 429

- especies animales, 434, 435c

- identificación, características bioquímicas, 435c

Actinobacterias, 170r

Actinobaculum, especies, 771, 772r

- identificación, algoritmo, 778f

Actinomadurea, especies, 822, 823c

- anatomía patológica, 822, 822c

- enfermedad clínica, 822, 822c

- epidemiología, 822

Actinomicetos, 823, 824r

- aerobios, 817

- - agrupamiento fenotípico, 818, 818c

- - clasificación, 817, 818c, 819f

- - composición de la pared celular, 818, 820c

- - especies de *Nocardia*, diagnóstico de laboratorio, perfiles de sensibilidad a antibióticos in vitro, 831c

- - infecciones, diagnóstico de laboratorio, 825, 826c, 829c, 829r, 830f, Protocolo 15, Lámina en color 1

- - - aislamiento primario, 825

- - - pruebas bioquímicas y fisiológicas, 825, 826c

- - introducción, 817

- - taxonomía, 817, 819r

- - terminología relacionada, 818, 819r

- anatomía patológica, 820

- epidemiología, 820

- patogenia, 820

- termofílicos, 823

- - identificación, 833

Actinomicosis

- abdominal, 773

- cervicofacial, 773

- pélvica, 773

- del sistema nervioso central, 773

- torácica, 773

Actinomyces, especies

- *A. bovis*, 775r

- *A. cardiffensis*, 775r

- *A. europaeus*, 775r

- *A. funkei*, 775r

- *A. georgiae*, 775r

- *A. gerencseriae*, 775r

- *A. graevenitzi*, 775r

- *A. hongkongensis*, 776r

- *A. houstonensis*, 776r

- *A. israelii*, 775r

- *A. meyeri*, 776r

- *A. naeslundii*, 776r

- *A. nasicola*, 776r

- *A. neuui*, subespecie *Neuui*, 776r

- *A. odontolyticus*, 777r

- *A. oricola*, 777r

- *A. radidentis*, 777r

- *A. radingae*, 777r

- *A. turicensis*, 777r

- *A. urogenitalis*, 777r

- *A. viscosus*, 777r

- aisladas en animales, 778, 780c

- aisladas en seres humanos, 772, 775r, 778f, 780c

- identificación, 885

- - algoritmo, 778f

- miembros, 775r

- taxonomía, 746, 748c

Adenosintrifosfato (ATP), 192

Adenoviridae, especies, descritas, 1285c

Adenovirus

- entéricos, manifestaciones clínicas, 1293c, 1294

- manifestaciones clínicas, 1303, 1305c

- tipo 5, 1285c, 1285f

Adhesina(s), 186

- como factor de virulencia, 197

Aerobio(s)

- descritos, 837

- estrictos, 189

Aerococcus, especies, 671

- identificación, 693, 697, 701c

Aeromonas, especies, 394, 394c, 398, 398c, 398r, 400c

- características, 395r

- cultivo, agares, 398, 399r

- identificación de laboratorio, 399, 400c

- importancia clínica, 397

- preparados medicinales, 398

- recuperación de laboratorio de muestras clínicas, 398, 399r

- taxonomía, 397, 397r

Afiptia, especies, 487

- aislamiento, 487, 488c

- identificación, 487, 488c

- - características bioquímicas, 488c

- importancia clínica, 487, 488c

- sensibilidad a los antibióticos, 487

- taxonomía, 487

Agar(es)

- aislamiento de *Haemophilus*, en diagnóstico de infección por especies de *Haemophilus*, 423

- chocolate, en especies de *Haemophilus*, diagnóstico de infección, 422

- cromogénicos, en identificación de enterobacterias, 271

- dextrosa de Sabouraud, usos, 1110c

- diferencial(es), 28c, 29, 29f

- entérico de Hektoen, para enterobacterias, 213c

Agar(es) (Cont.)

- eosina azul de metileno (EMB), aislamiento de enterobacterias, 212c, Lámina en color 6
- especies de *Aeromonas*, cultivo, 398, 399r
- harina de maíz, identificación de levaduras, 1165, 1168f, 1168r, 1169f
- HE, Véase *Agar entérico de Hektoen (HE)*
- hierro de Kliger, detección de fermentación de hidratos de carbono, 209f, 210, 210r
- infusión de cerebro y corazón, usos, 1110c
- infusión de corazón de Sabouraud, usos, 1110c
- inhibidor de hongos filamentosos, usos, 1110c
- inhibidores, 28c, 29, 29f
- láminas de patata, usos, 1110c
- de MacConkey
 - crecimiento, 1440
 - identificación de micobacterias, 1042, Protocolo 19
 - falta de crecimiento, 297
 - recuperación de enterobacterias, 212c
- micosel/micobiótico, usos, 1110c
- NBG, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- NBGL, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- de Rambach, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- reacciones, identificación de bacterias, 35r
- SABHI, usos, 1110c
- sales de manitol, 616
- para *Salmonella-Shigella*, recuperación de enterobacterias, 213c
- sangre de Skirrow, aislamiento de *C. jejuni*, 376c
- sangre, cistina-telurito, 1418
- SM-ID, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- de Tinsdales, 1417
- TSI, detección de fermentación de hidratos de carbono, 209
- urea de Christensen, 218
- XLD, recuperación de enterobacterias, 213c
- Agencias federales, laboratorio y práctica médica, 45, 45r
- Agentes biológicos
 - clasificación, 50, 51c
 - potencial de terrorismo, 58, 59c
 - precauciones de seguridad, 50, 51c, 52c, 53f
- Agentes infecciosos
 - celulares, innatos, 7
 - clases, 3
 - defensas celulares inmunológicas adaptativas, 8
 - defensas celulares innatas, 7
 - defensas humerales innatas, 6
 - defensas no celulares inmunológicas adaptativas, 8
 - efectos indirectos en seres humanos, 9
 - enfermedades infecciosas debidas, 2, 3c
 - huéspedes, interacciones, 4, 4c
 - inflamación y, 7
 - medioambiente y, 5, 6c, 6r
 - objetivo en la naturaleza, 4
 - puertas de entrada, 6, 6c
 - recién identificados, 3c
 - vías de transmisión, 6, 6c
 - virulencia y, 4, 5c, 6c, 6r
- Aglutinación del látex, identificación de estreptococos, 685
- Aglutinina(s) fría(s), 1003
- Agresiva, factores de virulencia, 198
- Agrobacterium*, especies, 326c, 328
- Agujas, precauciones de seguridad, 49
- Aislamientos
 - bacterianos, identificación preliminar, procedimientos, 37
 - identificación definitiva, 1331
 - micóticos, procedimientos de laboratorio de identificación presuntiva, 1116, 1117c, 1119f, 1124r
 - de especies de *Absidia*, 1119, 1120f
 - de especies de *Circinella*, 1120, 1127f
 - de especies de *Cunninghamella*, 1120, 1122f
 - de especies de *Cyncephalastrum*, 1121f
 - de especies de *Mucor*, 1120, 1123f
 - de especies de *Rhizopus*, 1119, 1119f, 1120f
 - de especies de *Zygomycete*, 1118, 1120f
 - de especies de *Zycephalastrum*, 1120
 - extensión, 1116, 1117c
 - identificación de género y especie, 1118, 1119f
 - virales, almacenamiento, 1333
- Alcaligenáceas, 324, 325c, 326c
- Alcaligenes faecalis*, 292c
- Alcaligenes*, especies, 324, 325c
- Aleurosporas, 1107r
- Alishewanella fetalis*, 321, 321c
- Alloiococcus*, especies, 674
 - identificación, 703, 707c
- Alternaria*, especies, 1158, 1158f
- Alteromonadáceas, 320, 325c
- Amblyomma americanum*
 - distribución geográfica, 1206
- Ameba(s), intestinal(es), B, 1205, 1205r, 1207f
- American Society of Clinical Pathologists (ASCP), 48
- American Thoracic Society (ATS), recomendaciones para el tratamiento de la tuberculosis, 1068, 1068r
- American Type Culture Collection (ATCC), 162
- Aminoglucósido(s), especies de *Enterococcus* resistentes, 966
- Amplificación de ácidos nucleicos, 137, 139f
 - análisis posamplificación, 143, 143f, Véase también *Análisis posamplificación*
 - con desplazamiento de hebras, 140
 - mediada por transcripción, 140
 - métodos, identificación de micobacterias, 1059
 - NASBA, 140
 - PCR, 137, 138f, 139f
 - reacción en cadena de la ligasa, 140
 - en tiempo real, 147, 149f
 - aplicaciones clínicas, 150, 152f
 - productos, métodos de detección, 147, 148f
 - reactivos moleculares, 150, 151f
 - sondas FRET, 147, 148, 149f, 150f
 - sondas de hibridación, 147, 149f, 150f
 - sondas de hidrólisis, 147, 148f
 - sondas TaqMan, 148
 - verde de SYBR, 147, 148f
 - TMA, 140
- Anaerobic Bag Culture Set, 856, 857f
- Anaerobio(s), 840, 840c
 - aerotolerantes, 189, 837
 - descritos, 837
 - estrictos, 189
 - facultativos, 189, 837
 - tolerancia al oxígeno, 837
- Análisis de micromatrices, 146
 - identificación de micobacterias, 1062
- Análisis posamplificación, 143, 143f
 - análisis de Southern blot, 144
 - detección enzimática de productos amplificados, 143, 143f
 - electroforesis en gel, 143
 - hibridación inversa, 144, 144f
 - secuenciación de DNA, 144, 146f
- Análisis de riesgos en puntos críticos de control (Hazard Analysis at Critical Control Points, HACCP), 733
- Anamorfo, 1108r
 - definido, 1105
- Anaplasma*, especies, 1351, 1351c
- Anaplasmosis, granulocítica, 1352
- Anélido(s), 1107r, 1131
- Aneloconidios, 1107r
- Angina, Véase *Infecciones respiratorias, altas, faringitis*
 - de Vincent, 71
- Angiostrongiliasis, 1260
- Angiomatosis bacilar, especies de *Bartonella* y, 477
- Anillo(s), 1107r
- Anisakiasis, 1259
- Antibióticos
 - actividad inhibidora, pruebas en determinación, 924
 - agrupamiento de agentes, 930c
 - atmósfera, 931
 - concentración de cationes, 930
 - control de calidad, 932, 933c, 934c
 - estandarización, 930
 - Etest, 949, 957f, 958r
 - garantía de calidad, 932
 - indicaciones, 924, 925c
 - inóculo, 932
 - interpretación de resultados, 932, 933, 936c, 939r, 940c
 - medio de crecimiento, 930
 - pH, 930
 - prueba de sensibilidad por difusión con discos, 938, 945f, 945r, 946f, 947c
 - prueba de sensibilidad por dilución en agar, 937, 944f
 - prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo, 935, 943f
 - prueba de sensibilidad por microdilución en caldo, 943, 944, 949f, 950c, 952f, 953c
 - selección del agente, 924, 926c, Protocolo 17
 - selección de la prueba, 922, Protocolo 17
 - sistemas comerciales, 945
 - situaciones para las pruebas, 924, 925c
 - suero, 930
 - temperatura, 931
 - clasificación, 905c
 - especies de *Enterococcus*, resistencia, 966
 - especies de *Haemophilus*, resistencia, 962
 - cefalosporinas, 963
 - cloranfenicol, 963
 - *S. pneumoniae*, 963
 - de especies de *Haemophilus*, resistencia, penicilina, 962
 - de especies de *Staphylococcus*, resistencia
 - β -lactámicos, 952r, 957, 961f, 963f
 - estreptograminas, 960
 - fluoroquinolonas, 962
 - lincosamidas, 960
 - macrólidos, 960
 - vancomicina, 959, 964r
- guía de laboratorio, 919, 922, 922c, 922r, 923r
- interacciones entre mecanismos de resistencia, 919, 919f, 920f
- interferencia con la formación de las paredes de las células bacterianas, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
- de *N. gonorrhoeae*, resistencia, 965
- de *N. meningitidis*, resistencia, 966
- procedimientos de la prueba, 922, 922r
- que no ejerce ningún efecto sobre las paredes celulares, 918
- resistencia bacteriana, 903, 904
 - mecanismos de resistencia, 906, 906c, 906f, 908c, 909f, 917c, 918r, 920f, 921f
 - variables que intervienen, 904, 906c
- *S. pneumoniae*, resistencia

- β -lactámicos, 962, 965f
- lincosamidas, 965
- macrólidos, 965
- penicilina, 962, 965f
- sensibilidad de los patógenos, pruebas, 39, 39r
- transporte activo fuera de la célula bacteriana, 909
- transporte a través de la pared celular y las membranas celulares, 906, 909f

Anticuerpo(s)

- anti-IgM, diagnóstico serológico, 1345
- definición, 110
- detección
 - EIA, 117f, 118, 119f
 - técnicas de inmunofluorescencia, 123, 124f, 125f
- monoclonales, 111, 113r
- producción, 112, 113r

Antígeno(s)

- asociados con la violencia, de *N. meningitidis*, 545r
- asociados con la virulencia
 - de *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - C, 650
- capsulares polisacáridos, 649
- definición, 110
- detección
 - EIA, 120, 122, 122f
 - examen de especies de *Legionella*, 530
 - técnicas de inmunofluorescencia, 123, 124f, 1173f
- estructuras, 111
- infecciones del SNC, detección, 92
- muestras clínicas de *C. trachomatis*, detección, 1347
- muestras clínicas de especies de *Coxiella*, detección directa, 1351
- muestras clínicas de especies de *Rickettsia*, detección directa, 1351
- de *N. gonorrhoeae*, 547r
- O, 180
- polisacárido capsular, 649
- proteico, 649
- somático, 181
- virales, detección e identificación provisional de infecciones virales, 1329

Antiseros policlonales, 112

Aparato respiratorio, flora comensal y patógenos potenciales, 77, 78c

Aparato urinario, candidiasis, 1171r

API Coryne, 750

API Rapid Strep, identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas, 709

API Staph, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 624

API Staph-IDENT, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 624

Arabinogalactano(s), 183

Arachnida, especies, 1363, Véase también Araña; Garrapata

Araña(s), 1372

- distribución geográfica, 1372
- identificación, 1372

Arcanobacterium, especies, 779, 784c

- faringitis por *A. haemolyticum*, 71
- identificación, diagrama de flujo, 778f

Arcobacter, especies, 379c, 381

- *A. butzleri*, 379c, 381
- *A. cryaerophilus*, 379c, 381
- *A. nitrofigilis*, 379c, 381
- *A. skirrowi*, 379c, 381

Arenaviridae, especies, descritas, 1282c

Arenavirus, manifestaciones clínicas, 1289, 1290c

Arginina, descarboxilación, identificación de enterobacterias, 218, Protocolo 6, Lámina en color 6

Arilsulfatasa, 1436

- identificación de micobacterias por la actividad de, 1037, 1040c, Protocolo 19,

Lámina en color 19

Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), 990

Arsenophonus nasoniae, 264c

Arthrobacter, especies, 779, 786c

Articulaciones, infecciones, 89

Artificio(s)

- cultivos celulares, 1321f
- detección e identificación provisoria de infecciones virales, 1329

Artritis séptica

- *S. aureus* y, 603r
- síntomas, 89

Artroconidios, 1107r

Artrópodo(s), Véase también Ácaro

- clasificación, 1362, 1363r
- descritos, 1362, 1363c, 1364r

- especies de *Arachnida*, 1363, Véase también

Araña; Garrapata

- muestras, remisión al laboratorio, 1362

Artrosporo(s), 1106

Ascariasis, 1221f, 1222r, Lámina en color 22

Ascaris lumbricoides, 1221, 1221f, 1223r

- ciclo vital, 1221f

Ascomiceto(s), 1108r, 1109f

Ascosporo(s), 1108r, 1109f

Asociación celular, detección e identificación provisoria de infecciones virales, 1329

Aspergillus, especies, 1121

- *A. flavus*, 1123, 1127f
- *A. fumigatus*, 1126, 1126f
- *A. nidulans*, 1125, 1128f
- *A. niger*, 1123, 1136f
- *A. terreus*, 1125, 1128f
- características microscópicas, 1123, 1123f
- descritas, 1121
- histopatología, 1125, 1128f, 1130r
- morfología de las colonias, 1123
- presentación de laboratorio, 1122

Aspergiloma, 1130r

Aspergilosis, 1121, 1130r, Véase también

Aspergillus, especies

- broncopulmonar alérgica, 1130r
- diseminada, 1130r
- infecciones por bola micótica, 1130r
- pulmonar invasiva, 1130r

Aspiración

- duodenal, esporas de microsporidios, tinción de Weber en detección, 1219, 1220r

- endotraqueal, diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio inferior, 1219, 1220r
- recolección, 76

- materia fecal, esporas de microsporidios, tinción de Weber en detección, 1219, 1220r

- suprapúbica, 84, 84f

- translingüea, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, 75

- transtraqueal, examen directo, diagnóstico de enfermedad infecciosa, 22c

- transtraqueal, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c

Astroviridae, especies, descritas, 1282c

Astrovirus, manifestaciones clínicas, 1293c, 1294

ATCC, Véase American Type Culture Collection (ATCC)

Atmósfera, evaluación de la actividad inhibidora de agentes antibióticos, 931

ATP, Véase Adenosintrifosfato (ATP)

ATP sintetasa, 194

Auramina O, 1432

Auramina-rhodamina, 1432

Aureobacterium, especies, 791c, 792

Aureobasidium pullulans, 1177, 1177f

Autolisina de *S. pneumoniae*, 656

Autoxipo, 571

Aztreonam, pruebas de cribado, 959c

Azul de metileno de Loeffler, examen microscópico de muestras, 26

B

B. paraptussis, importancia clínica, 493, 496c

Babesia, especies, 1238, 1244r

Babesiosis, 1244r

Bacillus, especies, 738

- aislamiento, 743, 744c
- *B. anthracis*, 739, Véase también *Carbuno*
 - identificación, 744, 745c
- *B. cereus*, 741
 - factores de virulencia, 741
- gastroenteritis, debida a, 741
 - identificación, 744, 745c
- *B. mycoides*, identificación, 744, 745c
- *B. thuringiensis*, identificación, 744, 745c
- bacteriemia debida a, 742
- endocarditis debida a, 742
- identificación, 744, 744c
 - procesamiento de muestras, 743, 746c
 - recolección de muestras, 743, 746c
 - seguridad del laboratorio, 743, 746c
- infecciones hospitalarias, 743
- infecciones en los huéspedes inmunocomprometidos, 742
- infecciones musculoesqueléticas, 743
- infecciones oculares, 743
- infecciones oportunistas, 742
- sensibilidad a los antibióticos, 745
- taxonomía, 738

Bacilos, 169r

- con forma de bastones, inmóviles, oxidasa-positivos, identificación de no fermentadores, 347c
- definidos, 172, 174f

Bacilos ácido-alcohol resistentes, tinción, recuperación e identificación de micobacterias, 1027, 1028c, 1029c, Protocolo 19, Lámina en color 19

Bacilos curvos, 372

Bacilos gramnegativos

- anaerobios
 - no esporulados
 - clasificación, 870
 - identificación, 870
 - nomenclatura asociada, 870
 - pigmentados, identificación, 871, 873c, 878r
- curvos, 372
- enterobacterias, 206
- fermentadores oxidasa positivos, 387
- no fermentadores, 210, 289,
 - acetamida-positivos, identificación de no fermentadores, 349c
 - definidos, 291
 - descritos, 301
 - desnitrificantes, identificación de no fermentadores, 352c
 - dextrosa-negativo, identificación de no fermentadores, 354c
 - dextrosa-positivo, identificación de no fermentadores, 353c
 - fluorescente, identificación de no fermentadores, 348c
 - fluorescentes, identificación de no fermentadores, 348c
 - géneros de importancia médica, taxonomía, características bioquímicas e importancia clínica, 301, 302r
 - identificación
 - descarboxilación, 300, Protocolo 6, Lámina en color 7
 - enfoque práctico, 342, 343c
 - esquemas computarizados, 342
 - factores y dificultades, 339r
 - falta de crecimiento en agar de MacConkey, 297

Bacilos gramnegativos (*Cont.*)

- - - falta de evidencia para la fermentación de glucosa, 297
- - - falta de motilidad oxidasa-negativa, 344c
- - - hidrólisis de esculina, 300, Protocolo 7, *Lámina en color 7*
- - - hidrólisis de urea, 299, Protocolo 6, *Lámina en color 7*
- - - sistema API 20E, identificación de no fermentadores, 345, 355r
- - - método de tinción de Leifson, 300, Protocolo 7, *Lámina en color 7*
- - - método de tinción Ryu, 300, Protocolo 7
- - - morfología de los flagelos, 301
- - - motilidad, 298, 299f, Protocolo 7, *Lámina en color 7*
- - - motilidad oxidasa-positiva, 348c
- - - niveles de servicio, 339, 339r
- - - *P. aeruginosa*, 339
- - - pigmentación, 351c
- - - problemas asociados, 339, 339r
- - - producción de indol, 300, Protocolo 1, *Lámina en color 7*
- - - producción de pigmentos, 298
- - - prueba de utilización de glucosa, 297, 297f, Protocolo 7, *Lámina en color 7*
- - - pruebas convencionales, 340, 341r, 343c
- - - pruebas, Protocolos 1-4, *Lámina en color 7*-1D-H, *Lámina en color 7*-2 A-E, 6-2, 6-6, 7-1-7-4, 297, 298f, 299f, 300r
- - - reacción de la citocromo oxidasa positiva, 297, Protocolo 5, *Lámina en color 7*
- - - reducción de nitratos, 299, Protocolo 6
- - - señales iniciales, 297, Protocolo 1, *Lámina en color 7*
- - - sistema API 20NE, 345, 355r
- - - Sistema AutoScan-4, 358
- - - Sistema Biolog, 357
- - - sistema Crystal Enteric/no fermentadores, 356
- - - sistema de identificación automatizado, 358
- - - sistema de microbiología automatizado Phoenix, 359
- - - sistema RapID NF Plus, 356, 357r
- - - sistema Remel N/F, 345, 350, 356r
- - - sistema Sensititre AP80, 359
- - - sistema Vitek 2, 358
- - - sistema Vitek Legacy, 358
- - - sistemas de equipos comerciales, 342, 345, 350, 355r, 358
- - - sistemas, selección, 358
- - - técnica del montaje húmedo, 300
- - - tubo Oxi/Ferm, 345
- - - Walkaway-40, 358
- - - Walkaway-96, 358
- - - indol-positivos, características, 331c
- - - inmóviles, oxidasa-negativos, identificación de no fermentadores, 344c
- - - lactosa-positivos, identificación de no fermentadores, 348c
- - - lisina-positivos, identificación de no fermentadores, 350c
- - - metabolismo, 291
- - - fermentativo, 291, 296f
- - - móviles, oxidasa-positivos, identificación de no fermentadores, 348c
- - - oxidativo, 291, 296f
- - - vía ED, 294, 294f
- - - vía EMP, 291, 296f
- - - vía de hexosa monofosfato de Warburg-Dickens, 296, 296f
- - - nomenclatura, 347c
- - - pigmentados, identificación de no fermentadores, 351c
- - - recuperación, pautas, 339
- - - nomenclatura, 292
- - - nomenclatura, 292c
- - - con requerimientos nutricionales especiales, 407
- - - shock endotóxico, 205
- Bacilos grampositivos
- - aerobios y facultativos, 728
- - bacterias de dominio, clasificación, 730r
- - anaerobios, no esporulados, identificación, 881, 885, 887c, 888c
- Bacitracina, sensibilidad
- - diferenciación de micrococcos y estafilococos, 612
- - identificación de estreptococos, 680, Protocolo 13, *Lámina en color 13*
- BACTEC, 1434
- BACTEC Myco/F Lytic, detección de micobacterias, 1035
- Bacterias
- - anaerobias, 836
- - antibiogramas, 896
- - características, 859, 860r
- - caracterización, 859, 859r
- - - pruebas bioquímicas convencionales en tubos grandes, 862
- - - clasificación, 840c
- - - clasificación taxonómica, 839, 840c
- - - cultivo
- - - cámara de anaerobiosis, 855, 855f, 856f
- - - jarra de anaerobiosis, 856, 857f, 857r
- - - recuperación óptima, 853r
- - - resultados, informe preliminar, 859
- - - sistema de bolsas para anaerobios, 856
- - - sistema de giro y siembra en estría, 856
- - - sistemas anaerobios, 853, 853f, 853r, 857r
- - - técnicas en jarra de anaerobiosis, 853, 854f
- - - determinación de productos metabólicos, GLC, 864, 865c, 866c, 867f, 867r, 869r, 873c
- - - diferenciación
- - - determinación de las características de cultivo y bioquímicas, 859, 859r, 860r, 861c
- - - identificación presuntiva, 859, 860r
- - - medios de agar diferenciales, 860, 861c, 862r
- - - microsistemas comerciales, 863
- - - placas Presumpto, 860, 861c, 862r
- - - placas de sensibilidad a los antibióticos, 862
- - - prueba de CAMP, 863
- - - prueba de Nagler, 863
- - - hábitat, 838, 838r
- - - identificación, 849, 849c, 852c, 853r, 866
- - - agar sangre para anaerobios de los CDC, 853r
- - - bacilos gramnegativos no esporulados, 870
- - - bacilos grampositivos anaerobios no esporulados, 882, 887c, 888c
- - - cocos, 881, 883c, 884c
- - - equipos comerciales, 863
- - - especies de *Bacteroides*, 870, 873c, 878r
- - - examen directo de materiales clínicos, 850
- - - hemocultivo, 849
- - - incubación de cultivos, 857
- - - pruebas de aerotolerancia, 858, 859f
- - - infecciones humanas, 840, 847f, 848c, 848r
- - - descritas, 840, 847f, 848c, 848r
- - - incidencia, 848r
- - - origen endógeno, 848r
- - - origen exógeno, 848r
- - - sitios, 847f
- - - inspección y subcultivo de colonias, 858
- - - medios, 851, 852c, 853r
- - - muestras que no deben cultivarse, 849c
- - - nombres actuales y anteriores, 841c
- - - nomenclatura asociada, 839, 840c
- - - recolección y transporte de muestras, 849
- - - selección de muestras para cultivo, 849, 849c
- - anatomía, 165
- - cápsulas, 184
- - citoplasma, 175
- - clasificación jerárquica, en *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, 166r
- - clasificación, criterios filogenéticos, 163, 166r
- - corineformes, 746, 750, 751r, 759c, 771
- - - antibiogramas, 759, 759c
- - - pruebas de sensibilidad a los antibióticos, 759, 759c
- - crecimiento, cinética, 191, 191f
- - denominación, 162, 162r
- - descripción, 3
- - efectos de la utilización de piruvato, 193, 195f, 196f
- - estructuras de superficie, 184, 184f
- - fermentación, 191, 193f
- - fimbrias, 185
- - fisiología, 165
- - flagelos, 185, 187f
- - generación de energía, 189, 191, 192f
- - gramnegativas, membrana celular, componentes, 911f
- - grampositivas
- - - pared celular, componentes, 910f
- - - tratamiento antibiótico, resistencia, 968
- - identificación
- - - abreviada, 40c
- - - colonias utilizadas, características, 33, 35r
- - - reacciones en agar, 35r
- - - tipos de colonias, 36c
- - identificación fenotípica, 162, 164r
- - intercambios genéticos, 186, 187f
- - litótrofos, 188
- - metabolismo, 191, 192f
- - requerimientos, 188, 188c, 190f
- - morfologías, 174f
- - nocardioformes, 819
- - prueba de sensibilidad por difusión con discos, 1420
- - prueba de sensibilidad por microdilución en caldo, rendimiento, 1420
- - sin requerimientos nutricionales especiales
- - pili, 185
- - quimiolitótrofos, 189
- - recombinación, 186, 187f
- - relaciones con el oxígeno, 837
- - requerimientos, 187f, 188, 188c
- - resistencia a antibióticos, mecanismos, 908c
- - sin requerimientos nutricionales especiales
- - - prueba de sensibilidad por difusión en disco, 1420
- - - prueba de sensibilidad por dilución en microcaldo, rendimiento, 1422
- - taxonomía, 162, 162r, 166r
- - ultraestructura, 909f
- - "similares a *Streptococcus*", 639
- Bacteriemia
- - asociada con catéteres, 98

- - consideraciones especiales relacionadas, 103
- *B. henselae*, 478
- descritas, 96
- especies de *Bacillus* y, 741
- especies de *Haemophilus* y, 418
- factores de riesgo, 96, 97c, 165, 173r
- posparto, especies de *Haemophilus* y, 411r, 419
- pronóstico, 96, 96c
- *S. aureus* y, 603r
- *S. epidermidis* y, 608r
- tasas de mortalidad, 97, 97c, 165, 173r
- tipos, 96, 97c
- Bacteriófagos lisogénicos, 187
- Bacteriuria
 - detección, cultivo, 85
 - examen microscópico, 84
 - pruebas de cribado, 84
- Bacteroides, 171r
- Bacteroides*, especies
 - *B. fragilis*
 - características diferenciales, 875c
 - identificación, 870, 873c
 - *B. ureolyticus*, 381, 879
 - identificación, 870, 872r, 873c
 - características, 878c
 - productos metabólicos, 877c
- BactiCard, identificación de especies de *Neisseria*, 566
- Balantidium coli*, 1214, 1215f
 - ciclo vital, 1215f
- Balneatrix*, especies, 318, 319c
- Banda API 20E, 273, 273c
- Bartlett, Raymond, 17
- Bartonella*, especies, 474
 - aislamiento, 481
 - cultivo, 481
 - morfología de las colonias, 482
 - tinción de Gram, 482
 - *B. bacilliformis*
 - fiebre de Oroya, 476
 - verruga peruana, 476
 - *B. henselae*
 - angiomatosis bacilar, 477
 - bacteriemia, 478
 - peliosis, 477
 - *B. quintana*
 - angiomatosis bacilar, 477
 - endocarditis, 479
 - fiebre de las trincheras, 477
 - descritas, 474
 - detección, 481
 - diagnóstico serológico, 484
 - distribución geográfica, 475
 - endocarditis, 479
 - enfermedad del arañazo del gato, 480
 - epidemiología, 474
 - identificación, 481, 483c
 - características bioquímicas, 483c
 - importancia clínica, 476
 - neurorretinitis, 481
 - otras infecciones, 481
 - recuperación, tipos de muestras, 481
 - reseña, 474
 - sensibilidad a los antibióticos in vitro, 486
 - taxonomía, 474
- Bases de ácidos nucleicos, estructura molecular, 175f
- Beauveria*, especies, conidios producidos en forma aislada, 1136, 1136f, 1137r
- Bergeyella*, especies, 331c, 332
 - *B. zoohelcum*, 292c
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, clasificación jerárquica de bacterias de importancia clínica, 166r
- β-hemólisis/citolisina, 650
- β-lactamasas, 912, 916c, 917c
 - de amplio espectro
 - evaluación de sensibilidad, 957, 959c, 960c, 960f
 - pruebas confirmatorias, 960c
 - pruebas de cribado, 957
 - de amplio espectro, mediada por plásmidos, características, 915, 917c
 - características, 918r
 - esquema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, 915, 916c
 - evaluación de sensibilidad, 949
 - descrita, 949
 - relacionada con *N. gonorrhoeae*, 952
 - relacionada con especies de enterococos, 952
 - relacionada con especies de estafilococos, 949
 - relacionada con especies de *Haemophilus*, 952
 - relacionada con *Moraxella-catarrhalis*, 952
- β-lactámico(s)
 - especies de *Enterococcus* resistentes, 966
 - especies de *Staphylococcus* resistentes, 957, 961f, 962r, 963f
 - *S. pneumoniae* resistente, 963, 964f
- Bifidobacterium*, especies, identificación, 885
- Bilophila*, especies, 880, 880r
- BioBASE, 272
- Biopsia muscular, detección de parásitos, 1201
- Biopsia tisular, detección de parásitos, 1201
- Biopsia(s)
 - manipulación, 103
 - muscular, detección de parásitos, 1201
 - tisular, detección de parásitos, 1201
- Bioterrorismo, laboratorio de microbiología, 58, 59c, 60c
- Biplaca agar sangre-agar de MacConkey, 31f
- Bipolaris*, especies, 1159, 1160f
- Blastoconidios, 1107r, 1108f
- Blastomycosis, 1145, 1145f, 1146f, 1147r
 - diagnóstico con el uso de técnicas sin cultivo, 1146, 1147r
 - presentación de laboratorio, 1145, 1145f, 1146f, 1147r, Lámina en color 21
- Blastosporas, 1106
- Boca de trinchera, 71
- Bolsas de plástico desechables anaerobias, 856
- Bordetella*, especies, 292c, 324, 325c, 337c, 487, 489, Véase también *Tos convulsa*
 - aislamiento, 493, 494r, 496c
 - medios de cultivo, 494, 494r
 - muestras, 494
 - *B. bronchiseptica*, importancia clínica, 493, 496c
 - *B. hinzii*, importancia clínica, 493, 496c
 - *B. holmesii*, 338, 338c
 - importancia clínica, 493, 496c
 - *B. pertussis*
 - aislamiento, medios de cultivo, 494, 495r
 - detección, nuevas tecnologías, 497
 - factores de virulencia, 491r
 - identificación, 496, 497
 - importancia clínica, 489, 491r
 - *B. trematum*, importancia clínica, 494, 496c
 - características culturales, 492
 - detección, prueba IFD, 495
 - identificación, 492, 494, 494f, 496c
 - características bioquímicas, 496c
 - medios de cultivo, 494c, 495, 496c
 - pruebas de sensibilidad a los antibióticos, 499
 - taxonomía, 487, 489
- Borrelia*, especies, 1077c, 1079c, 1081c, 1085
 - *B. burgdorferi*, medio de cultivo de Barbour-Stoenner-Kelly, 1091, 1092r
 - descripción, 1085
 - enfermedad de Lyme, 1085, Véase también *Enfermedad de Lyme*
- epidemiología, 1085
- fiebre recurrente, 1085
- Botulismo, 895
 - causas, 199
- Brevibacterium*, especies, 785, 787c
- Brevundimonas*, especies, 292c, 316
 - *B. diminuta*, 316
 - *B. vesicularis*, 316
- Brochothrix*, especies, características, 730c
- Broncoscopia rígida, diagnóstico de infección del aparato respiratorio inferior, 76
- Broncoscopio
 - flexible, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, 76
 - rígido, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, 76
- Bronquiolitis, 73
 - infecciones virales y, 1311c
- Bronquitis, especies de *Haemophilus* y, 411r, 417
- Bruceláceas, 326c, 328
- Brucella*, especies, 459, Véase también *Brucellosis*
 - aislamiento, 466c
 - características de cultivo, 461
 - identificación, 465, 466c
 - taxonomía, 461
 - virulencia, 461
- Brucellosis, Véase también *Brucella*, especies
 - diagnóstico serológico, 463
 - distribución geográfica, 459
 - epidemiología, 459
 - espectro clínico, 462, 464r
 - incidencia, 460
 - trabajadores de laboratorio, 460
 - transmisión, 459
 - tratamiento, 465
- Budvicia aquatica*, 264c
 - reacciones bioquímicas, 228c
- Bunyaviridae*, especies descritas, 1280c
- Bunyavirus, manifestaciones clínicas, 1291, 1291c
- Burkholderia*, especies, 292c
 - *B. cepacia*, 310, 312c
 - *B. gladioli*, 311, 312c
 - *B. pseudomallei*, 306, 308c, 309r
 - Burkholderiaceae, 306, 308c, 309r, 312c, 313r, 314c
 - complejo *B. cepacia*, 310, 312c
- Buttiauxella*, especies
 - más nuevas, 264c
 - características diferenciadoras, 263, 266c
 - reacciones bioquímicas, 228c
- C
 - Cabello(s), examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
 - Cadena de transporte de electrones, 195
 - Cadherina-E, factor de virulencia para *L. monocytogenes*, 731
 - Caliciviridae*, especies, descritas, 1281c
 - Calicivirus, manifestaciones clínicas, 1293c, 1294
 - Cálculo de frecuencia de aparición y probabilidad porcentual, 275c
 - Caldo(s)
 - diagnóstico de tuberculosis, 1019
 - enriquecimiento para enterobacterias, 214, 216c
 - para gramnegativos, recuperación de enterobacterias, 215, 216c
 - medio de cultivo y micobacterias, 1032
 - de selenito para enterobacterias, 215, 216c
 - Cámara de anaerobiosis, 855
 - modelo 1024, 856f
 - Campilobacterias, exespecies de *Wolinella* y *Bacteroides*, 381, 382c
 - Campylobacter*, especies
 - *C. coli*, 377, 378c
 - *C. concisus*, 377, 378c

Campylobacter, especies (Cont.)

- *C. fetus*
- *C. curvus*, 378c, 381, 382c
 - subespecie *fetus*, 377, 378c
 - subespecie *venereal*, 377, 378c
- *C. gracilis*, 378c, 382, 382c
- *C. helveticus*, 377, 378c
- *C. hyoilei*, 378c, 380
- *C. hyointestinalis*, 378c, 380
- *C. jejuni*
 - reseña, 373
 - subespecie *doylei*, 378c, 380
 - subespecie *jejuni*, 373, 374c, 376c, 377r, 378c
 - aislamiento de laboratorio, 373, 375c, 376c, 377r
 - identificación por cultivo, 373, 378c
 - identificación presuntiva en heces, 374
 - importancia clínica, 373
- *C. lari*, 377, 378c
- *C. mucosalis*, 378c, 380
- *C. rectus*, 378c, 381, 382c
- *C. showae*, 378c, 380
- *C. sputorum*, 378c, 380
- *C. upsaliensis*, 378c, 381
- características, 374c, 377, 378c
- clasificación, 372, 374c, 375c, 375r, 376c, 378c, 381c, 383c
- descritas, 374
- enterohépáticas, identificación, 387
- identificación, 384, 384r, 385c
 - colonias y muestras de heces, 385, 385r
 - métodos de detección directos, 385
 - pruebas sin cultivo, 384

Candida, especies, 1168, 1171r

- *C. albicans*, identificación, agar harina de maíz, 1167
- *C. glabrata*, 1174, 1174f
- *C. kefyr*, 1168, 1168f
- *C. parapsilosis*, 1168, 1168f
- *C. tropicalis*, 1168, 1168f
- infecciones, 1172r
- patógenas emergentes, 1168, 1169f
- Candidiasis, 1169, 1171r
 - cutáneas, 1171r
 - diseminadas, 1171r
 - mucocutánea, 1171r
 - de las vías urinarias, 1171r

Capa mucilaginosa (glucocáliz), 184

Capillaria Philippinensis, 1226*Capnocytophaga*, especies

- caninas, 453, 455c
 - características bioquímicas, 455c
 - características del cultivo, 453c, 455c
 - identificación, 453c, 455c
 - sensibilidad a los antibióticos, 452
 - taxonomía, 451
- humanas, 451
 - características bioquímicas, 448c
 - características de cultivo, 451, 452
 - importancia clínica, 451
 - sensibilidad a los antibióticos, 452
 - taxonomía, 451

Cápsula

- bacteriana, 184
- de polisacáridos, 656

Captación de hierro, 1442

- identificación de micobacterias, 1037, Protocolo 19

Captura de híbridos, 134, 135f

Carbono, crecimiento y metabolismo bacteriano, 188, 189c

Carbunco

- cutáneo, 739
- epidemiología, 739
- gastrointestinal, 740
- industrial, 739

- inhalatorio, 740
- no industrial, 739
- orofaríngeo, 740
- presentación clínica, 740
- prevención, 741
- pulmonar, 740
- tratamiento, 740

Cardiobacterium hominis, 445, 448c

- características de cultivo, 445
- identificación, 445
 - características bioquímicas, 448c
- importancia clínica, 445
- sensibilidad a los antibióticos, 446
- taxonomía, 445

Caries dental, 71

Caseína, hidrólisis, 1418

Catalasa, 198, 1383

- identificación de micobacterias por la actividad de, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19

Catalasa a 68 °C, 1439

Catéter(es)

- bacteriemia, 98
 - consideraciones especiales, 103
- infecciones, intravenosas, *S. epidermidis* y, 607r
- sepsis, 98
 - consideraciones especiales, 103

Catión(es)

- concentración, examen de actividad inhibidora de agentes antibióticos, 930
- tratamiento antibiótico, 922

Caulobacterias, 316

- grupo *Brevundimonas diminuta*, 316
- grupo rRNA, 316

Cavidad oral, infecciones, 71, 72f

CDC, Véase *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* y Véase *Grupos bacterianos de los CDC*

CDC, esquema de identificación de no fermentadores, 341

Cedecea, especies

- más nuevas, 264c
 - características de diferenciación, 263, 266c
 - reacciones bioquímicas, 228c

Cefalosporina(s), especies de *Haemophilus* resistentes, 963

Cefipima, pruebas de cribado, 959c

Cefotaxima, pruebas de cribado, 959c

Cefoxitina, pruebas de cribado, 959c

Cefpodoxima, pruebas de cribado, 959c

Ceftazidima, pruebas de cribado, 959c

Ceftriaxona, pruebas de cribado, 959c

Cellulomonas, especies, 786, 788, 789c*Cellulomicrobium*, especies, 788, 789c

Célula(s)

- bacteriana(s)
 - crecimiento, cinética, 191, 191f
 - estructura nuclear, 172, 175f
 - forma, 165, 174f, 175f
 - membrana citoplasmática, 176
 - replicación de DNA, 172
 - tamaño, 165, 174f, 175f
 - transcripción, 173
- conidiógena, 1107r
- eucariontes, 165, 173r
- Hfr, 188
- "pie", 1133
- procariontes, 165, 173r

Celulitis, 7, 94

diagnóstico, 92

especies de *Haemophilus* y, 420

estreptococos y, 646

presentación clínica, 94

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Advisory Council for the

Elimination of Tuberculosis, 1018

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), designación alfanumérica para especies bacterianas, 295c

Centrifugación

- precauciones de seguridad, 48
- recuperación e identificación de micobacterias, 1026, 1026c

Cenrosis, 1261

Cepa de referencia, 163

Cereolisina, 741

Cereulida, 742

Cervicitis, 86

- diagnóstico, 87

Cestodo(s), 1228

- descriptos, 1228, 1229f

- *Diphyllobothrium latum*, 1231, 1231f, 1232r- *Dipylidium caninum*, 1232- especies de *Hymenolepis*, 1232, 1233f, 1233r- especies de *Taenia*, 1229f, 1230, 1230r- *H. nana*, 1232, 1233f, 1233r

- del pez gigante, 1231, 1231f, 1232r

Chaetomium, especies, 1160, 1162f

Chagas, enfermedad, 1247

Chancroide, especies de *Haemophilus* y, 411r

Chinche(s), 1364, 1364f

- reduvídea(s), 1363f

CHROMagar, 1165

Chromobacterium, especies, 401*Chryseobacterium*, especies, 292c, 329, 330, 331c*Chrysosporium*, especies, conidios producidos en forma aislada, 1135, 1136f

Ciclo de los ácidos tricarbóxicos de Krebs, 193, 196f

Ciclo diagnóstico

- análisis de resultados, 44, 44r
- criterios para rechazo de muestras, 14, 15r
- examen microscópico, 15, 17, 17r, 18c, 24r, 26r
 - fases, 10, 10f, 13c, 15r, 16c, 17r, 18c, 21r, 25r, 28c, 29f, 33c, 33r, 37f, 39r, 40c, 44r
 - fase analítica, 15, 17, 17r, 18c, 24r, 26r, 28c, 30f, 35c, 35r, 37f, 39r, 40c
 - fase posanalítica, 43, 43c, 44r
 - fase preanalítica, 9f, 10, 12c, 15r, 16c
- informe de resultados, 43, 43c
- interacciones con epidemiólogos, 44
- mantenimiento de muestras y registros, 44
- observaciones preliminares de muestras, 14
- recepción de muestras, 14
- recolección de muestras, 9f, 10, 12c
- relaciones costo-eficacia, 15, 16c
- transporte de muestras, 10, 12, 12c, 14, 14r

Cigomiceto(s), 1107r, 1108f

- histopatología, infecciones, 1123f

- observaciones preliminares sugestivas, 1185

- identificación, 1118

Cigospóra(s), 1108r, 1109f

Cimex lectularius, 1374*Circinella*, especies, identificación, 1120, 1122f

Cisticercosis, 1230r

Cistitis

- hemorrágica, infecciones virales y, 1312c

- incrustada alcalina, 770

Citocina, 7, 8

Citocromooxidasa

- identificación por la actividad de, 209,

Protocolo 1, *Lámina en color* 6Citolisina/hemolisina, factor de virulencia en especies de *Enterococcus*, 667

Citología

- cervical, clasificación de Bethesda, 1307c

- detección de *C. trachomatis*, 1348

Citomegalovirus (CMV)

- detección inmunológica, 1336
- detección molecular, 1339
- diagnóstico serológico, 1344
- manifestaciones clínicas, 1301
- Citoplasma, bacteriano, 176
- Citrobacter*, especies, 249c
- características de identificación, 226c
- especies, diferenciación, 250c
- reacciones bioquímicas, 228c
- Citrobacterreae* (tribu), 221c, 249, 249c, 250c
- características de identificación, 226c
- Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii*, 1162, 1162f
- Clamidas, 171r
- Clamidoconidio, 1107r
- Clamidospora, definida, 1106
- Clamidia*, especies
- *C. pneumoniae*, infecciones, 1349
- *C. psittaci*, infecciones, 1348
- *C. trachomatis*, 1346, 1347
- - aislamiento, cultivo celular, 1347
- - detección de ácidos nucleicos, 1347
- - detección de antígenos, 1347
- - detección citológica, 1348
- - detección directa en muestras clínicas, 1347
- - detección morfológica de inclusiones, 1347
- - diagnóstico serológico, 1348
- - infecciones
- - - características clínicas, 1346
- - - epidemiología, 1346
- - - niños con abuso sexual, 1348
- - - recolección de muestras, 1347
- infecciones, 1345, 1347
- Clasificación de la citología cervical de Bethesda, 1307c
- Clasificación, definida, 162
- Cleistotecia, 1125, 1128f
- CLO-3, 379c, 383, 383c
- Clonorchis sinensis*, 1236, 1239f, 1239r
- Clonorquiasis, 1240r
- Cloranfenicol, especies de *Haemophilus* resistentes, 963
- Cloroquina, infecciones parasitarias, 1264c
- Cloruro de sodio al 5%, crecimiento, identificación de micobacterias, 1042, Protocolo 19
- Clostridios, 168r
- histotóxico, mionecrosis por clostridios o gangrena gaseosa, 889
- Clostridium*, especies
- *C. botulinum*, 895
- *C. difficile*
- - diagnóstico de laboratorio, 894, 894r
- - enfermedad intestinal asociada, 893, 894r
- - recolección y transporte de muestras que contienen, 893
- *C. perfringens*
- - enfermedad intestinal que involucra, 892
- - prueba CAMP, 863
- *C. ramosum*, 893
- *C. tetani*, 896
- identificación, 886, 890c, 895r
- Coaglutinación, identificación de estreptococos, 685
- COBAS AMPLICOR, identificación de especies de *Neisseria*, 569
- Coccidioides*, especies, *C. immitis*, 1146, 1149f, 1150r
- Coccidioidomycosis*, 1146, 1149f, 1150r, Lámina en color 21
- Coccidiosis*, intestinales, 1214, 1216f, 1217f, 1217r
- Coco(s)
- anaerobio, identificación, 881, 883c, 884c
- definido, 172, 174f
- grampositivo
- - estafilococo, 593
- - estreptococo, 639
- Cocobacilar, definido, 172, 174f
- Cocobacilo(s), inmóvil(es), oxidasa-positivos, identificación de no fermentadores, 346c
- Cocolisina, factor de virulencia en especies de *Enterococcus*, 667
- Códigos de Current Procedural Terminology (CPT), 48
- Cólera
- Bengala, 388
- causas, 388, 388c, 389r
- hemisferio occidental, 389
- reseña mundial, 388
- toxinas, acción, 389r, 390f
- Colitis, hemorrágica, 239r
- College of American Pathologists (CAP), Comisión sobre inspección y acreditación de laboratorios, 60, 1043
- Colonias, características macroscópicas, 33, 34f, 35c, 35r, 36c
- Coloraciones ácido-alcohol resistentes
- examen microscópico de muestras, 25
- Ziehl-Nielsen, examen microscópico de muestras, 20c
- Coltivirus, manifestaciones clínicas, 1294
- Comamonadaceae, 315
- grupo acidovorans, 315
- grupo facilis-delafieldii, 316
- Comamonas*, especies, 293c
- Combinación BACTEC TB-sonda de DNA, identificación de micobacterias, 1058
- Comensalismo, 4
- Comisión sobre inspección y acreditación de laboratorio, College of American Pathologists (CAP), 60
- Comité sobre abuso y abandono infantil, American Academy of Pediatrics, 574
- Complejo *Streptococcus bovis/streptococcus equinus*, 663
- Compuesto, medios selectivos en recuperación de *Enterobacteriaceae*, 211, 214r
- Confidencialidad, relacionada con el paciente, laboratorio de microbiología, 47
- Conidióforo(s), 1107r, 1108f, 1123, 1123f
- Conidios
- células conidiógenas, 1107r
- definición, 1106
- hongos hialinos productores de cadenas, 1131, 1131f, 1132f
- hongos hialinos productores de grupos, 1132, 1132f
- Conjugación, 187
- Conjuntivitis
- *Haemophilus*, especies y, 411r
- presentación clínica, 94
- Contrainmunolectroforesis (CIE), 112
- Control de calidad
- desarrollo de procedimiento de perfusión en disco estandarizado, 942, 947c
- evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 932, 933c, 934c
- identificación de resultados de sensibilidad a los antibióticos, 39
- laboratorio de microbiología, 59
- - monitorización de equipamiento de laboratorio, 60, 61c
- - monitorización de medios de cultivo, reactivos e insumos, 61, 62c
- - programa, componentes, 60
- Cordylobia anthropophaga*, 1373
- Corineforme, definido, 172, 174f
- Coriza, infecciones virales y, 1311c
- Coronaviridae*, especies, descritas, 1280c
- Coronavirus
- manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
- OC43, humano, 1280c
- SRAG
- - detección molecular, 1339
- - diagnóstico serológico, 1348
- Corynebacterium*, especies, 746
- aislamiento, 768f
- algoritmo de identificación, 767f
- *C. accolens*, 751r
- *C. afermentans*, 751r
- *C. amycolatum*, 751r, 759, 762c, 763c
- *C. appendicis*, 751r
- *C. argenteratense*, 751r
- *C. atypicum*, 751r
- *C. aurimucosum*, 752r
- *C. auris*, 751r
- *C. bovis*, 752r
- *C. confusum*, 752r
- *C. coyleae*, 752r
- *C. diphtheriae*, 753r, 761c, 763c, 765, 766, Protocolo 14, Lámina en color 14
- *C. durum*, 753r
- *C. freneyi*, 753r
- *C. glucuronolyticum*, 753r
- *C. imitans*, 753r
- *C. jeikeium*, 762c, 769
- *C. kroppenstedtii*, 754r
- *C. lipophiloflavum*, 754r
- *C. macginleyi*, 754r
- *C. matruchotii*, 754r
- *C. minutissimum*, 754r
- *C. mucifaciens*, 755r
- *C. nigricans*, 755r
- *C. propinquum*, 755r
- *C. pseudodiphtheriticum*, 755r, 763c, 769
- *C. riegliei*, 756r
- *C. sanguinis*, 756r
- *C. seminale*, 753r
- *C. simulans*, 756r
- *C. singularis*, 757r
- *C. striatum*, 756r, 763c, 769
- *C. sundsvallense*, 757r
- *C. thomssenii*, 757r
- *C. ulcerans*, 757r
- *C. urealyticum*, 754r, 763c, 770
- *C. xerosis*, 753r
- características, 748c
- grupo F1, 758r
- grupo F2, 758r
- grupo G, 758r
- grupo I, 758r
- identificación, 746, 750, 751r, 759c
- miembros aislados de seres humanos, 759, 761c, 766, 767, Protocolo 14, Lámina en color 14.E.F
- pruebas de sensibilidad a los antibióticos, 752, 759c
- relacionadas con animales, 770, 772c
- Coxiella*, especies
- aislamiento en cultivo, 1351
- características clínicas, 1349
- detección directa de antígeno y ácido nucleico en muestras clínicas, 1351
- epidemiología, 1349
- infecciones, 1349
- - diagnóstico serológico, 1351
- Crioaglutininas, 1003
- Criptococosis, 1170, 1173f, 1175r
- cutánea, 1175r
- diseminada, 1175r
- pulmonar, 1175r
- Criptosporidiosis, 1217r
- Cromatografía gas-líquido
- controles, 866, 866f, 873c
- determinación de productos metabólicos de anaerobios, 864, 864c, 865c, 867f, 867r, 869r, 873c
- - análisis de ácidos no volátiles, 864, 869r
- - identificación de ácidos grasos volátiles, 866, 867f, 873c

- Cromatografía gas-líquido (*Cont.*)
- recuperación de micobacterias, 1032
- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
- diagnóstico de tuberculosis, 1020
 - recuperación de micobacterias, 1032
 - con uso de fluorescencia (HPLC-FL), recuperación de micobacterias, 1032
- Cromomicosis, 1166r
- agentes, 1160
 - definida, 1160
- Cromomicosis/micetoma, observaciones preliminares sugestivas de los agentes, 1189
- Crup, Véase *Laringitis, estridulosa*
- Cryptococcus*, especies
- *C. neoformans*, 1170, 1173f, 1175r
 - *C. neoformans*, meningitis, 90
- Cryptosporidium*, especies, *C. parvum*, 1214, 1216f, 1217r
- anotaciones de laboratorio, 1216, 1217r
 - descritos, 1214, 1217r
 - identificación de laboratorio, 1215, 1217f
- Cultivo(s)
- aislamiento viral, diagnóstico de infecciones virales, 1316
 - basado en carbón selectivo libre de sangre, en aislamiento de *C. jejuni*, 376c
 - celulares
 - aislamiento de *C. trachomatis*, 1347
 - artificios, 1321f
 - diagnóstico de infección viral
 - aspectos técnicos, 1320, 1322f, 1322r
 - contención, 1318, 1320, 1321f
 - inoculación e incubación, 1323, 1323f
 - preparación y mantenimiento, 1316, 1317c, 1318c
 - selección, 1321
 - diagnóstico virológico, evolución, 1273
 - normales, 1316, 1318f
 - tambor giratorio, 1323, 1323f
 - tipos, 1317, 1317c
 - detección de bacteriuria, 84
 - diagnóstico de infección por especies de *Haemophilus*, 422
 - diagnóstico de infección del SNC, 92
 - de esputo, interpretación, 77, 77r
 - esputo, interpretación, 77, 77r
 - de fauces
 - examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c
 - recolección, 72, 72f
 - infecciones oculares, 95
 - interpretación, 33, 33c, 33f, 33r, 34f, 37f
 - médula ósea, 104
 - microbianos cuantitativos, 95
 - mixtos, separación de morfotipos bacterianos, 35, 37c
 - muestras de orina, 83
 - muestras titulares, manipulación, 104
 - nasofaríngeos, 72
 - sangre, recolección, infecciones de transmisión sanguínea, 98, 99f, 101r. Véase también *Hemocultivos, recolección, infecciones de transmisión sanguínea*
 - tinción de Gram, 36, 37f
 - virales, tambor giratorio, 1323, 1323f
- Cunninghamella*, especies, identificación, 1120, 1122f
- Cupriavidus*, especies, 311, 313r, 314c
- *C. pauculus*, 293c
- Curvularia*, especies, 1159, 1161f
- Cyclospora cayetanensis*, 1217
- D**
- Deferoxamina, sensibilidad, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 623
- Delftia acidovorans*, 293c
- Demodex brevis*, 1372
- Demodex folliculorum*, 1372
- Dermabacter*, especies, 789c, 790
- Dermacentor*, especies
- *D. variabilis*, identificación, 1368, 1369f, 1370c
 - distribución geográfica, 1365, 1365c
- Dermatobia hominis*, 1366c
- Dermatófito(s), 1144r
- descritos, 1136
 - identificación, 1136, 1137, 1139f, 1144r
 - técnicas sin cultivo, 1142, 1144r
 - observaciones preliminares sugestivas, 1187
- Dermatophilus*, especies, 824
- Derrame(s), manipulación, precauciones de seguridad, 50
- Desarrollo de toxoide, 199
- Descarboxilación, identificación de no fermentadores, 300, Protocolo 6, *Lámina en color 7*
- Descarboxilasa(s), 1399, 1399f, Protocolo 6, *Lámina en color 7*
- Descontaminación
- digestión y, 1429
 - tipos, 49c
- Desechos, manipulación, precauciones de seguridad, 50
- Desinfección, tipos, 49c
- 3-Desoxi-D-mannooctulosonato, 181
- Desoxirribonucleasa, factor de virulencia estreptocócico, 645
- Detección inmunológica, de virus en muestras clínicas, 1336
- Detección de quórum, 197
- Determinación de fenilalanina desaminasa, identificación de enterobacterias, 219, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
- Diagnóstico virológico, 1271
- revisión histórica, 1273
 - servicios
 - evolución, 1273, 1273r
 - niveles, 1274, 1274r
 - técnica de cultivo celular, Véase también *Cultivos celulares*
 - evolución, 1273
- Diagramas de flujo, identificación de enterobacterias, 271, 272f
- Diarrea
- enfermedad sistémica, causas, 79c
 - infecciones virales y, 1311c
 - inflamatoria, causas, 79c
 - no inflamatoria, causas, 79c
 - del viajero, 79
- Dictiospora(s), 1116r
- Dientamoeba fragilis*, 1213f
- Dietilcarbamazina, infecciones parasitarias, 1264c
- Dietzia*, especies, 822
- Diferenciación bioquímica, detección e identificación provisoria de infecciones virales, 1329
- Difilobotriasis, 1232r
- Difosfato de hexosa, definido, 192
- Difteria, 71
- causas, 200
- Difusión, doble, 112
- Digestión, descontaminación y, 1429
- Dióxido de carbono, crecimiento y metabolismo bacteriano, 189
- Diphyllobothrium latum*, 1231, 1231f, 1232r
- Dipylidium caninum*, 1232
- Dirofilaria*, especies, 1251
- Dirofilariasis, 1252
- Disco MUG, 270
- Disentería, 241r
- definida, 78, 79c
- Disentería bacilar, 241r
- DNA, Véase *Acido desoxirribonucleico (DNA)*
- DNA polimorfo amplificado aleatorio (RAPD), 1063
- DNA ramificado, 135
- Dolosicoccus*, especies, 675
- identificación, 706, 707c
- Dolosigranulum*, especies, 675
- identificación, 706, 707c
- Domino(s), 165
- Dracunculiasis, 1251
- Dracunculus medinensis*, 1251
- Drechslera, especies, 1159
- Dysgonomonas*, especies, 455, 457c
- E**
- Echinococcus granulosus*, ciclo vital, 1256f
- Ectima diftérico, 766
- Ectoparásito(s), 1192, 1361
- ácaros, 1372
 - arañas, 1372
 - definiciones asociadas, 1364r
 - escritos, 1362
 - especies de *Ornithodoros*, 1369
 - insectos, 1372
 - taxonomía relacionada, 1364r
- EDTA, Véase *Acido etilenediaminotetraacético (EDTA)*
- Edwardsiella*, especies
- características de la identificación, 226c
 - *E. tarda*, 240, 243c
 - reacciones bioquímicas, 228c
- Edwardsiella* (tribu), 221c, 240, 243c
- especies, diferenciación, 243c
- Efecto citopático
- detección e identificación provisional de infecciones virales, 1324, 1324f, 1325c, 1326c, 1327f
 - enterovirus, 1332f
 - examen de cultivos, 1324, 1324f
 - mixovirus, 1327f
 - virus respiratorios, 1328f
 - viral, diagnóstico diferencial, 1325c
- Eh, Véase *Potencial de oxidorreducción (Eh)*
- Ehrlichia*, especies, infecciones, 1351, 1351c
- Ehrliquisis, monocítica, 1352
- Eikenella corrodens*, 446
- características culturales, 445, 446
 - características bioquímicas, 448c
 - importancia clínica, 447
 - sensibilidad a los antibióticos, 451
 - taxonomía, 446
 - factores de virulencia, 446
- Electroforesis en gel
- análisis posamplificación, 143
 - de campo pulsado, 152, 152f
- Electroporación, 186
- Elementos genéticos transponibles, definidos, 188
- Emetina, infecciones parasitarias, 1264c
- Empedobacter brevis*, 293c, 330, 331c
- Empiema, 74
- Encefalitis, 91
- infecciones virales y, 1311c
- Encefalopatías espongiiformes transmisibles, manifestaciones clínicas, 1309, 1310c
- Endocarditis, 1171r
- especies de *Bacillus* y, 741
 - especies de *Bartonella* y, 479
 - especies de *Haemophilus* y, 411r, 418
 - por estreptococos viridans, 660
 - microorganismos de requerimientos nutricionales especiales y consideraciones especiales relacionadas, 103
 - *S. aureus* y, 603r
 - de válvula nativa, *S. epidermidis* y, 607r
 - de válvula protésica, *S. epidermidis* y, 607r
- Endoftalmitis, presentación clínica, 95
- Endolimas nana*, 1209
- Endospora(s), 1107r

- bacteriana(s), 183
- Endotoxina(s)
 - descritas, 200
 - factores de virulencia, 199
- Enfermedad por arañazo del gato, especies de *Bartonella* y, 480
- Enfermedad broncopulmonar alérgica, 75
- Enfermedad contagiosa, definición, 6r
- Enfermedad de Crohn, *M. paratuberculosis* y, 1052
- Enfermedad intestinal necrotizante, *C. perfringens* y, 892
- Enfermedad de los legionarios, manifestaciones clínicas, 525, 525c
- Enfermedad de Lyme
 - descrita, 1087, 1087r
 - diagnóstico de laboratorio, 1091, 1091r
 - - cultivo, 1091, 1091r
 - - detección molecular, 1092
 - - detección morfológica, 1091
 - - detección serológica, 1091
 - epidemiología, 1088, 1088f
 - especies de *Borrelia* y, 1085
 - garrapatas y, 1364
 - investigaciones europeas, 1087, 1087r
 - manifestaciones clínicas, 1090
- Enfermedad meningocócica
 - prevención, 554
 - vacunas, 554
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), especies de *Haemophilus* y, 417
- Enfermedad transmisible, definición, 6r
- Enfermedad ulcerosa genital, 86
 - diagnóstico, 88
- Enfermedad de Whipple
 - anatomía patológica, 824
 - descripción, 824
 - sitios extraintestinales, 825c
- Enfermedades infecciosas. Véase también *Infección; Agentes infecciosos*
- agentes infecciosos, Véase *Agentes infecciosos*
- categorías, definición, 6r
- ciclo diagnóstico, fases, pruebas de laboratorio, 9f, 10, 12c, 14r, 15r, 16c, 17r, 18c, 24r, 26r, 28c, 30f, 35c, 35r, 37f, 39r, 40c, 44r. Véase también *Ciclo diagnóstico, fases*
- definición, 6r
- diagnóstico
 - examen directo de muestras de cultivo, 21, 22c
 - laboratorio de microbiología, rol, 1
 - huésped infectado, 2
 - medioambiente y, 2
 - mundo, 2
 - signos y síntomas clínicos, 8
 - tríada, 2, 3c
- Enfermedades micóticas, diagnóstico serológico, 1180
- Enfermedades parasitarias. Véase también *Infecciones parasitarias*
- manifestaciones clínicas, 1194
- muestras, 1194
 - aspirados, 1201
 - biopsia muscular, 1201
 - biopsias titulares, 1201
 - distintas de heces, examen, 1200, 1201f, Protocolo 22
 - esputo, 1201
 - extraintestinales, examen, 1201
 - fecales, 1195, 1197r
 - - examen visual, 1196
 - - preservación de muestras clínicas, 1196, 1197r
 - - procesamiento para examen de huevos y parásitos, 1196. Protocolo 22
 - líquidos corporales, 1201
 - orina, 1201
 - procesamiento, 1195
 - raspados corneales, 1201
 - recolección, 1195
 - sangre, 1202, Protocolo 22
 - transporte, 1195
 - tratamiento, fármacos, 1264c, 1266
- Enfermedades de transmisión sexual, 85. Véase también *Infecciones del aparato genital, Infecciones de transmisión sexual* y cada infección específica
- Enlace(s) galactosídico(s), 207, 208f
- Ensayo APTIMA Combo 2, identificación de *N. gonorrhoeae*, 570
- Ensayo BD ProbeTec-SDA, 140
- Ensayo de galactomannano (GM EIA) en diagnóstico de hongos filamentosos hialinos, 1126
- Ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA), diagnóstico de hongos filamentosos hialinos, 1126
- Ensayo de lisado de lóbulos, diagnóstico de shock endotóxico, 205
- Ensayo para *M. tuberculosis* BD ProbeTec, identificación de micobacterias, 1060
- Ensayo de PCR para *N. gonorrhoeae* AMPLI-COR, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
- Ensayos APTIMA, 140
- Ensayos de PCR
 - identificación de micobacterias, 1060
 - identificación de *N. gonorrhoeae*, 571
- Entamoeba*, especies
 - *E. coli*, versus *E. histolytica*, 1206
 - *E. dispar*, 1208
 - *E. histolytica* Lámina en color 22-1, Lámina en color 22-1, Lámina en color 22-2 A.I-K, 1205, 1205r
 - ciclo vital, 1207f
 - identificación de laboratorio, 1205
 - no patógenas, 1208
 - versus *E. coli*, 1206
- Enterobacter*, especies
 - características de identificación, 226c
 - *E. aerogenes*, 253, 253c
 - *E. annogenus*, 253c, 254
 - *E. asburiae*, 253c, 254
 - *E. cancerogenus*, 253c, 254
 - *E. cloacae*, 253, 253c
 - *E. cowanii*, 253c, 254
 - *E. gergoviae*, 253c, 254
 - *E. hormaechei*, 253c, 254
 - *E. intermedius*, 253c, 254
 - *E. sakazakii*, 253, 253c
 - especies, diferenciación, 253, 253c
 - reacciones bioquímicas, 228c
- Enterobacterias, 204
 - bacilos gramnegativos, 205
 - características de identificación clave de las especies más frecuentes, 220, 225, 226c, 227r, 228c
 - clasificación, por tribus, 220, 221c
 - estándares interpretativos de CIM, 933, 936c
 - estándares interpretativos de diámetro de zona y referencias de CIM equivalentes, 937c
 - géneros, establecidos, cambios recientes importantes, 221c
 - identificación, 226c
 - actividad de la citocromooxidasa, 209, Protocolo 1, Lámina en color 6
 - agar cromogénico, 271
 - agar TSI, 210, Lámina en color 6
 - características de cribado, 206, 207f
 - características diferenciales, 215, 217f, 219c, 220r, 226r
 - características de screening
 - descarboxilación de arginina, 218, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - descarboxilación de ornitina, 218, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - diagramas de flujo, 271, 272f
 - equipos comerciales de screening, 270
 - esquemas computarizados, 272
 - fermentación de hidratos de carbono, medios de cultivo, 209, 209f, 210r, 211r
 - matriz en damero, 271
 - métodos de cribado rápidos, 269, 270f
 - motilidad, 220, 220r
 - presuntiva, características, 206, 207f, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - producción de fenilalanina desaminasa, 219, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - producción de indol, 216, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - producción de sulfuro de hidrógeno, 219, 219c, 220r
 - producción de ureasa, 218, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - prueba de rojo de metilo, 217, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - prueba de utilización de citrato, 217, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - prueba de Voges-Proskauer, 217, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - reducción de nitrato, 209, Protocolo 6, Lámina en color 6
 - sistema de autoidentificación de gramnegativos Sensititre, 280
 - sistema OmniLog ID, 280
 - sistema Phoenix, 280
 - sistema Vitek, 279
 - sistemas automatizados, 279
 - sistemas clásicos, 271, 272f
 - sistemas de codificación numérica, 273, 273c, 275c
 - sistemas en equipos comerciales, 274, 276, 277c, Véase también *Sistemas empaquetados*
 - sistemas semiautomatizados, 279
 - utilización de hidratos de carbono, 206, 207f
 - Walkaway, 279
 - más nuevas, 263, 264c
 - características diferenciadoras, 266c
 - características de identificación, 263, 263c
 - importancia clínica, 263, 263c
 - reacciones bioquímicas, 228c
 - recuperación
 - caldos de enriquecimiento, 215, 216c
 - medios de aislamiento Lámina en color 6-1C, Lámina en color 6-2A-D, Lámina en color 6-3A-F, 211, 212c, 213c, 214r, 216c, 216r
 - muestras gastrointestinales, medios selectivos, 213c, 214
 - resistentes a los antibióticos, 205
 - taxonomía, 220
- Enterobiasis, 1224r
- Enterobius vermicularis*, 1223
- Enterococo, 639
 - β-lactamasas, inducción, 952
 - clasificación, 641r
 - descritos, 640
 - factores de virulencia, 667
 - identificación, sistemas comerciales, 708
 - métodos de evaluación, 954c
 - miembros, 667, 668r
 - taxonomía, 667
- EnteroScreen4, 271
- Enterotube II, 277
- Enterovirus
 - detección molecular, 1339
 - efecto citopático, 1332f

- Enzima
- diana, modificación, 912
 - DNA girasa, 174
 - modificadoras de antibióticos, 915, 916c, 917c
 - neuraminidasa, *S. pneumoniae*, 656
 - reconocedora de penicilina, activa en membrana celular, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
 - *S. aureus*, 601r
- Enzimoimmunoanálisis (EIA)
- detección de anticuerpos, 116, 117f, 119f
 - detección de antígenos, 120, 122, 122f
 - método de captura de anticuerpos, detección de IgM, 120, 121f
- Epibacterium*, especies, 1159, 1160f
- Epidemiólogos, interacciones, ciclo diagnóstico, 44
- Epidermophyton*, especies, *E. floccosum*, identificación, 1142, 1143f
- Epiglottis, especies de *Haemophilus* y, 411r
- Epiglottitis, 73
- especies de *Haemophilus* y, 416
- EPOC. Véase *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)*
- Equinococosis, 1261, 1262f, Lámina en color 22
- Equipamiento, de laboratorio, monitorización, control de calidad, 59, 61c
- Equipo de prueba *Neisseria*-Kwik, identificación de especies de *Neisseria*, 566
- Equipo para recolección de orina B-D, 82
- Equipos comerciales, identificación de no fermentadores, 342, 345, 350, 355r, 356
- Eremococcus*, especies, 675
- Erisipelas, 736
- estreptococos y, 646
- Eritromicina, *S. pyogenes* resistentes, 968
- Erupción(es)
- maculopapular, infecciones virales y, 1312c
 - petequiales, infecciones virales y, 1312c
 - vesiculares, infecciones virales y, 1312c
- Erwineae* (tribu), 262
- Erysipelothrix*, especies, 736
- características, 730c
 - *E. rhusiopathiae*
 - factores de virulencia, 737
 - importancia clínica, 737
 - taxonomía, 736, 736c
- Escabiosis, 1372
- Escherichia*, especies
- características de identificación, 226c
 - *E. abertii*
 - descritas, 239
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - *E. adecarboxylata*, descrita, 240
 - *E. blattae*
 - descritas, 240
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - *E. coli*, 225, 241, 241c, 241r, 244c
 - diarreicogénica, características, 238c
 - difusamente adherente, características, 238c
 - enteroagregante, características, 238c
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - *E. fergusonii*
 - descritas, 240
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - *E. hermannii*
 - descritas, 240
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - *E. vulneris*
 - descritas, 240
 - reacciones bioquímicas, 230c
 - enterohemorrágica
 - características, 238c
 - detección, 239
 - epidemiología, 237
 - fisiopatología, 227, 240
 - enteroinvasiva, características, 238c
 - enteropatógena, características, 238c
 - enterotoxigénica, características, 238c
 - estructura de peptidoglicanos, 179f
 - estructura de unidad repetitiva de peptidoglicano, 178, 178f
 - gastroenteritis, 227, 242c
 - meningitis, 90
 - especies, diferenciación, 241r
 - reacciones bioquímicas, 228c
- Escherichiae*, tribu, 221c, 225, 240, 242c, 243r, 244c, 245c, 245r
- características de identificación, 226c
- Escotocromógeno(s), 1047
- Esfingobacteriaceae, 332, 333c
- Esfingobacterias, 172r
- Esfingomonadales, 318
- ESP Culture System II, detección de micobacterias, 1034
- Espacio periplasmático, 180
- Esparganosis, 1261
- Especies bacterianas
- definidas, 163
 - designaciones alfanuméricas de los CDC, 295c
 - nitrato-positivas asacarolíticas, 879
 - "similares a *Rothia*", 793, 794c
- Espectrometría de masa, diagnóstico de tuberculosis, 1020
- Espirilos, definidos, 172, 174f
- Espiroqueta(s), 171r
- cultivo, 1081, 1081c
 - transmisión, 1079c
- Espora(s)
- definidas, 1106
 - microsporidios, heces y aspirados duodenales, tinción de Weber en detección, 1219, 1220r
- Esporangioespora(s), 1107r
- Esporangiola, 1120, 1122f
- Esporangios, 1107r
- Esporodoquia, 1159
- Esporotricosis, 1152, 1154f, 1155f, 1155r
- Esporulación basipetalo, 1107r
- Espuito
- examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c
 - expectorado, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, recolección, 75
- Esquema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Madeiros, γ -lactamasas, 915, 916c
- Esquema de clasificación de Runyon, 1042, 1042r
- Esquema de clasificación de Woods y Washington, 1043, 1043r
- Esquema de identificación de Gildardi, identificación de no fermentadores, 341
- Esquema de identificación de Pickett, identificación de no fermentadores, 341
- Esquema de identificación de Weyant, identificación de no fermentadores, 341
- Esquemas computarizados, identificación de no fermentadores, 342
- Esquistosoma(s), 1234, 1235f, 1236r
- Estafilococos, 593
- aislamiento, 611, 613c, Protocolo 12, Lámina en color 12
 - morfología de las colonias, 611
 - muestras clínicas, 611
 - prueba de catalasa, 612
 - aumento al máximo de detección de resistencia a meticilina, 962r
 - coagulasa-negativa, 606, 607r
 - identificación, 617
 - actividad de la pirrolidonil arilamida-sa, 618, 620
 - API Staph, 624
- API Staph-IDENT, 624
 - clave dicotómica, 620f
 - ID32 Staph, 624
 - métodos convencionales, 617, 618r, 620f, 621c
 - métodos de tipificación, 626, 629
 - molecular, 626, 629
 - Panel MicroScan Pos ID, 625
 - Panel MicroScan Rapid Pos Combo, 625
 - producción de acetoina, 623
 - producción de fosfatos, 618
 - producción de ureasa, 623
 - prueba ODC, 620, 623
 - pruebas fenotípicas y genotípicas, 617, 618r, 619c, 621c
 - Rapidez Staph, 624
 - sensibilidad a polimixina B, 620
 - sensibilidad, desferoxamina, 623
 - Sistema de identificación G Crystal, 625
 - Sistema de identificación microbiano, 626
 - Sistema de identificación en microplacas Biolog, 626
 - sistemas comerciales, 624
 - Staf-System 18-R, 626
 - Staphy-Zym, 626
 - tarjeta Vitek GPI, 625
 - coagulasa-positivos, diferenciación, 617
 - definidos, 172, 174f
 - diferenciación preliminar, 611, 613c
 - identificación, enfoque de laboratorio, 629
 - importancia clínica, 594, 596r, 607r
 - micrococcos versus, 612, 613c, Protocolo 12, Lámina en color 12
 - taxonomía, 593
- Esterasa leucocitaria (LE), 86
- Esterilización, tipos, 49c
- Estibogluconato de sodio, infecciones parasitarias, 1265c
- Estreptocinasa(s), factor de virulencia estreptocócico, 645
- Estreptococos, 639, Véase también *Streptococcus*, especies
- aislamiento, 675, Protocolo 13, Lámina en color 13, Lámina en color 13
 - β -hemolíticos
 - agrupables, identificación, características bioquímicas, 686, 687c
 - β -hemolíticos
 - grupo A, 641, 644f, 646
 - muestras faríngeas para técnicas de detección directa sin cultivo, 677
 - grupo B, 649, 651, 653r, 678
 - importancia clínica, 650, 653r
 - grupo C, 654
 - grupo D, 663
 - grupo F, 655
 - grupo G, 654
 - identificación
 - características fenotípicas, 687c
 - serológicas, 685
 - características generales, 641
 - caracterización preliminar, 680, 681c
 - clasificación, 641r
 - definidos, 172, 174f
 - descritos, 640
 - grupo anginoso, 662
 - identificación, 676, 679, Protocolo 13, Lámina en color 13, Lámina en color 13
 - coagulación, 685
 - extendidos directos teñidos con Gram, 676
 - hemólisis en agar sangre, 676, 677f, 677r
 - hidrólisis de hipurato de sodio, 682
 - medios de cultivo, 676

- - presuntiva, 680, 683c, 1388, 1408, 1412, Protocolo 1
- - - comercial, 685, Protocolo 13
- - - criterios fenotípicos, 680, 683c
- - producción de pigmento, 682
- - prueba de bilis-escolina, 684, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
- - prueba CAM, 682
- - prueba de catalasa, 679
- - prueba LAP, 684
- - prueba de precipitinas capilares, 685
- - prueba PYR, 684, Protocolo 1, *Lámina en color* 13
- - prueba de solubilidad en bilis, 684, Protocolo 1
- - prueba de tolerancia a la sal, 684, Protocolo 3, *Lámina en color* 13
- - sensibilidad al SXT, 682, 688c, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
- - sensibilidad a la bacitracina, 680, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
- - sensibilidad a optoquina, 684, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
- - sistemas comerciales, 706
- - otros, 666
- - reconocimiento, 680, 681c
- - *S. agalactiae*, 649, 653r
- - viridans, 660
- - aislados en animales, 666
- - diagrama de flujo, 691f
- - - grupo *S. anginosus*, 688, 692c
- - - grupo *S. bovis*, 693, 694c
- - - grupo *S. mitis*, 686, 689c
- - - grupo *S. mutans*, 686, 689c
- - - grupo *S. salivaris*, 686, 689c
- - - diferenciación fenotípica, 688c
- - - identificación, 686, 688c, 689c, 691f, 692c, 694c
- - tratamiento antibiótico, resistencia, 968
- Estreptogramina(s), especies de *Staphylococcus* resistentes, 960
- Estreptolisina O, factor de virulencia estreptocócico, 645
- Estreptolisina S, factor de virulencia estreptocócico, 645
- Estreptomyceto, 823
- Estrongiloidiasis, 1225f, 1226, 1237f
- Estudios de microbiología ambiental, especies de *Legionella*, 534, 536c
- Etest, evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 946, 957f, 958r, Protocolo 17
- Eubacterium*, especies, 886, 887c, 888c
- Eucariote, definición, 1105
- Ewingella*, especies
- *E. americana*, 264c
- reacciones bioquímicas, 230c
- más nuevas, características diferenciadoras, 263, 266c
- Examen en campo oscuro, examen microscópico de muestras, 18c
- Examen de oxiuros, preparado con cinta de celulosa, 1473
- Exiguobacterium*, especies, 790, 791c, 792
- Exophiala jeikei*, 1163, 1163f
- Exotoxina(s)
- bacterianas, 199
- factores de virulencia, 199
- pirógenas estreptocócicas, factor de virulencia del estreptococo, 645
- Exposición ocupacional a sangre, manejo, 1296, 1299r
- Exposición a sangre por pinchazos de aguja, riesgos ulteriores de contraer infecciones virales de transmisión sanguínea, 52, 55c
- Exserohilum*, especies, 1159, 1161f
- Extendidos de heces, técnica de tinción tricrómica, 1468
- F**
- Facklamia*, especies, 675
- identificación, 706, 707c
- Factor cordón, 183, 183f
- Factor de opacidad, como factor de virulencia del estreptococo, 644
- Factores de crecimiento, crecimiento y metabolismo bacteriano, 190
- Factores R, 199
- Factores de virulencia, 5, 5c
- microorganismos, 197
- Fahifomicosis, 1105, 1166r
- agentes, 1157
- Familia(s), definida(s), 163
- Faringitis, 70
- aguda, especies de *Haemophilus* y, 411r
- *Arcanobacterium haemolyticum*, 71
- causas, infecciosas, 71
- cultivo, 72, 72f
- estreptocócica, 70, 646
- gonocócica, 71
- infecciones virales y, 1311c
- viral, 70
- Fármaco(s), parasitosis, 1264c, 1266
- Fasciola hepatica*, 1234, 1237f, 1238r
- Fascioliasis, 1238f, 1238r
- Fasciolopsiasis, 1238r
- Fasciolopsis buski*, 1234, 1238r
- Fenilalanina desaminasa, 1401, 1401f
- Fermentación
- ácido mixta, 193
- ácido propiónico, 194
- anaerobia, piruvato formado, destino, 193, 195f
- bacteriana, 189, 191, 192f
- butanediol, 194
- butanol, 194
- definición, 206
- glucosa
- - ausencia de evidencia, identificación de no fermentadores, 297
- - diferenciación de micrococcos y estafilococos, 612
- heteroláctica, 193
- hidrato de carbono, detección
- - medios de cultivo, 209f, 210, 210r, 211r
- - principios bioquímicos *Lámina en color* 6-1E, *Lámina en color* 6-4A-C, *Lámina en color* 7-1A, 209f, 210, 211r
- homoláctica, 193
- manitol, identificación de *S. aureus*, 616
- principios básicos, 206, 207f
- utilización de hidratos de carbono, 206
- Fermentadores oxidasa-positivos, 387
- Fiálido(s), 1107r, 1123, 1125f
- Fibrosis quística, neumonía, 75
- Ficomicosis, definida, 1105
- Fiebre
- dengue, manifestaciones clínicas, 1291
- entérica, causas, 79c
- por mordedura de rata, 1097
- de Oroya, *B. bacilliformis* y, 476
- Pontiac, 525, 525c
- purpúrica brasileña, especies de *Haemophilus* y, 411r, 419
- recurrente
- - características, 1085, 1085c
- diagnóstico de laboratorio, 1086
- - especies de *Borrelia* y, 1085
- - presentación clínica, 1086
- recurrente, especies de *Borrelia* y, 1086
- reumática aguda, estreptococos y, 647
- tifoidea, diagnóstico, cultivo y serología, 10, 10f
- de las trincheras, *B. quintana* y, 477
- Fijador de Schaudinn, fórmulas, 1475
- Filariasis, 1248, 1251r, 1252f
- Filoviridae*, especies, descritas, 1279c
- Filovirus, manifestaciones clínicas, 1290
- Fimbrias (pili)
- bacterianas, 184
- *Moraxella catarrhalis*, 558r
- *N. gonorrhoeae*, 547r
- *N. meningitidis*, 545r
- Fimbrilina, 185
- Flagelado(s), intestinales, 1210, 1211f, 1215f
- Flagelina, 185
- Flagelos
- bacterianos, 184, 185f
- disposiciones, 301
- morfología, identificación de no fermentadores, 301
- peritricosos, microorganismos móviles, 324
- polares, microorganismos móviles, 301
- Flaviviridae*, especies, descritas, 1283c
- Flavobacteriaceae, 329, 329r, 330c
- Flavobacterias, 172r
- Flavobacterium*, especies, 293c
- Fleming, A., descubrimiento de la penicilina, 903, 903f
- Flexispira rappini*, 379c, 383, 383c
- "Flexispira", características, 374c
- Flora
- colonizante, 4
- cutánea, contaminación, recolección de hemocultivos, 98, 99f
- endógena, aparato respiratorio superior, 67
- Fluorescencia-desnitrificación, 1405
- Fluoroquinolonas
- especies de *Staphylococcus*, resistentes, 962
- *S. pyogenes* resistente, 968
- Foliculitis, *S. aureus* y, 603r
- Folículos pilosos, 1372
- Fonsecaea pedrosoi*, 1162
- Forúnculo(s), *S. aureus* y, 603r
- Fosfatidilinositol, manósidos, 183
- Fosfato, producción, identificación de *S. epidermidis*, 618
- Fosforilación a nivel de sustrato, 193
- Fotocromógeno(s), 1045
- Fotorreactividad, micobacterias, evaluación, 1437
- Fragmentos de uñas, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
- Francisella tularensis*, 467, Véase también *Tularemia*
- aislamiento, 469, 471c
- características del cultivo, 470, 473c
- descrita, 468
- identificación, características bioquímicas, 473c
- reseña, 468
- taxonomía, 468
- virulencia, 468
- Frasco Mycotrim Triphasic, 1000
- Frotis
- ácido-alcohol resistente, recuperación de micobacterias, 1031
- de heces, técnica de tinción tricrómica, 1468
- recolección de muestras, 13
- sanguíneos
- - gota fina, 1469
- - gota gruesa, 1470
- Fructosiltransferasa, 184
- FTA-ABS, Véase *Prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS)*
- Furazolidona, sensibilidad, diferenciación de micrococcos y estafilococos, 613, Protocolo 12, *Lámina en color* 12
- Fusarium*, especies, grupos de conidios producidos, 1132, 1133f

- G**
 Gabinetes de seguridad biológica, comparación, 52c, 53f
 Gangrena gaseosa, clostridios, 889, 892
 Garantía de calidad
 - evaluación de actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 932
 - laboratorio de microbiología, 58
Gardnerella, especies, *G. vaginalis*, 795, 798c
 - aislamiento, 796, 797c
 - descritas, 795
 - factores de virulencia, 796
 - identificación, 797, 798c
 - importancia clínica, 796
 - morfología celular, 793
 - sensibilidad a los antibióticos, 799
 - taxonomía, 795
 Garrapata(s), *C. Lámina en color A1-B, Lámina en color A-2A-D,E-H*, 1363, 1363c, 1366c, 1366f, 1370c. Véase también *Ixodida, especies*
 - descritas, 1363
 - distribución geográfica, 1365, 1365c
 - duras
 - - características diagnósticas, 1370c
 - - identificación, C, 1366, 1366f
 - identificación, C, 1366, 1366f
 - *Ixodes ricinus*, 1086
 - rangos geográficos, 1365
 Gastroenteritis
 - *B. cereus* y, 741
 - *E. coli* y, 225, 230c
 - evaluación, consideraciones epidemiológicas, 80c, 81
 - *V. cholerae* y, fisiopatología, 389, 389r, 390f
 - viral, manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
 Gastroenteritis viral, manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
Gemella, especies, 673
 - identificación, 701, 704c
 Gen-Probe AMTD, identificación de micobacterias, 1059
 Géneros, definidos, 163
 Genitales, flora comensal y agentes patológicos, 85c
 Genoma, 172
Giardia, especies, *G. Lamblia*, 1210, 1211f, 1212r
 - ciclo vital, 1210, 1211f
 - detección de antígenos, 1212
 Giardiasis, 1212r
 Gingivitis, 71
 Gingivostomatitis ulcerosa, necrosante, 71
Gliocladium, especies, grupos de conidios producidos, 1133, 1134f
Globicatella, especies, 675
 - identificación, 703, 706, 707c
 Glomerulonefritis aguda, estreptococos y, 647
 Glucocálix, 184
 Glucosa, fermentación
 - diferenciación de micrococcos y estafilococos, 612
 - falta de pruebas, identificación de no fermentadores
 Glucosiltransferasa(s), 184
Gnathostoma spinigerum, 1260
 Gonorrea, antecedentes históricos, 540
Gordonia, especies, 822
 Gram, Véase *Tinción(es)*, de *Gram*
Granulicatella, especies, 671
 - identificación, 693, 698c
 Gránulo(s), metacromático(s), 176
 Granuloma, 7
 - inguinal, 87
 Gránulos metacromáticos, 176
 Grupo acidovorans de commonadaceae, 315
 Grupo alcaligenes de *Pseudomonas*, 304, 307c
 Grupo amarillo de agrobacterias, 323
 Grupo de bacilos 1 de Gilardi, 335c, 336
 Grupo *facilis-delafieldii* de Comamonadaceae, 316
 Grupo nocardioforme, 819
 Grupo rRNA de caulobacterias, 316
 Grupo rRNA I, 301, 301r, 303c, 304r, 305c, 305r, Véase también *Pseudomonas, especies*
 Grupo rRNA II, 306, 308c, 309r, 312c, 313r, 314c
 Grupo rRNA de xantomonadas, 317, 317c
 Grupo Stutzeri de *Pseudomonas*, 304, 304c
 Grupos bacterianos de los CDC
 - EF-4A, 456, 457c
 - EF-4B, 456, 457c
 - grupo 1c, 323
 - grupo 4, 792, 794c
 - grupo EF-4b, 336
 - grupo EO-5, 337c, 338
 - grupo NO-1, 337c, 338
 - grupo NO-2, 337c, 338
 - grupo WO-1, 323
 - grupos O-1, O-2 y O-3, 323
 - identificación, características bioquímicas, 466c
 - de oxidantes eugónicos (EO) de los CDC, 334, 334c, 336
- H**
 Hábitat, bacterias anaerobias, 839, 839r
Haemophilus, especies, 409
 - β -lactamasas, inducción, 952
 - enfermedades infecciosas causadas por, 411r, 415, 416
 - *H. aphrophilus*, infecciones causadas, 421
 - *H. ducreyi*
 - - diagnóstico de laboratorio, 427, 427f
 - - infecciones causadas por, 421
 - - sensibilidad a los antibióticos, 429
 - *H. influenzae*, 410, 410r, 411r, 412f, 413r
 - - bacteriemia debida a, 411r, 418
 - - bacteriemia posparto debida a, 411r, 419
 - - biotipificación, 426, 426r
 - - bronquitis debida a, 411r, 417
 - - celulitis debida a, 420
 - - conjuntivitis debida a, 411r, 419
 - - endocarditis debida a, 411r, 418
 - - epiglotitis debida a, 411r, 416
 - - EPOC debida a, 417
 - - factores de virulencia, 413r
 - - fiebre purpúrica brasilera debida a, 411r, 419
 - - infecciones causadas por, 411r, 415, 416
 - - infecciones oculares debidas a, 411r, 419
 - - infecciones del tracto genital debidas a, 411r, 419
 - - meningitis debida a, 411r, 415, 416
 - - neumonía debida a, 411r, 418
 - - otitis media debida a, 411r, 416
 - - sensibilidad a los antibióticos, 428
 - - sepsis neonatal debida a, 411r, 418
 - - serotipificación, 425
 - - sinusitis debida a, 411r, 417
 - - uretritis debida a, 411r, 419
 - *H. influenzae* tipo b, vacunas, 410, 412, 415r
 - *H. parainfluenzae*
 - - biotipificación, 426, 426r
 - - infecciones causadas por, 420
 - *H. paraphrophilus*, infecciones causadas por, 421
 - infecciones causadas por
 - - diagnóstico de laboratorio, 422, 424c, 426r, 427f
 - - - agar para aislamiento de *Haemophilus*, 423
 - - - agar chocolate, 422
 - - - características bioquímicas, 423, 424c
 - - - características de identificación, 419, 420
 - - - cultivo, 422
 - - - detección de antígeno capsular tipo b, 422
 - - - métodos bioquímicos y equipos, 427, 433c
 - - tinción de Gram para identificación, 423, 424c, 426r, Protocolo 9, *Lámina en color 9*
 - métodos de evaluación, 955c
 - miembros, 409, 410, 410r
 - sensibilidad a los antibióticos, 428
 - taxonomía, 408, 409r, 410c
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 962
 - - cefalosporinas, 963
 - - cloranfenicol, 963
 - - penicilina, 962
 - - timetoprim-sulfametoxazol, 963
Hafnia, especies, 255
 - características de identificación, 226c
 - *H. alvei*, 255
 - reacciones bioquímicas, 230c
 Halomonadaceae, 321, 321c
Halomonas venusta, 321, 321c
Hansenula anomala, 1176, 1176f
 Hantavirus, manifestaciones clínicas, 1291, 1291c
 HBV, Véase *Hepatitis B*
 Heces, examen directo, diagnóstico de enfermedad infecciosa, 23c
Helcococcus, especies, 672
 - identificación, 693, 697, 701c
Helicobacter, especies, 379c, 382, 383c
 - características, 374c
 - *H. cinaedi*, 379c, 383, 383c
 - *H. fennelliae*, 379c, 383, 383c
 - *H. heilmannii*, 383, 383c
 - *H. pylori*, 379c, 383, 383c
 - - antecedentes históricos, 373
 - - cultivo y aislamiento, 385, 385c
 - - identificación, 385
 - - - detección de antígenos, 387
 - - - método de la ureasa, 386
 - - - métodos serológicos, 387
 - - - precisión de las pruebas invasivas y no invasivas, 386
 - - - prueba de ureasa en biopsia, 386
 - - recuperación de muestras, 385
 - no humanas, 384
 Hemaglutinación
 - detección e identificación provisional de infecciones virales, 1324, 1325, 1333f, Protocolo 23
 - pasiva
 - - identificación de *S. aureus*, 615
 - - prueba, 115
 Hemaglutinina(s), *Moraxella catarrhalis*, 558r
 Hemocultivos
 - diagnóstico de tuberculosis, 1022
 - recolección, infecciones de transmisión sanguínea, 98, 99f, 101r
 - - medios, 100, 101r
 - - número de cultivos, 100
 - - oportunidad, 100
 - - pautas, 101r
 - sistemas de procesamiento, infecciones de transmisión sanguínea, 101
 - - estudios comparativos, 103
 - - sistema de cultivo TREK ESP II, 103
 - - sistema de hemocultivo BacT/Alert, 102
 - - sistema de hemocultivo BACTEC 9240/9120, 102
 - - sistema de hemocultivo BBL Septi-Chek, 101
 - - sistema de hemocultivo de lisis-centrifugación, 101
 - - sistema de señales de oxidos, 101
 - - Sistema Wampole Isostat/Isolator Microbial, 101

- sistemas de hemocultivo automatizados y computarizados, 102
- sistemas de hemocultivo manuales, 101
- Hemoflagelado(s), 1238, 1245f, 1246r, 1247f, 1248r
- Hemolisina II, 741
- Hemolisina III, 741
- Hemolisina(s), de *S. aureus*, 601r
- Hemólisis, identificación, 677, 677r
- Hendra, 1288
- hepatitis, 1308, 1308c, Véase también *Hepatitis*
- Hepadnaviridae*, especies de, descritas, 1287c
- Hepatitis*
 - A
 - diagnóstico serológico, 1343
 - manifestaciones clínicas, 1307, 1308c
 - B, 1287c, 1287r
 - detección molecular, 1338
 - diagnóstico serológico, 1341, 1343f
 - manifestaciones clínicas, 1307, 1308c
 - C
 - detección molecular, 1337
 - diagnóstico serológico, 1343
 - manifestaciones clínicas, 1307, 1308c
 - causas, 1308, 1308c
 - D, manifestaciones clínicas, 1308c, 1309
 - E, manifestaciones clínicas, 1308c, 1309
 - infecciones virales y, 1312c
 - manifestaciones clínicas, 1305, 1305c
- Hepatoesplenomegalia, 1194
- Herbaspirillum*, especies, 320, 320c
- Herpesviridae*, especies, descritas, 1285c
- Heteroresistencia, 605
- HHV-6, Véase Virus herpes humano 6 (HHV-6)
- HHV-7, Véase Virus herpes humano 7 (HHV-7)
- HHV-8, Véase Virus herpes humano 8 (HHV-8)
- Hialofomicosis, 1105, 1121, 1137r
- Hialohifomicetos, conidios producidos en forma aislada, 1134, 1134f, 1137r
- Hialuronidasa
 - factor de virulencia del estreptococo, 643, 645
 - de *S. pneumoniae*, 656
- Hibridación, 136, 137f
 - DNA-DNA, 163
 - identificación de micobacterias, 1058
 - in situ
 - cromógena, 136
 - por fluorescencia, 132, 136, 137f
 - identificación de micobacterias, 1059
 - inversa
 - análisis posamplificación, 144, 144f
 - identificación de micobacterias, 1061, 1061f
- Hidatidosis, 1261, 1262f
- Hidradenitis supurada, *S. aureus* y, 603r
- Hidrato de carbono
 - CTA, convencionales, identificación de especies de *Neisseria*, 565
 - metabolismo oxidativo, 295
- Hidrólisis
 - esculina, identificación de no fermentadores, 300, Protocolo 7, Lámina en color 7
 - Tween 80, identificación de micobacterias, 1037, Protocolo 19, Lámina en color 19
 - Tween-80, 1447, Protocolo 19, Lámina en color 19
 - de urea, identificación de no fermentadores, 299, Protocolo 6, Lámina en color 7
- Hidróxido de potasio (KOH), examen microscópico de muestras, 18c
- Hifas, 1107r
 - especies no productoras, 1170, 1173f, 1174f, 1175r
 - especies productoras, 1170, 1170f, 1173r
- Himenolepiasis, 1233r
- Hipoxantina, hidrólisis, 1418
- Hipurato de sodio, hidrólisis, identificación de estreptococos, 682
- Hirudo medicinales*, especies de *Aeromonas*, 398
- Hisopado(s)
 - pus aspirado versus, 11, 11f
 - rectal, medio, 215, 216r
- Histoplasma*, especies, *H. capsulatum*, 1148, 1151f, 1153r
 - descrito, 1148
 - diagnóstico con el uso de técnicas sin cultivo, 1151, 1153r
 - presentación de laboratorio, 1149, 1151f
- Histoplasmosis, 1148, 1151f, 1153r
- HIV, sistema de clasificación revisado, 1295, 1296c, 1297c
- Hongos, 1157
 - cultivo, recomendaciones de la American Thoracic Society para la recolección de muestras, 1109, 1110c, 1111r
 - dematiáceos, 1157
 - descripción, 3
 - dimorfos, 1143, 1145
 - descritos, 1148
 - observaciones preliminares sugestivas, 1187
 - filamentosos dematiáceos, observaciones preliminares sugestivas, 1188
 - filamentosos hialinos, 1121
 - características de las colonias, 1129
 - conidios en cadenas producidos, 1129, 1129f, 1132f
 - identificación preliminar, 38
 - de importancia médica, identificación, 1117c
 - observaciones preliminares de identificación presuntiva, 1185, 1186
 - observaciones preliminares sugestivas, sobre la base del examen microscópico directo de material de muestras clínicas, 1118c
 - oportunistas, 1104
 - terminología relacionada, 1107r
 - conidios en grupos producidos, 1132, 1133f
 - de crecimiento rápido, 1129
 - descritos, 1121
 - diagnóstico, técnicas sin cultivo, 1126, 1130r
 - especies de *Aspergillus*, 1121, Véase también *Aspergillus*, especies
 - histopatología, 1125, 1128f, 1130r
 - observaciones preliminares sugestivas, 1186
- HPLC. Véase *Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)*
- HPLC-FL. Véase *Cromatografía líquida de alto rendimiento, por fluorescencia (HPLC-FL)*
- HPV. Véase *Virus del papiloma humano (HPV)*
- HSV. Véase *Virus herpes simple (HSV)*
- Huella genética, identificación de micobacterias, 1063
- Hueso(s), infecciones, 89
- Huésped(es)
 - agentes infecciosos y, interacciones, 4, 4c
 - infectado, virulencia y, 6
- Hymenolepis*, especies, 1232, 1233f, 1233r
 - *H. diminuta*, 1232, 1233f
- I**
- IATA. Véase *International Air Transport Association (Asociación de transporte aéreo internacional) (IATA)*
- ID32 Staph. identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 624
- Identificación de laboratorio, optimización, enfoques, 42c
- IgM. Véase *Inmunoglobulina(s)*
- Ignavigranum*, especies, 675
 - identificación, 706, 707c
- Impétigo, *S. aureus* y, 603r, 646
- Inclusión, *C. trachomatis*, detección morfológica, 1347
- Incubación, recuperación de micobacterias, 1031, 1032f
- Indol, producción, identificación de enterobacterias, 216, 217f, Protocolo 1
- Infección por duelas (*Fasciola hepatica*), 1234
- Infección por especies de *Salmonella*, 244, 245r
- Infección de huesos y articulaciones, 89
- Infección iatrogénica, definición, 6r
- Infección intravascular, 96
- Infección oportunista, definición, 6r
- Infección subclínica, definición, 6r
- Infección por virus herpes simple (HSV), 72, 86, 1285c
 - detección inmunológica, 1336
 - detección molecular, 1342
 - diagnóstico serológico, 1341
 - manifestaciones clínicas, 1299
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), 1283c
 - detección molecular, 1336
 - diagnóstico serológico, 1340, 1340c, 1341f
 - epidemia global, 1294, 1295c, 1298c, 1299r, 1300c
 - *M. tuberculosis*, impacto, 1018
 - secuencia de DNA, 145, 145f
 - sistema de clasificación revisado entre adolescentes y adultos positivos, 1295, 1296c, 1297c
 - tipo 1 (HIV-1)
 - manifestaciones clínicas, 1295, 1295c, 1297
 - procedimientos de Western blot, 118, 119f
 - tratamiento, apoyo de laboratorio, 1300c
 - úlceras genitales y, interacciones, 87
 - vigilancia, definiciones de casos revisadas, 1298c
- Infecciones del aparato genital, 69c, 85c, 86, 90f
 - causas, 85c, 86
 - complicaciones sistémicas, 87
 - diagnóstico, 87, 90f
 - enfermedades de transmisión sexual, 86
 - especies de *Haemophilus* y, 411r, 418
 - superiores, infecciones, 87
 - transmisión, no sexual, 86
- Infecciones asociadas con catéteres de diálisis peritoneal, *S. epidermidis* y, 608r
- Infecciones bacterianas, relacionadas con el sitio, diagnóstico, 68c
- Infecciones por bolas micóticas, 1130r
- Infecciones de catéteres venosos, *S. epidermidis* y, 607r
- Infecciones cutáneas, *S. epidermidis* y, 608r
- Infecciones dentales, 73
- Infecciones por espiroquetas, 1076
 - especies de *Borrelia*, 1085
 - especies de *Leptospira*, 1094
 - especies de *Treponema*, 1077
 - *Spirillum minor*, 1097
 - taxonomía, 1076, 1076c
- Infecciones hemáticas, 69c, 96
 - bacteriemia, 96, 97c
 - consideraciones especiales, 103
 - intravascular, 96
 - patogenicia, 96, 97c
 - presentación clínica, 95
 - recolección de hemocultivos, 98, 99f, 101r, Véase también *Hemocultivos, recolección, infecciones relacionadas con la sangre*
- Infecciones de heridas, 69c, 94
 - diagnóstico, 92
 - presentación clínica, 94
 - *S. aureus* y, 603r
- Infecciones hospitalarias
 - definición, 6r
 - especies de *Bacillus* y, 742
- Infecciones humanas, bacterias anaerobias y, 840, 847f, 848c, 848r

Infecciones de injertos vasculares, *S. epidermidis* y, 607r

Infecciones por micoplasmas

- hemotróficas, animales, diagnóstico y tratamiento, 1007
- sensibilidad a los antibióticos, 1004
- tratamiento, 1004

Infecciones micóticas

- de asiento profundo, 1104
- categorización clínica, 1104
- diagnóstico, enfoque de laboratorio, 1106
- examen directo, 1110, 1113f, 1113r, 1114r, 1116c
- medios de cultivo, selección e inoculación, 1111, 1115f
- preparación para estudio, 1110, 1111r, 1113f, 1113r, 1114r
- procesamiento de muestras, 1110, 1112c
- rechazo de muestras, criterios, 1111r
- recolección y transporte de muestras, 1109, 1110c, 1111r
- pacientes en riesgo, 1104
- signos y síntomas, 1104, 1105c
- superficial, 1104

Infecciones musculoesqueléticas, especies de *Bacillus* y, 743

Infecciones oculares, 69c, 95

- conjuntivitis, 95
- cultivos, 95
- diagnóstico, 95
- endoftalmítis, 95
- especies de *Bacillus* y, 742
- especies de *Haemophilus* y, 410r, 419
- examen microscópico, 95
- presentación clínica, 94
- queratitis, 95
- recolección de muestras, 96
- *S. epidermidis* y, 607r
- uveítis, 95
- por "oxiuros", 1223
- por protozoos titulares, 1253, 1255f, 1256f, 1256r

Infecciones en pediatría, *S. epidermidis* y, 608r

Infecciones respiratorias, 67

- altas, 67, 69c, 72f
- angina Vincent
- epiglotitis, 73
- faringitis, 70
- infecciones dentales, 73
- laringitis, 73
- nasofaríngeas, 72
- otitis media, 73
- sinusitis, 73
- bajas, 69c, 73, 77r, 78c
- bronquiolitis, 74
- diagnóstico, recolección de muestras, 75
- neumonía, 74
- traqueobronquitis, 73
- diagnóstico, 68c
- pulmonares y *S. aureus*, 603r

Infecciones del sistema nervioso central (SNC), 69c, 90

- abceso encefálico, 92
 - de derivaciones de líquido cefalorraquídeo (LCR), *S. epidermidis* y, 607r
 - diagnóstico, 91, 92f
 - por cultivo, 92
 - detección de antígeno y ácido nucleico, 92
 - serológico, 93
 - técnicas microscópicas, 92
 - encefalitis, 91
 - meningitis, 91, 91c, 411c, 415, 416, 603r, 1171r, 1311c
 - recolección de muestras, 92, 93f
 - respuesta inflamatoria, evaluación, 92
- Infecciones de transmisión sexual, 86
- cervicitis, 86, 88
 - enfermedad ulcerosa genital, 86

- HPV, 87

- HSV, 86

- infección por HIV, 87

- uretritis, 86, 88

- vaginitis, 86

- vaginosis, 87

- verrugas venéreas, 87

Infecciones del tubo digestivo, 77, 79c, 80c

- alto, 80

- recolección de muestras, 79

- síntomas clínicos, 80

- bajo, 69c, 77, 79c, 80c

- causas, 79, 80c

- recolección de muestras de heces, 79

- síntomas clínicos, 77, 79c

- diagnóstico, 68c

- "*Gastropirillum hominis*", 383c, 384

Infecciones del aparato urinario, 69c, 81, 81c, 82f, 83r, 84f

- diagnóstico, 68c

- factores del huésped, 81

- pruebas de cribado, 84

- recolección de muestras de orina, 81, 81c

- *S. epidermidis* y, 607r

- signos y síntomas, 68c, 80

Infecciones virales. Véase también *Virus*

- aislamiento, cultivo, 1316

- clasificación clínica, 1309, 1311c

- detección, 1323

- diagnóstico, 1304, 1312

- aislados, identificación definitiva, 1331

- artificios, 1310, 1312

- aislamiento de virus en cultivo, 1316

- asociación celular, 1329

- cambios no inducidos por el virus, 1329

- cultivos celulares

- aspectos técnicos, 1320, 1322f, 1322r

- contaminación, 1318, 1321f

- inoculación e incubación, 1323, 1324f

- preparación y mantenimiento, 1316, 1324f

- selección, 1321

- detección de antígenos virales, 1329

- diferenciación bioquímica, 1329

- efecto citopático, 1323f, 1324, 1325c, 1326c, 1327f, Véase también *Efecto citopático, detección e identificación provisional de infecciones virales*

- hemadsorción, 1324, 1325, 1333f, Protocolo 23

- hemaglutinación, 1324, 1325, 1333f, Protocolo 23

- métodos, 1313c

- microscopía electrónica, 1329

- microscopía óptica, 1329, Protocolo 23

- muestras

- almacenamiento, 1312, 1315, 1315c, 1316

- recolección, 1312, 1315, 1315c, 1316

- tipos, 1315c

- transporte, 1316

- diagnóstico serológico, 1337, 1340, 1340f, 1345c

- anticuerpos contra-IgM, 1345

- CMV, 1344

- coronavirus SARS, 1345

- EBV, 1342, 1343f

- HAV, 1344

- HBV, 1342, 1343f

- HCV, 1344

- HIV, 1340, 1340c, 1341f

- HSV, 1342

- infecciones por parvovirus, 1344

- pruebas de sensibilidad a los antivirales, 1345

- rubéola, 1345

- virus del Nilo Occidental, 1345

- por VZV, Véase *Virus varicela-zoster* (VZV)

- especies de *Anaplasma*, 1351, 1351c

- especies de *Chlamydia* y, 1346, 1348

- especies de *Coxiella*, 1349

- especies de *Ehrlichia*, 1351, 1351c

- especies de *Rickettsia*, 1349

- manifestaciones clínicas, 1277, 1283

- nomenclatura relacionada, 1274, 1274r, 1275f, 1276f, 1278c

- síndromes clínicos asociados, 1311c

- taxonomía relacionada, 1274, 1274r, 1275f, 1276f, 1278c

Infectividad, definida, 195

Inflamación, 6

- atópica, 7

- granulomatosa, 7

- linfocítica, 7

- supurada aguda, 7

- tipos, 7

Informe, resultados de cultivos de microbiología, 43, 43c

Inhibición del crecimiento de la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (T2H), identificación de micobacterias, 1039, Protocolo 19. *Lámina en color* 19

- inhibición, 1441

Inhibidores de la β -lactamasa, 917

Immunidad celular

- adaptativa, 7

Immunidad humoral

- adaptativa, 8

- innata, 6

Immunodepresión e infecciones por *Bacillus*, 742

Immunodepresión y neumonía, 75

Immunoelectroforesis a contracorriente, 112

Immunoensayo(s)

- definición, 117

- enzimático, detección de anticuerpos, 117, 117f, 119f

- en fase sólida, métodos, 117, 117f, 119f, 121f, 122f

- métodos de captura de anticuerpos EIA, 120, 121f

- métodos de detección de anticuerpos EIA, 117f, 118, 119f

Immunofluorescencia

- descrita, 123

- directa (IFD), 123, 123f, 124f

- examen de especies de *Legionella*, 530

- indirecta (IFI), 123, 124f

- técnicas, 123, 123f

- detección de anticuerpos, 123, 124f, 125f

- detección de antígenos, 123, 123f, 124f

Immunoglobulina(s)

- clases, 110, 111f

- definición, 110

- IgM, detección, método de captura de anticuerpos EIA, 120, 121f

Inóculo

- evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 932

- tratamiento antibiótico, 920f, 921

Inquilinus limosus, 312c, 315

Insectos, 1373

- chinches, 1364

- reduvídeas (vinchuca), 1364r

- moscas, 1373

- mosquitos, 1374

- piojos, 1375

- pulgas, 1375

Intercambio genético, bacterias, 186, 187f

Intermedilina, 662

Internalina, 198

- factor de virulencia para *L. monocytogenes*, 730

International Air Transport Association
(Asociación de transporte aéreo internacional) (IATS), 56
Intoxicación alimentaria estafilocócica, *S. aureus* y, 604r
Intoxicación alimentaria, estafilocócica, *S. aureus* y, 604r
Intoxicación, alimenticia, *S. aureus* y, 604r
Iodamoeba bütschlii, 1209
Isospora belli, 1218
- ciclo vital, 1216f
Isosporiasis, 1218
Ivermectina, infecciones parasitarias, 1264c
Ixodida, especies, 1363, Véase también

Garrapata(s)
- características diagnósticas, 1370c
- *I. cookei*
- - distribución geográfica, 1366, 1366c
- - identificación, 1368, 1371c
- *I. marxi*
- - distribución geográfica, 1365, 1366c
- - identificación, 1368, 1371c
- *I. scopularis*
- - distribución geográfica, 1365, 1366c
- - identificación, 1366, 1366f, 1368f, 1370c
- relación con la enfermedad, 1365

K

Kala-azar, 1246r
Kerstersia, especies, 325c, 328
Kingella, especies, 449
- características de los cultivos, 445c, 449
- identificación, 445, 450
- - características bioquímicas, 448c
- importancia clínica, 449
- sensibilidad a los antibióticos, 451
- taxonomía, 449
Klebsiella, especies
- cambios taxonómicos, 250, 252c
- características de identificación, 226c
- descritas, 250, 253
- especies, diferenciación, 252c
- Grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia*, 207, 208f, 218
- *K. granulomatis*, 250
- *K. oxytoca*, reacciones bioquímicas, 230c
- *K. ozaenae*, 250
- *K. pneumoniae*, 250
- - reacciones bioquímicas, 230c
- *K. rhinoscleromatis*, 250
Klebsiellae (tribu), 222c, 250, 251c, 252c, 253c, 256c
- características de identificación, 226c
- especies, diferenciación, 251c
Kluyvera, especies
- más nuevas, 264c
- - características de diferenciación, 263, 266c
- reacciones bioquímicas, 230c
Koneman, E.W., 2
Koserella trabulsi, características de diferenciación, 268c, 269

L

Laboratorio de microbiología
- acreditación e inspección, 46
- aseguramiento de calidad, 58
- aspectos administrativos, 45
- bioterrorismo, 58, 59c, 60c
- calificaciones personales, 47
- confidencialidad en relación con los pacientes, 47
- control de calidad, 59, Véase también *Control de calidad, laboratorio de microbiología*
- evaluación de eficiencia, 47
- laboratorios de referencia o derivación, 47
- manejo de riesgos, 47

- manuales de procedimiento, 47
- papel, 1
- regulación estatal, 45, 45r, 46c
- requerimientos de espacio, 47
- seguridad, 47, Véase también *Seguridad, laboratorio de microbiología*

Lactobacillus, especies, 799
- aislamiento, 800
- características, 730c
- epidemiología, 799
- identificación, 800, 885
- importancia clínica, 799
- taxonomía, 799

Lactococcus, especies, 675
- identificación, 706, 708c
Lactofenol, 21c
Lactrodectus mactans, 1372
Laribacter hongkongensis, 320c, 323
Laringitis, 73
- estridulosa, 1311c

Laringotraqueobronquitis, especies de
Haemophilus y, 411r
Larva migrans
- cutánea, 1259
- visceral, 1258

Larvas, de moscas, y miasis, 1373
Lautropia mirabilis, 315
Lavado broncoalveolar, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio, 22c, 76
Lavado rectal, medio, 215, 216r

LCR, Véase *Líquido cefalorraquídeo (LCR)*
LE, Véase *Leucocito esterase (LE)*
LeClercia, especies, *L. adecarboxylata*, 264c
- reacciones bioquímicas, 232c
LeClercia, especies, más nuevas, características diferenciadoras, 263, 267c
Legioneláceas, en medioambiente, 527
Legionella, especies, 523, Véase también

Legionelosis
- ácidos grasos celulares, 533c, 534c
- aislamiento
- - aspirados de líquidos pleurales y transtraqueales, 531
- - del esputo y otras muestras contaminadas, 531
- - hemocultivos, 532
- - muestras ambientales, 534
- - muestras clínicas, 531, 531r
- tejidos, 531
- características, 524, 524c, 532, 533c
- diagnóstico molecular, 534
- estudios de microbiología ambiental, 534, 535c
- hábitats acuáticos elaborados por el hombre (artificiales), 527
- hábitats naturales, 527
- identificación, 532, 532c, 533c
- manifestaciones clínicas, 525, 525c
- medioambiente, 526
- prueba de IFA indirecta en suero, 532
- sensibilidad a los antibióticos, 531, 532
- taxonomía, 524, 524c
- tipificación, 535, 536c

Legionelosis, Véase también *Legionella*, especies
- aspectos ecológicos, 527
- brotes hospitalarios, 528
- diagnóstico de laboratorio, 529
- - muestras clínicas
- - - aislamiento de especies de *Legionella*, 531, 531r
- - - detección de antígeno en orina y líquidos corporales, 530
- - - detección molecular de ácidos nucleicos, 531, 531r, 533c, 534
- - - examen director, 530
- - - examen microscópico, 530
- - - procedimiento IFA, 530

- - - selección, recolección y transporte, 529
- epidemiología, 527
- espectro clínico, 525, 525c
- factores predisponentes, 526
- incidencia, 527
- patogenia, 526
- patología, 526
- tratamiento, 531, 532
- en viajeros, 528
Leifsonia, especies, 790, 791c
Leishmania, especies, 1244, 1246r
- ciclo vital, 1245f
- identificación de laboratorio, 1244
Leishmaniasis, 1194, 1244, 1245r, 1246r
- cutánea, 1244
- - primaria, 1246r
- diseminada, 1246r
Leminorella, especies
- más nuevas
- - características diferenciadoras, 265, 267c
- reacciones bioquímicas, 232c
Leptospira, especies, 1094
- descritas, 1094, 1094f, 1095c
- genomoespecies, 1095c
- leptospirosis debida, 1094
- serogrupos, 1095c
Leptospirosis, 1094
- causas, 1094
- diagnóstico de laboratorio, 1096
- epidemiología, 1094
- manifestaciones clínicas, 1095
Lesiones genitales, microscopia de campo oscuro, 1453
Leuconostoc, especies, 673
Levaduras
- negras, identificación de laboratorio, 1176, 1177f
- - definidas, 1106
- - descripción, 3
- - identificación de laboratorio, 1164, 1165
- - - preparados de agar harina de maíz, 1165, 1168f, 1168r, 1169f
- - - tubo germinal, 1164, 1165, 1165f, 1165r, 1168f
- - identificación, abreviada, 40c
- - no formadora de hifas, 1174, 1176f
- - observaciones preliminares sugestivas, 1190
- productoras de artroconidios, 1173r
Ley de transferibilidad y responsabilidad del seguro de salud de 1996, 47
Lincosamida
- especies de *Staphylococcus* resistentes, 960
- *S. pneumoniae* resistente, 964
Líneas celulares
- mantenimiento, procedimiento, 1322r
- orígenes, 1315, 1318c
Lípidos, definidos, 181
Lipoarabinomano, 183
Lipopolisacáridos, 182
- *Moraxella catarrhalis*, 558r
- *N. gonorrhoeae*, 547r
- *N. meningitidis*, 545r
Lipopolisacáridos (LPS), 181, 181f
Lipoproteínas de mureína, 181
Líquido cefalorraquídeo (LCR)
- examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c
- meningitis, 22c, 90
Líquidos corporales, detección de parásitos, 1201
Lisina, descarboxilación, identificación de enterobacterias, 218, Protocolo 6, *Lámina en color* 6
Lisostafina, sensibilidad, diferenciación de micrococcos y estafilococos, 612

- Listeria*, especies, 729
- características, 730c
 - *E. rhusiopathiae*
 - aislamiento, 738
 - identificación, 737
 - sensibilidad a los antibióticos, 738
 - identificación, 733, 734c
 - *L. monocytogenes*, 728
 - aislamiento, muestras clínicas, 733
 - epidemiología, 731
 - factores de virulencia, 730
 - identificación, 733, 734c
 - importancia clínica, 731
 - meningitis debida a, 90
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 968
 - métodos de evaluación, 956c
 - patogenicidad, 736
 - sensibilidad a los antibióticos, 736
 - taxonomía, 728, 729c, 729r
 - tratamiento, 736
- Listeriolisina O, 198
- factor de virulencia para *L. monocytogenes*, 730
- Listonella*, especies, 397
- Loxosceles reclusa*, 1372
- LPS, Véase *Lipopolisacárido (LPS)*
- LV-PVA, formulaciones, 1475
- ## M
- Macroconidio, 1107r, 1132, 1133f, 1140, 1143f
- con tabiques transversos, 1158, 1159f
 - con tabiques transversos y longitudinales, 1158, 1158f, 1159f
 - de transmisión aislada o a través de conidia-ción especial, 1159, 1161f
- Macrófido(s)
- especies de *Staphylococcus* resistentes, 960
 - *S. pneumoniae* resistente, 964
- Maduromiceto(s), 822, 822c
- Magnetosoma(s), composición, 176
- Malassezia furfur*, 1176
- Mannheimia*, especies, 437r, 444
- actualmente reconocido, 437r
 - identificación, características bioquímicas, 440c
 - *M. haemolytica*, 437r, 444
- Manósido(s), fosfatidilinositol, 183
- Massilia*, especies, 318, 319c
- Mastitis, *S. aureus* y, 603r
- Material peligroso, manipulación, precauciones de seguridad, 50
- Materiales infecciosos, limpieza de derrames, 53, 55
- Matriz en damero, identificación de enterobacterias, 271
- Matriz de glucano insoluble, 184
- Mebendazol, para infecciones parasitarias, 1264c
- Medio de transporte de Sutar, 14, 14r
- Medio(s) de cultivo
- de Barbnour-Stoenner-Kelly para cultivo de *B. burgdorferi*, 1091, 1092r
 - con base de agar, diagnóstico de tuberculosis, 1019
 - de Blazer, aislamiento de *C. jejuni*, 376c
 - diferenciales, cambios, 35r
 - Eh, 838
 - evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 930
 - evaluación de muestras, 26, 28c
 - libre de sangre para *Campylobacter* de Preston, aislamiento de *C. jejuni*, 376c
 - de Loeffler, 1416
 - monitorización, control de calidad, 61, 62c
 - recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 245, 246c, 248f
 - recuperación de enterobacterias *Lámina en color* 6-1C, *Lámina en color* 6-2A-D, *Lámina en color* 6-3 A-F, 210, 212c, 213c, 214r, 216c, 216r
 - medios de aislamiento selectivo *Lámina en color* 6-1C, *Lámina en color* 6-2A-D, *Lámina en color* 6-3A-F, 246c, 248f
 - medios de enriquecimiento, 215, 216c
 - sustancias químicas y compuestos, 212, 214r
 - selectivo de Butzler, aislamiento de *C. jejuni*, 376c
 - para viriones de Butzler, aislamiento de *C. jejuni*, 376c
- Medioambiente
- enfermedades infecciosas, 2
 - especies de *Legionella*, 526
 - virulencia y, 5, 6c, 6r
- Medios cromógenos, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c, 247, 248f
- Melarsoprol, para infecciones parasitarias, 1264c
- Melioidosis, 308, 308c, 309r
- Melissococcus*, especies, 671
- Membrana celular
- antibióticos activos, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
 - bacterias gramnegativas, componentes, 911f
 - enzimas activas reconocedoras de la penicilina, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
 - transporte de los agentes antibióticos, 906, 909f
- Membrana citoplasmática, células bacterianas, 176
- Membrana externa, 180
- Membrana nuclear, 173
- Meningitis, 91, 91c
- aséptica, infecciones virales y, 1311c
 - *Candida*, 1171r
 - causas, patógenos, 90
 - especies de *Haemophilus* y, 411r, 413, 416
 - LCR en pacientes, 91c, 92
 - *S. aureus* y, 603r
 - sepsis neonatal, especies de *Haemophilus* y, 411r
 - signos y síntomas, 90
- Mesosoma(s), 177
- Metabolismo, no fermentadores, 291, Véase también *No fermentador, metabolismo*
- Metanemovirus humano, 1288
- Metapneumovirus humano, 1288
- Methylobacterium*, especies, 321, 322c
- *M. mesophilicum*, 293c
- Metilobacterias, 321, 322c
- Método de tinción de Leifson, identificación de no fermentadores, 300, 300r, Protocolo 7.2
- Método de tinción de Ryu, identificación de no fermentadores, 300, Protocolo 7
- Métodos de amplificación de señales, 132, 135f
- DNA ramificado, 135
 - FISH, 132, 136, 137f
 - hibridación in situ, 136, 137f
 - Hybrid Capture, 134, 135f
 - identificación de micobacterias, 1058
 - sondas de ácidos nucleicos, 133
- Métodos inmunológicos, 112
- Metronidazol, infecciones parasitarias, 1265c
- Micelio, 1107r, 1108f
- aéreo, 1107r
 - de reproducción, 1107r
 - vegetativo, 1107r
- Micetoma
- agentes, 1160
 - causas, 822, 823c
- Micobacterias, 1016, Véase también *Mycobacterium, especies*
- aislamiento
 - cultivo de muestras, 1029, 1030c, 1031c, 1032f
 - frotiss ácido-alcohol resistentes, sensibilidad, 1031
 - GLC, 1032
 - HPLC, 1032
 - HPLC-FL, 1032
 - incubación, 1030, 1032f
 - medio de cultivo en caldo, 1032
 - medios de Cohen y Middlebrook, 1030
 - medios de cultivo, 1029, 1030c
 - medios de cultivo no selectivos, 1029
 - medios selectivos, 1029, 1030c
 - métodos rápidos, 1031
 - características diferenciales, 1038c
 - clasificación, 1042
 - reseña, 1042, 1043r
 - detección
 - BACTEC MYCO/F Lytic, 1035
 - sistema BACTEC AFB, 1036, Protocolo 9
 - sistema de detección manual, 1035
 - sistema de detección de micobacterias MB/BacT, 1034
 - sistema MGIT, 1033
 - sistema MGIT 960, 1034
 - sistema Septi-Chek AFB, 1035
 - sistemas de detección automatizados, 1032
 - diagnóstico, recuperación e identificación de tuberculosis, 1023, 1024f, 1025c, 1026c, 1028c, 1029c, 1030c, Véase también *Tuberculosis, diagnóstico de laboratorio, recuperación e identificación de micobacterias*
 - fotorreactividad, evaluación, 1437
 - identificación, 1042, 1044c
 - actividad de arilsulfatasa, 1037, 1040c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - actividad de catalasa, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - actividad de ureasa, 1037, 1038c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - acumulación de niacina, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - captación de hierro, 1039, Protocolo 19
 - crecimiento en agar de MacConkey, 1042, Protocolo 19
 - crecimiento en cloruro de sodio, 1042, Protocolo 19
 - hidrólisis de Tween 80, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - huellas genéticas, 1063
 - inhibición del crecimiento por T2H, 1039, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - métodos convencionales, 1036, 1040c, Protocolo 19
 - métodos moleculares, 1056, 1062f
 - análisis posamplificación, 1061, 1061f
 - ensayo para *M. tuberculosis* BD ProbeTec, 1060
 - ensayo para *M. tuberculosis* Abbott LCx, 1060
 - ensayos de PCR, 1060
 - Gen-Probe AMTD, 1059
 - hibridación in situ, 1059
 - hibridación inversa, 1061, 1061f
 - métodos de amplificación de ácidos nucleicos, 1059
 - métodos de amplificación de señales, 1058
 - prueba para *Mycobacterium tuberculosis* Roche Amplificor, 1060
 - secuenciación de DNA, 1062
 - sondas de ácidos nucleicos, 1058
 - pirazinamida, 1038, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
 - producción de pigmento, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19

- reducción de nitratos a nitritos, 1037, 1038c. Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- sondas de DNA, 1449
- tipificación de cepas, 1063
- identificación preliminar, 38
- *M. shimoidei*, 1054
- nomenclatura, 1040C
- reducción de nitratos, 1444, 1444f
- tinciones de fluorocromo, 25
- tolerancia al cloruro de sodio, 1446
- ureasa, 1448
- Micología, 1102
- terminología relacionada, 1105
- Micoplasma(s), 975
- aislamiento
- - medios de cultivo de rutina, 1000
- - seres humanos, 978r
- central, aislamiento, medio, 1427
- cultivo
- - medios, 993, Protocolo 18
- - medios de transporte, 993
- - muestras clínicas, 993, 996f, Protocolo 18
- - recolección de muestras, 994
- descritos, 976
- detección, tinción de Diene, 1423
- genitales
- - aislamiento e identificación, 997, 999f, 1427, Protocolo 18, *Lámina en color* 18
- - detección sin cultivo, 997
- - pruebas serológicas, 1003
- origen animal, infecciones humanas debidas a, 992
- taxonomía, 976, 976r, 978c, 978r
- Micosis
- extrapulmonar, signos, síntomas y agentes probables, 1106c
- pulmonares, signos y síntomas, 1105c
- Micro-ID, 278
- Microaerófilo, 837
- Microbact Staphylococcal 12S, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 626
- Micobacterium*, especies, 791c, 792
- Microbiología, introducción, 1
- Microbios, olores, 33, 35c
- Micrococcus*, especies, 610
- descritas, 595
- especies de *Staphylococcus* versus, 612, 613c, Protocolo 12, *Lámina en color* 12
- identificación, características fenotípicas, 627c, 629
- Microconidios, 1107r, 1132, 1140
- Micrómetro ocular, calibración, 1471, 1472f
- Microorganismos, 197
- Microorganismos autotróficos, 191
- caracterización, métodos, 164r
- inmóviles
- - oxidasa-negativos, 337, 337c
- - oxidasa-positivos, 329
- microaerófilos, 189
- procariontes, replicación, transcripción y traducción de códigos genéticos, 177f
- prototróficos, 191
- Microplaca Biolog GN2, 278
- Microscopia de campo oscuro, de lesiones genitales, 1453
- Microscopia electrónica
- detección directa de virus en muestras clínicas, 1335
- detección e identificación provisoria de infecciones virales, 1329
- inmunitaria, 117
- Microscopia óptica
- detección directa de virus en muestras clínicas, 1334, Protocolo 23
- detección e identificación provisional de infecciones virales, 1329, Protocolo 23
- Miocarditis/pericarditis, infecciones virales y, 1312c
- Mionecrosis, clostridios, 889, 892
- Mixovirus, efecto citopático, 1327f
- Molécula 16S rRNA, 163
- Monitorización de insumos, control de calidad, 61, 62c
- Monofosfatos de nucleótidos, DNA, 130, 131f
- Moraxelas, 333, 335c
- clasificación, especies, 541, 541r
- taxonomía, 541, 541r
- Morfotipos bacterianos, en cultivos mixtos, separación, 35, 37c
- Morganella*, especies, 257, 257c
- características de identificación, 226c
- *M. morganii*, reacciones bioquímicas, 232c
- Mosca(s)
- *Dermatobia hominis* (larva de la mosca humana), 1373
- tumbu, 1373
- Mosquitos, 1374
- flebótomos, 1374
- Motilidad bacteriana, identificación de enterobacterias, 220, 220r, *Lámina en color* 6
- mRNA, Véase *RNA mensajero (mRNA)*
- Mucor, especies, identificación, 1120, 1123f
- Mucormicosis, 1105
- Muestra(s), Véase también *Recolección de muestras*
- anaerobias, recipientes para transporte, 12, 12c, 13, 13f
- de biopsia, recuperación e identificación de micobacterias, 1026
- cultivo
- - aislamiento de micobacterias, 1029, 1030c, 1031c, 1032f
- - técnicas, 26, 27, 30f
- de esputo, evaluación de la calidad, 1201
- - sistema de graduación de Bartlett, 17, 17r
- - sistema de graduación de Murray y Washington, 17, 17r
- diagnóstico de infecciones virales
- - almacenamiento, 1316
- - tipos, 1315c
- - transporte, 1316
- ectoparásitos, remisión al laboratorio, 1362
- enfermedades parasitarias, 1194, Véase también *Enfermedad parasitaria, muestras*
- examen microscópico, 15, 17, 17r, 18f, 24r, 95, Véase también *Examen microscópico de muestras*
- genitales, 88, 89f
- de heces
- - diagnóstico de tuberculosis, 1022
- - enfermedades parasitarias, 1194
- - medio, 216, 216r
- - ooquistes de *Cryptosporidium*, técnica de flotación de Sheather en recuperación, 1217r
- - parásitos, incidencia, 1192, 1193r
- - recolección, 79
- líquidas, recuperación e identificación de micobacterias, 1026
- manipulación, precauciones de seguridad, 50
- de médula ósea, recuperación e identificación de micobacterias, 1026
- de orina
- - de chorro medio, 82, 82f, 82r
- - cultivo, 83
- - detección de parásitos, 1201
- - diagnóstico de infecciones del aparato urinario, 82f, 83r
- - diagnóstico de infecciones del tracto urinario, 81
- - evacuada, 83
- - examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c
- instrucciones de obtención al acecho, limpias, 81, 82f, 83r
- procesamiento, 26, 28c, 29
- - relacionado con enfermedad parasitaria, 1194
- recepción y observaciones preliminares, 14
- rechazo, criterios, 14, 15r
- respiratorias, diagnóstico de tuberculosis, 1021
- de sangre, detección de parásitos, 1202, Protocolo 22
- selección de medios de cultivo primarios, 27, 28c
- técnica de transferencia, 27
- transporte, 10, 12, 12c, 14c, 14r
- - precauciones de seguridad, 55, 56f, 57f
- - recipientes, 12, 12c, 13, 13f
- - relacionado con enfermedad parasitaria, 1194
- Multiceps*, especies, 1261
- Muriforme, 1107r
- Mutualismo, 4
- Mycobacterium*, especies, Véase también *Micobacterias*
- complejo *M. tuberculosis*, 1046, Diagrama 19, *Lámina en color* 19
- de crecimiento rápido, 1055, 1057r
- escotocromógenos, 1047
- fotocromógenos, 1045
- *M. abscessus*, 1055, 1057r
- *M. asiaticum*, 1047
- *M. avium-intracellulare*, 1051
- *M. bovis*, 1044
- *M. celatum*, 1049
- *M. fortuitum*, 1055, 1057r
- *M. gastri*, 1053
- *M. genavense*, 1056
- *M. gordonae*, 1050, 1050r
- *M. haemophilum*, 1054, 1054r
- *M. kansasii*, 1045, 1048r
- *M. malmoense*, 1054, 1054r
- *M. marinum*, 1045, 1049r
- *M. paratuberculosis*, 1052
- *M. scrofulaceum*, 1047
- *M. simiae*, 1047, 1049r
- *M. szulgai*, 1048, 1050r
- *M. terrae*, 1053, 1053r
- *M. thermoresistible*, 1056
- *M. triviale*, 1053, 1053r
- *M. tuberculosis*, 1056, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- - detección, instrumentación radiométrica, 1451
- - evaluación de sensibilidad, 1064, 1065f
- - evaluación de sensibilidad a drogas, instrumentación radiométrica, 1451
- - HIV, 1018
- - identificación, instrumentación radiométrica, 1451
- - meningitis debida, 91
- - tratamiento a corto plazo, 1067, 1067r
- *M. ulcerans*, 1056, 1056r
- *M. xenopi*, 1049, 1049r
- no fotocromógenos, 1051
- nomenclatura, 1040c
- orden de presentación, 1045r
- revisión, 1043
- Mycoplasma*, especies
- factores de virulencia, 979
- hemotróficas, 992
- identificación, características, 978r
- importancia clínica, 980
- *M. fermentans*, importancia clínica, 987
- *M. genitalum*, importancia clínica, 986
- *M. hominis*, importancia clínica, 981
- *M. penetrans*, importancia clínica, 989
- *M. pirum*, importancia clínica, 991

- Mycoplasma*, especies (Cont.)
- *M. pneumoniae*
 - aislamiento, 994, 996f, 1426, Protocolo 18, *Lámina en color* 18
 - medio, 1425
 - detección sin cultivo, 995
 - identificación, 994, 996f, 1424, Protocolo 18, *Lámina en color* 18
 - presuntiva, prueba de reducción de tetrazolio, 1428
 - prueba de hemadsorción, 1424
 - importancia clínica, 980
 - infecciones debidas a, diagnóstico, pruebas serológicas, 1001
 - *M. primum*, importancia clínica, 991
 - *M. spermatophilum*, importancia clínica, 992
- Myroides*, especies, 293c, 332, 333c
- N**
- N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC), 1429
- N-acetilglucosamina, 178, 180f
- Naegleria*, especies, *N. fowleri*, meningitis, 91
- NALC, Véase N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC)
- NAP, Véase p-Nitro-acetilamino-hidroxipropiofenona (NAP)
- Naranja de acridina, examen microscópico de muestras, 24, 26r
- NASBA, Véase Amplificación basada sobre secuencia de ácidos nucleicos (NASBA)
- Nasofaringe
- cultivos, 72
 - infecciones, 72
- National Type Culture Collection (NTCC) (Recolección de cultivos de tipo nacional), 162
- Natostomiasis, 1260
- Necrosis, 7
- Neisseria*, especies, 293c, 335c, 336, 539
- aislamiento, 559, 561c, 561r, 563r
 - atípicas, características de cultivos, 572c
 - características, 542, 543r, 545f
 - características del cultivo, 571, 572c
 - clasificación, 541, 541r
 - identificación, 564, 567c
 - BatiCard, 567
 - características, 572c
 - diferenciación de otros microorganismos sobre medios selectivos, 565
 - "falsas", características, 572c
 - morfología de las colonias, 564
 - prueba de oxidasa, 564
 - prueba rápida de utilización de hidratos de carbono, 1410
 - prueba de superoxol, 564
 - pruebas de coagulación, 568
 - pruebas confirmatorias, 564
 - pruebas de sustrato de enzimas cromogénicas, 566, 567c
 - pruebas de utilización de hidratos de carbono, 565
 - sistemas de identificación multiprueba, 568
 - tinción de Gram, 564
 - importancia clínica, 542, 546, 546f, 547f
 - *N. cinerea*, 556
 - características del cultivo, 572c, 574
 - *N. elongata*
 - subespecie *elongata*, características del cultivo, 572c, 576
 - subespecie *glycolitica*, características del cultivo, 572c, 576
 - *N. flavescens*, características del cultivo, 572c, 575
 - *N. gonorrhoeae*
 - aislamiento, 559, 560c, 561c, 561r
 - extendidos directos teñidos con Gram, 559
 - medios de cultivo selectivos, inoculación e incubación, 560c, 561
 - recolección de muestras, 560, 560c, 561r
 - transporte de muestras, 560
 - antecedentes históricos, 540
 - antígenos, asociados con virulencia, 544r
 - β -lactamasas, inducción, 952
 - características del cultivo, 571, 571c
 - confirmación del cultivo
 - métodos epidemiológicos, 567
 - prueba de sonda de DNA, 569
 - epidemiología, 546, 546r
 - evaluación de métodos, 955c
 - factores de virulencia, 544r
 - identificación
 - criterios presuntivos, 565
 - prueba de IFD, 567
 - pruebas de hibridación y amplificación de ácidos nucleicos, 569
 - importancia clínica, 542, 546r, 547f
 - infecciosa causadas por, 547, 548, 548f, 549f
 - sensibilidad a los antibióticos, 577
 - subespecie *kochii*, características del cultivo, 572c, 576
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 965
 - *N. lactamica*, 556
 - características del cultivo, 572c, 574
 - *N. meningitidis*
 - aislamiento
 - aislamiento e incubación, 562
 - extendidos directos teñidos con Gram, 563
 - pruebas de antígeno capsular directo, 563
 - recolección y transporte de muestras, 563
 - seguridad de laboratorio, 562
 - antecedentes históricos, 540
 - antígenos, asociados con virulencia, 545r
 - características del cultivo, 572c, 573
 - epidemiología, 550
 - evaluación de métodos, 955c
 - factores de virulencia, 545r
 - identificación, métodos moleculares, 571
 - infecciones causadas, 552
 - meningitis debida a, 91
 - sensibilidad a los antibióticos, 578
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 966
 - *N. polysaccharea*, características del cultivo, 572c, 575
 - *N. sicca*, 556
 - *N. subflava*, 556
 - no humanas, características del cultivo, 572c, 576
 - no patogénicas, identificación, 572c, 575
 - sensibilidad a los antibióticos, 577
 - taxonomía, 541, 541r
- Nematodos, 1220
- *Ascaris lumbricoides*, 1221, 1221f, 1223r
 - *Capillaria philippinensis*, 1226
 - descritos, 1220
 - *Enterobius vermicularis*, 1223, 1223f
 - por filarias, 1248, 1252f, 1252r
 - *Strongyloides stercoralis*, 1225, 1225f, 1227r
 - *Trichostrongylus*, especies, 1226
 - *Trichuris trichuria*, 1222, 1223f, 1224r
 - uncinarias, 1222, 1225, 1225f
- Neumolisisina, *S. pneumoniae*, 656
- Neumonía(s), 73
- aguda, 74
 - en ancianos, 75
 - por aspiración, 73
 - atípica, 74
 - crónica, 74
 - diagnóstico de laboratorio, 76, 76r, 78c
 - especies de *Haemophilus* y, 411r, 418
 - manifestaciones clínicas, 1311c
 - pacientes con fibrosis quística, 74
 - pacientes inmunosuprimidos, 74
 - poblaciones especiales, 75
- Neurorretinitis, especies de *Bartonella* y, 481
- Niacina, acumulación, 1442
- identificación de micobacterias, 1036
- Niclosamida, infecciones parasitarias, 1265c
- Nigrospora*, especies, 1160, 1161f
- Ninfa(s), 1365
- Niños
- abuso sexual, infección por *C. trachomatis*, 1348
 - *Chilomastix mesnili*, 1213
 - infecciones, *S. epidermidis* y, 608r
- Nitrato(s)
- desnitrificación, identificación de no fermentadores, 299, Protocolo 7, *Lámina en color* 7
 - identificación de no fermentadores, 299, Protocolo 7, *Lámina en color* 7
 - a nitritos, identificación de micobacterias, 1038c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- Nitrato(s), nitratos, identificación de micobacterias, 1037, 1038c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- Nitrógeno
- asimilación y metabolismo, 190, 190f
 - crecimiento y metabolismo bacterianos, 189, 190f
- Nocardia*, especies, 818
- células bacterianas, 821
 - descritas, 821
 - diferenciación, 825, 826c, 829c, 829r, 831c, Protocolo 15, *Lámina en color* 15
 - pruebas claves, 829c
 - enfermedad clínica, 819
 - identificación
 - bandas API 20C AUX, 830c
 - prueba de lisozima, 826, 826r
 - tinción ácido-alcohol resistente modificada, 829, 829r
 - *N. asteroides*, 819
 - aislados, perfiles de sensibilidad a los antibióticos, 819, 821c
 - *N. brasiliensis*, 820
 - *N. otitidis cavitarum*, 820
 - sensibilidad in vitro, 832c, 833
 - taxonomía, 818
 - utilización de hidratos de carbono, patrones, pruebas suplementarias en resolución, 831c
- Nocardiosis*, especies, 823
- Nocardiosis, 820
- Nomenclatura
- definida, 1273
 - relacionada con infecciones virales, 1273, 1274r, 1276f, 1278c
- Novobiocina, sensibilidad, identificación de *S. saprophyticus*, 623
- Novobiocina-verde brillante-agar glucosa (NBG), recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- Novobiocina-verde brillante-glicerol-agar lactosa (NBGL), recuperación y caracterización de *Salmonella*, 246c
- Nucleoide, 172
- Nuclisens HIV-1 QT, 140
- Números de biotipo, 274
- O**
- o*-Nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG), 1391, 1391f

- identificación de enterobacterias, 208, Protocolo 6, *Lámina en color* 6
- Obesumbacterium*, especies
 - más nuevas, características diferenciadoras, 267c
 - *O. proteus*, 264c
 - reacciones bioquímicas, 232c
- Objetos de vidrio, precauciones de seguridad, 49
- Oceanopirilláceas, 318, 319c
- Ochrobactrum*, especies, 326c, 329
 - *Ochrobactrum anthropi*, 293c
- Oerskovia*, especies, 789c, 790, 824
- OFBA-1, 323
- Ojo(s), examen directo, diagnóstico de enfermedad infecciosa, 23c
- Oligella*, especies, 293c, 328
- Olores, microbios, 33, 35c
- Onchocerca volvulus*, 1250, 1253f
 - ciclo vital, 1253f
- Oncocerciasis, 1250, 1253f
- ONPG, Véase *o-Nitrofenil-?-D-galactopiranosida* (ONPG)
- Ooquistes de *Cryptosporidium*, muestras fecales, técnica de flotación de Sheather para recuperación, 1217r
- Oospora(s), 1109f, 1109r
- Optoquina, sensibilidad, identificación de estreptococos, 684, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
- Orgánulos, locomotores, 185
- Ornithodoros*, especies
 - distribución geográfica, 1369
 - identificación, 1369
- Ornitina, descarboxilación, identificación de enterobacterias, 218, Protocolo 6, *Lámina en color* 6
- Orthomyxoviridae*, especies, descritas, 1278c
- Ortomixovirus, manifestaciones clínicas, 1277, 1284
- Ortopoxvirus, manifestaciones clínicas, 1304
- Osteomielitis
 - diagnóstico, 89
 - *S. aureus* y, 603r
 - *S. epidermidis* y, 607r
 - síntomas, 89
- Otitis media, 72
 - especies de *Haemophilus* y, 411r, 417
- Oxalobacterias, 318, 319c
- Oxígeno
 - crecimiento y metabolismo bacterianos, 189
 - relaciones de las bacterias, 837
- P**
- p*-Nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona, 1434
- p*-Nitro-acetilamino-hidroxipropiofenona (NAP), diagnóstico de tuberculosis, 1020
- Paecilomyces*, especies, cadenas de conidios producidos, 1131, 1132f
- Paludismo, 1239, 1242f, 1242r
 - descrito, 1239
 - identificación de laboratorio, 1241, 1244
- Pamoato de pirantelo, infecciones parasitarias, 1265c
- Pandoraea*, especies, 293c, 312c, 315
- Panel Combo MicroScan Rapid POS, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 625
- Panel MicroScan POS ID, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 625
- Paneles de identificación MicroScan, identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas, 710
- Pantoea*, especies, 254
 - características de identificación, 226c
 - reacciones bioquímicas, 232c
- Papovaviridae*, especies, descritas, 1286c
- Papovavirus, manifestaciones clínicas, 1305, 1306c, 1306f, 1307c
- Paracoccidioides*, especies, *P. immitis*, 1152, 1155f, 1156f, 1157r
- Paracoccidioidomicosis, 1152, 1153r, 1157f, 1157r
- Paracoccus yeei*, 336, 336c
- Paragonimus westermani*, 1238, 1240f, 1241r
- Parálisis por garrapatas, 1365
- Paramyxoviridae*, especies, 1278c
- Parasitismo, 4
- Parasitología, 1191
- Parásitos, 4
 - cestodos, 1228
 - descripción, 3
 - diferenciación, 1202, 1204f, Protocolo 2, *Lámina en color* 22
 - humanos, ciclos vitales, 1203, 1204f
 - identificación, 1202, 1204f
 - imaginarios, 1192
 - intestinales
 - muestras de materia fecal, incidencia, 1192, 1193r
 - recuperación, técnicas de concentración de heces, 1465
 - nematodos, 1220
 - filarias, 1248, 1251r, 1252f
 - identificación preliminar, 39
 - prevalencia, 1192, 1193r
 - protozoos, 1191, 1203, 1205
 - intestinales, 1205, Véase también *Protozoos intestinales*
 - reseña, 1192
 - sanguíneos, 1195, 1238
 - tipos, 1192
 - tisulares, 1238
 - trematodos, 1234
- Pared celular
 - de actinomicetos aerobios, 818, 819c
 - agentes antibióticos que no ejercen efecto, 918
 - bacteriana, formación, antibióticos que interfieren, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
 - de bacterias "ácido-alcohol resistentes", 182, 183f
 - de bacterias gramnegativas, 179, 180f, 181f
 - de bacterias grampositivas, 178, 180f
 - componentes, 910f
 - de endosporas bacterianas, 183
 - estructura, 176, 178f, 183f
 - formación, antibióticos que interfieren, 910, 912, 914f, 916c, 917c, 918r
 - transporte de agentes antibióticos, 906, 909f
- Parotiditis
 - infecciones virales y, 1312c
 - infecciosa, 1284
- Parotiditis infecciosa, 1284
- Parvoviridae*, especies, descritas, 1286c
- Parvovirus
 - B19, detección molecular, 1339
 - detección molecular, 1338
 - diagnóstico serológico, 1344
 - manifestaciones clínicas, 1305
- Pasteureláceas, diferenciación de miembros, características, 410c
- Pasteurella*, especies, 434
 - características, 410c
 - características del cultivo, 441r
 - descritas, 434, 437r, 438c
 - identificación, 441r
 - características bioquímicas, 438c
 - *P. aerogenes*, 436r, 437, 438c
 - *P. bettyae*, 436r, 438c, 443
 - características del cultivo, 441r
 - identificación, 441r
 - características bioquímicas, 438c
 - importancia clínica, 436, 437, 441r
- infecciones debidas a, espectro clínico, 434, 441r
- *P. caballi*, 436r, 438c, 444
- *P. canis*, 437r, 438c, 443
- *P. dagmatis*, 437, 437r, 438c
- *P. gallinarum*, 437r, 438c, 444
- *P. multocida*, 153, 153f
- *P. pneumotropica*, 436r, 437, 438c
- *P. stomatis*, 437r, 438c, 443
- reconocidas actualmente, 437r
- sensibilidad a los antibióticos, 437
- taxonomía, 434
- Patogenicidad
 - definida, 195
 - virulencia bacteriana y, 197
- Patógeno(s), 4
 - definidos, 195
 - potencial, 4
 - potenciales, 4
- PCR. Véase *Reacción en cadena de la polimerasa* (PCR)
 - de amplio espectro, 141
 - anidada, 143
 - múltiple, 142
 - PCR-RFLP, 152
- Pediculus*, especies
 - *P. capitis*, 1375
 - *P. humanus*, 1375
- Pediococcus*, especies, 673
 - identificación, 701, 703f
- Pedobacter*, especies, 332, 333c
- Peligros no biológicos, precauciones de seguridad, 56
- Peliosis, *B. henselae* y, 477
- Penicilina
 - descubrimiento, 903, 903f
 - *S. pneumoniae* resistente, 963, 964f
 - *S. pyogenes* resistente, 968
- Penicillium*, especies, cadenas de conidios producidas, 1129, 1131f, 1132f
- Peptidasa C5a, 650
 - factor de virulencia del estreptococo, 645
- Peptidoglucano, 178, 910, 912, 914f
 - *S. aureus*, 600r
- Pericarditis, *S. aureus* y, 603r
- Periodontitis juvenil localizada, 430
- Permeasas, 177
- Peste, 258, 259f, 259r
 - bubónica, 260r, 264c
 - clasificación, fenotípica, 304r
 - definida, 258
 - diagnóstico, 259f, 259r
 - de laboratorio, 259
 - epidemiología, 258, 258f, 258r
 - especies de *Yersinia* y, 258, 259f, 260r, 261r
 - hallazgos clínicos, 265c
 - informe, 261r
 - neumónica, 260r
 - número de casos, 259f
 - pandemia, 260r
 - prevención, 261r
 - pruebas de laboratorio, 261r
 - reseña, 260r
 - septicémica, 260r
 - tipos, 260r
 - *Y. enterocolitica*, infecciones causadas por, 260
 - *Y. frederiksenii*, 262
- pH
 - evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 930
 - tratamiento antibiótico, 922
- Phaeoanellomyces werneckii*, 1177, 1177f
- Phialophora*, especies
 - *P. richardsiae*, 1162, 1164f
 - *P. verrucosa*, 1162
- Phoma*, especies, 1160, 1161f
- Photobacterium, especies, 397

- Photorhabdus*, especies, 269
- más nuevas, 265c
 - reacciones bioquímicas, 232c
- Phthirus pubis*, 1376
- Picnidos, 1160
- Picornaviridae*, especies, descritas, 1281c
- Picornavirus, manifestaciones clínicas, 1288
- Pigmentación, identificación de micobacterias, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- Pili
- bacterianos, 184
 - *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - *N. gonorrhoeae*, 547r
 - *N. meningitidis*, 545r
- Pilina, 185
- Piojos, 1375f
- Piomiositis, *S. aureus* y, 604r
- Pirazinamidas, 1445
- identificación de micobacterias, 1037, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- Pirosecuenciación, 145; 146f
- Piruvato, utilización, efectos bacterianos, 193, 195f, 196f
- Piuria, pruebas de cribado, 84
- Placa de agar, 30f, 33, 33f, 34f
- Placa de agar sangre-agar de MacConkey, 31f
- Placa UNI-N/F Tek, identificación de no fermentadores, 350
- Placas Presumpto, diferenciación de bacterias anaerobias, 860, 861c, 862r
- Placas de sensibilidad a antibióticos, diferenciación de bacterias anaerobias, 862
- Plagia fontium*, 265c
- Plásmido, 176
- de conjugación, 176
 - F, 187
 - *N. gonorrhoeae*, 547r
 - *N. meningitidis*, 545r
- Plasmodium*, especies
- *P. falciparum*, 1241, 1243
 - *P. malariae*
 - ciclo vital, 1242f
 - identificación, 1241
 - *P. vivax*, 1241
- Plesiomonas*, especies, 395c, 399, 400c
- aislamiento de laboratorio e identificación, 399, 400c
 - *P. shigelloides*, 395c, 399, 400c
- Pleurodinia, infecciones virales y, 1311c
- Pneumocystis*, especies, *P. carinii*, 1257
- Pneumovirinae*, especies, 1284
- Polibetahidroxibutirato, 176
- Polimixina B, sensibilidad, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 620
- Polinucleótido(s), 173, 175f
- estructura molecular, 175f
- Poliomavirus, manifestaciones clínicas, 1306
- Poliovirus 1, 1281c, 1281f
- Polirribosoma(s), definido, 174
- Polisacárido(s), capsulares
- *N. meningitidis*, 545r
 - *S. aureus*, 600r
- Polisoma(s), 174
- Porphyromonas*, especies
- identificación, características, 878c, 878r
 - productos metabólicos, 877c
- Potencial de oxidorreducción (Eh), medio de cultivo, 838
- Poxviridae*, especies, 1287c
- Poxvirus, manifestaciones clínicas, 1305
- Pragia fontium*
- reacciones bioquímicas, 232c
- Praziquantel, infecciones parasitarias, 1265c
- Preparación con cinta adhesiva transparente, 1114f
- Preparación con solución fisiológica, examen microscópico de muestras, 18c
- Preparado de cinta adhesiva de celulosa, examen de oxiuros, 1473
- Preparado con yodo, examen microscópico de muestras, 18c
- Preparado con tinta china, examen microscópico de muestras, 18c
- Preservativos de heces, de uso frecuente, fórmulas, 1475
- Prevalencia, 1241
- Prevotella*, especies
- características, 876c
 - identificación, características, 878c
 - *P. oralis*, 879
 - productos metabólicos, 877c
 - tipos, 879
- Primaquina, infecciones parasitarias, 1265c
- Prión(es), 4
- enfermedades y manifestaciones clínicas, 1309, 1309c
- Procedimiento de digestión-descontaminación, 1023, 1025c, 1025r, Protocolo 19
- agentes utilizados, 1023, 1025c
- Procedimiento de gota gruesa, examen microscópico de muestras, 18c
- Procedimiento de Western blot, para anticuerpos anti-HIV-1, 118, 119f
- Producción de acetoina, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 623
- Producción de pigmento, identificación de estreptococos, 682
- Productos bacterianos, pruebas, 84
- Productos MicroScan, evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 945
- Programa de control de calidad, componentes, 60
- Propionibacterium*, especies
- identificación, 882
 - *P. propionicum*, identificación, 885
- Proteasa
- características de identificación, 226c
 - IgA1, 657
 - *N. gonorrhoeae*, 544r
 - *N. meningitidis*, 546r
 - *Proteae* (tribu), 224c, 255, 256c
- Proteína(s)
- *A. S. aureus*, 600r
 - CD, *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - CopB, *Moraxella catarrhalis*, 559r
 - E, *Moraxella catarrhalis*, 557r
 - H.8, *N. gonorrhoeae*, 544r
 - LpbA, *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - LpbB, *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - M. factor de virulencia estreptocócico, 645
 - de la membrana externa, 182
 - asociadas con lípidos, 1003
 - *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - *N. gonorrhoeae*, 543r
 - *N. meningitidis*, 546r
 - Opa
 - *N. gonorrhoeae*, 544r
 - *N. meningitidis*, 546r
 - Opc, *N. meningitidis*, 546r
 - periféricas, 182
 - PorA, *N. meningitidis*, 546r
 - PorB, *N. meningitidis*, 546r
 - porinas, 182
 - transporte de agentes antibióticos a través de la membrana celular, 906, 911f, 912f
 - Rmp, *N. gonorrhoeae*, 544r
 - superficie extracelular, factor de virulencia en especies de *Enterococcus*, 667, 669
 - TbpA, *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - TbpB, *Moraxella catarrhalis*, 558r
 - transmembrana, 182
 - de unión a penicilina, 178
 - de la superficie celular, 650
 - de unión a vancomicina, 911, 912, 912c
- de unión al hierro/adquisición, *N. meningitidis*, 546r
 - UspA, *Moraxella catarrhalis*, 558r
- Proteobacterias, 166r
- Proteus*, especies, 255, 256c
- características de identificación, 226c
 - *P. mirabilis*, 255, 256c
 - *P. penneri*, 255, 256c
 - *P. vulgaris*, 255, 256c
 - reacciones bioquímicas, 232c
- Protocolos, 1382
- Protozoos, intestinales, 1205
- amebas, B, 1205, 1206r, 1207f
 - *Balantidium coli*, 1214, 1215f
 - *Blastocystis hominis*, 1209
 - *C. parvum*, 1214, 1216f, 1217f, 1217r
 - *Chilomastix mesnili*, 1213
 - ciliados, 1214, 1215f
 - coccidios, 1214, 1216f, 1217f, 1217r
 - *Cyclospora cayentanensis*, 1217
 - *Dientamoeba fragilis*, 1213
 - *E. histolytica*, B, 1205, 1205f, 1205r
 - *Endolimax nana*, 1209
 - especies de *Microsporidium*, 1219, 1220r
 - especies de *Sarcocystis*, 1218
 - flagelados, 1210, 1211f, 1212r, 1215f
 - *G. lamblia*, 1210, 1212f, 1212r
 - *Iodamoeba bütschlii*, 1209
 - *Isospora belli*, 1218
 - *Tricomonas hominis*, 1214
- Providencia*, especies, 257, 258r
- características de identificación, 226c
 - reacciones bioquímicas, 232c
- Prueba(s)
- de la β -galactosidasa, identificación de enterobacterias, 208, Protocolo 6, *Lámina en color* 6
 - de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS), 1084, 1461, Protocolo 20
 - de aerotolerancia, 858, 858f
 - AFD, Véase *Prueba de anticuerpos fluorescentes directos (DFA)*
 - de aglutinación de látex, identificación de *S. aureus*, 615
 - de amplificación, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
 - de Bauer-Kirby, 922
 - de identificación de estreptococos, 684, Protocolo 13, *Lámina en color* 13
 - de CAMP, 1408, 1408f
 - para diferenciación de bacterias anaerobias, 863
 - para identificación de estreptococos, 682
 - del capilato de 4-metilumbeliferilo (MUCAP), recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 248, 249
 - de captura de híbridos digenes, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
 - de la catalasa, 38, Protocolo 1
 - de aislamiento y diferenciación preliminar de especies de *Staphylococcus*, 612
 - de identificación de estreptococos, 679
 - de la citocromo oxidasa, 1387, 1387f, Protocolo 1
 - de la citocromooxidasa, 38, Protocolo 1
 - CLO, identificación de *H. pylori*, 386
 - de cloruro manganoso-urea, identificación de *U. urealyticum*, 1424
 - de coagulación, identificación de especies de *Neisseria*, 568
 - de coagulasa en portaobjetos, 38, 1384, Protocolo 1
 - identificación de *S. aureus*, 612, Protocolo 1, *Lámina en color* 2
 - de coagulasa en tubo, identificación de *S. aureus*, 614

- de confirmación de cultivo de *Neisseria gonorrhoeae* AccuProbe, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
- cromógenas de enzima-sustrato, identificación de especies de *Neisseria*, 566, 567c
- de la desoxirribonucleasa (S), identificación de *S. aureus*, 616
- directa de indol en punto, 38, Protocolo 1
- del disco de penicilina, identificación de *N. gonorrhoeae*, 565
- de la DNAsa, Véase *Prueba de desoxirribonucleasa (DNAsa)*
- de endonucleasa termoestable, identificación de *S. aureus*, 616
- del epsilómetro (Etest), evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 946, 957f, 958r, Protocolo 17
- FAMA, Véase *Prueba de inmunofluorescencia contra antígenos de membrana*
- de fijación del complemento (FC), 114, 115f, 1388, Diagrama 3
- de la furazolidona con disco, 1411
- Gen-Probe, 997
- Gonochek II, identificación de especies de *Neisseria*, 566
- GonoGen II, identificación de especies de *Neisseria*, 568
- de gradiente de difusión, sensibilidad bacteriana, 1422
- de hemadsorción (HAD), 1474
- de detección e identificación provisional de infecciones virales, 1324, 1325, 1333f, Protocolo 23
- de identificación de *M. pneumoniae*, 1424
- de hibridación de ácidos nucleicos, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
- por métodos moleculares, 1058
- con sondas de ácidos nucleicos, 133
- de la hidrólisis de esculina, 1406, 1407f
- de hinchazón capsular (Quellung), 184
- de inhibición de la hemaglutinación (IHA), 114, 116f, 1390, Protocolo 3
- de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en suero, examen de especies de *Legionella*, 532
- de inmunofluorescencia anticomplemento (IFAC), 125, 125f
- de inmunofluorescencia contra antígeno de membrana, 126
- de anticuerpos inmunofluorescencia directa (IFD)
- de detección de especies de *Bordetella*, 495
- identificación de *N. gonorrhoeae*, 567
- de la leucinaamino transferasa (LAP), identificación de estreptococos, 684
- de motilidad
- de identificación de no fermentadores, 298, 299f
- medio, 219, 219r
- MUCAP, recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 248, 249
- MUG, 38
- para *Mycobacterium Tuberculosis* de Roche Amplicor, identificación de micobacterias, 1060
- de Nagler, diferenciación de bacterias anaerobias, 863
- NAP, 1434
- de la novobiocina, 1411
- ODC, Véase *Prueba de la ornitina descarboxilasa (ODC)*
- oxidofementadora, 854f, 855
- de la pirrolidónil arilamidasa (PYR), 38, 1388, Protocolo 1
- identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 620
- identificación de estreptococos, 684, Protocolo 1, *Lámina en color 13*
- de precipitinas capilares, identificación de estreptococos, 685
- de producción de indol, 1385, 1386f
- de identificación de no fermentadores, 300, Protocolo 1, *Lámina en color 7*
- de producción de pigmento, identificación de no fermentadores, 298
- de bilis-esculina, 1413
- rápida de utilización de hidratos de carbono, identificación de especies de *Neisseria*, 566, 1410
- de reagentas plasmáticas rápidas (RPR), 1457
- para sífilis, 1082, 1083f, Protocolo 20
- de reducción de nitratos, identificación de no fermentadores, 299, Protocolo 6
- de reducción de tetrazolio, identificación pre-suntiva de *M. pneumoniae*, 1428, Protocolo 6
- de RIM-*Neisseria*, identificación de especies de *Neisseria*, 566
- del rojo de metilo, 1393, 1393f
- de identificación de enterobacterias, 217, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
- RPR, Véase *Prueba de reagentas plasmáticas rápidas (RPR)*
- de sensibilidad a antibióticos, 90, Véase también *Agentes antibióticos*
- para bacterias anaerobias, 896
- para β -lactamasas, 949, 952
- directas, 969
- formatos de resúmenes, recomendaciones, 937
- para infecciones por micoplasmas, 1004
- problemas especiales, 945, 949
- reseña histórica, 902, 902f, 905c
- de sensibilidad a antimicrobianos, 1178, 1178f
- de sensibilidad a antivirales, en diagnóstico serológico de infecciones virales, 1345
- de sensibilidad a la bacitracina, 1412
- de sensibilidad a la colistina, identificación de *N. cinerea*, 575
- de sensibilidad por difusión con discos
- para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales, 1420
- examen de la actividad inhibitoria de los agentes antibióticos, 937, 938, 945f, 945r, 946f, 947c
- control de calidad, 942, 947c
- difusión con disco estandarizada, 940c, 945r
- interpretación de resultados, 939, 942, 946f
- limitaciones, 942
- de sensibilidad por dilución en agar, evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 937, 944f
- de sensibilidad directas, 969
- de sensibilidad a fármacos, *M. tuberculosis*, instrumentación radiométrica, 1451
- de sensibilidad por microdilución en caldo
- para bacterias con requerimientos nutricionales especiales, rendimiento, 1421
- evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 942, 944, 949f, 950c, 952f, 953c
- de sensibilidad a la optoquina, 1414
- de sensibilidad a SXT, 1412
- serológicas, diagnóstico de infecciones virales, 1332f, 1340, 1341f, 1348, Véase también *Infecciones virales, diagnóstico serológico*
- de solubilidad en bilis, 38, 1383, Protocolo 1
- para identificación de estreptococos, 684, Protocolo 1
- de la sonda de DNA, identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
- de superoxol, identificación de *N. gonorrhoeae*, 565
- de tolerancia a la sal, 1414
- para identificación de estreptococos, 684, Protocolo 3, *Lámina en color 13*
- TPI, Véase *Treponema, especies, prueba de inmovilización de T pallidum (TPI)*
- tubo germinal, 1167r
- de utilización de citrato, identificación de enterobacterias, 217, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
- de utilización de glucosa, identificación de no fermentadores, 297, 298f, Protocolo 7, *Lámina en color 7*
- de utilización de hidratos de carbono, identificación de especies de *Neisseria*, 565
- VDRL, Véase *Prueba Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)*
- de Voges-Proskauer, 194, 1394, 1395f
- de identificación de enterobacterias, 217, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
- "Prurito del nadador", 1236r
- Pseudomonadaceae, 301, 301r, 302r, 303c, 305c, 305r, Véase también *Pseudomonas, especies*
- características
- características, 303c
- Pseudomonadales, fluorescente, 301, 305c, 305r
- *Pseudomonas*, 301
- alcalinas, 307c
- características, 303c
- curvas, 320c
- especies, 293c
- fluorescentes, 301, 305c, 305r
- grupo alcaligenes, 304, 307c
- grupo fluorescente, 294r, 301, 305r
- grupo Stutzeri, 306, 306c
- halofílicas-positivas, 321c
- *P. aeruginosa*, 301, 305r
- características, 305c
- factores de virulencia, 301, 305r
- identificación, 339, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
- requerimientos mínimos, 301, 305r
- *P. fluorescens*, 304, 305c
- *P. luteola*, 306
- *P. oryzae*, 306, 319c
- *P. putida*, 304, 305c
- pigmentadas de amarillo, características, 306, 309r
- rRNA grupo 1, 301, 301r, 303c, 304r, 305c, 305r
- grupo de pigmento amarillo, 306, 319c
- grupo stutzeri, 304, 304c
- sulfuro de hidrógeno-positivas, 321c
- PspA, gA1, 657
- *Psychrobacter*, especies, 334, 336c
- *P. immobilis*, 336, 336c
- *P. phenylpyruvicus*, 294c, 334, 335c
- Pulga(s), 1375
- Punción y biopsia pulmonar, diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, 76
- Punción lumbar, técnica, 92, 93f
- Punción suprapúbica, 83, 83f
- Púrpura fulminante, *N. meningitidis* y, 553
- Pus, aspirado, muestras de hisopado, 11, 11f
- Q**
- Queratitis
- y conjuntivitis por infecciones virales y, 1312c
- presentación clínica, 95
- Quimiolitotrofo(s), 291
- Quimioorganotrofo(s), 291
- R**
- Radioinmunoanálisis (RIA), 118

- Rahnella*, especies
- más nuevas, 265c
 - características diferenciadoras, 268c, 269
 - *R. aquatilis*, reacciones bioquímicas, 232c
- Ralstonia*, especies, 294c, 311, 313r, 314c
- Raoultella*, especies, reacciones bioquímicas, 230c
- RAPD
- RapID CB plus, 750
- Rapid ID 32 Strep. identificación de estreptococos, enterococos y "bacterias similares a *Streptococcus*" seleccionadas, 709
- Rapidec Staph. identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 624
- Raspados corneanos, detección de parásitos, 1201
- Raspados cutáneos, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
- Reacción(es)
- antígeno-anticuerpo. serología diagnóstica
 - fijación del complemento, 114, 115f, Protocolo 3
 - prueba IHA, 114, 116f, Protocolo 3
 - reacciones de precipitina, 112, 114
 - tipos, 112, 114, 115f, 116f
 - en cadena de la ligasa, 140
 - en cadena de la polimerasa (PCR)
 - de amplio espectro, 141
 - anidada, 143
 - aplicaciones clínicas, 139
 - definición, 137
 - métodos, 137
 - modificaciones, 141
 - múltiple, 142
 - principios básicos, 137, 138f, 139f
 - transcriptasa reversa, 140
 - de citocromooxidasa, positiva, identificación de no fermentadores, 297, Protocolo 1, *Lámina en color 7*
 - cromogénica, 248, 248f
 - de hinchazón capsular de Neufeld, examen microscópico de muestras, 19c
 - de precipitinas, 112, 114
 - a la tinción de Gram, 182
- Reactivos, monitorización, control de calidad, 61, 62c
- Recolección de muestras
- Recolección de muestras, 9f, 10, 12c
- abscesos, 92
 - aparato gastrointestinal superior, 80
 - cantidades necesarias, 11
 - de catéteres, 83
 - celulitis, 94
 - diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio inferior, 75
 - diagnóstico de infecciones virales, 1312, 1313, 1314c, 1315
 - diagnóstico de tuberculosis, 1022
 - dispositivos, 11, 11f, 12c
 - especies de *Coxiella*, 1351
 - especies de *Rickettsia*, 1350
 - frotis, 13
 - genitales, 88, 89f
 - infecciones de heridas, 94
 - infecciones oculares, 95
 - infecciones relacionadas con *C. trachomatis*, 1347
 - infecciones del SNC, 91, 93f
 - de materia fecal, recolección, 79
 - oportunidad, 10, 10f, 13
 - de orina, 82f, 83r
 - relaciones costo-eficacia, 15, 16c
 - rotulación, 13
 - sitios, 10
- Recombinación genética, bacterias, 186, 187f
- Reducción de nitrato(s), 1392
- asimilatoria, 190
 - disimilatoria, 190
- identificación de enterobacterias, 209, Protocolo 6, *Lámina en color 6*
 - por micobacterias, 1444, 1444f
- Registadores de códigos numéricos, lectura, 274
- Reglamentación estatal, laboratorio de microbiología, 45, 45r, 46c
- Reoviridae*, especies, descritas, 1282c
- Rep-PCR, 154, 154f
- Replicación, definida, 174, 177f
- Requerimientos de factor V, 1409, 1409f
- Requerimientos de factor X, 1409, 1409f
- Reservorio de infección, 1362
- Reservorio de infección, definido, 1362
- Resistencia bacteriana
- a agentes antibióticos, 904. Véase también *Agentes antibióticos, resistencia bacteriana*
 - expresión y transferencia, variables, 906c
 - a la meticilina en *S. aureus*, detección, 616
- Respuesta inflamatoria, infecciones del SNC, evaluación, 92
- Retroviridae*, especies, descritas, 1283c
- Retrovirus, manifestaciones clínicas, 1294, 1295c, 1298c, 1299r, 1300c
- Rhabdoviridae*, especies, descritas, 1279c
- Rhabdovirus, manifestaciones clínicas, 1289
- Rhizobium*, especies, 326c, 328
- *R. radiobacter*, 294c
- Rhizopus*, especies, identificación, 1119, 1119f, 1120
- Rhodococcus*, especies, 822
- anatomía patológica, 822
 - enfermedad clínica debida a, 822
 - epidemiología, 822
 - patogenicidad, 822
- Rhodotorula*, especies, 1174
- RIA, Véase *Radioinmunoanálisis (RIA)*
- Ribosoma(s), definido(s), 173
- Rickettsia*, especies
- aislamiento en cultivos, 1351
 - características clínicas, 1349
 - detección directa de antígenos y ácido nucleico en muestras clínicas, 1351
 - epidemiología, 1349
 - infección, 1349
 - diagnóstico serológico, 1351
 - recolección de muestras, 1350
 - tipos, 1349, 1350c
- Riesgo(s) biológico(s), niveles de bioseguridad, 52c
- Riesgos, manejo en el laboratorio de microbiología, 47
- Rizobiáceas, 326c, 328
- Rizoide(s), 1119
- RNA. Véase también *Ácido ribonucleico (RNA)*
- mensajero (mRNA), 173
 - ribosómico (rRNA), 173
 - de transferencia (tRNA), 173
- Roseomonas*, especies, 294c, 322
- Rotavirus
- humanos, 1282, 1282c
 - detección inmunológica, 1336
 - manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
- Rothia*, especies, 595, 793, 794c
- *R. musilaginosa*, 611
 - identificación. características fenotípicas, 629, 629c
- Rotulación, muestras, 13
- S
- Saccharomyces*, especies, 1174, 1176
- Sacocystis*, especies, 1218
- SAF, fórmulas, 1475
- Salmonella*, especies
- aislamiento y caracterización, nuevos métodos, 245, 246c, 248f
 - características de diferenciación, 244c
 - características de identificación, 226c
 - multirresistentes, surgimiento, 244
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - *S. arizonae*
 - infecciones debidas, 245, 245r
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - *S. enterica*
 - infecciones debidas a, 245, 245r
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - *S. typhi*
 - identificación, 245
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - taxonomía, 243, 243r
- Salmonelleae* (tribu), 221c, 241
- características de identificación, 226c
 - clasificación, 242, 242r, 244c
 - nomenclatura asociada, 241, 243r
- Samonellosis
- fuentes, 242, 244, 245r
 - incidencia, 242, 243, 245r
- Sangre
- examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
 - exposición a pinchazos de agujas, riesgos de contraer infecciones virales de transmisión sanguínea, 52, 55c
 - exposiciones ocupacionales, manejo, 1296, 1299r
- Sanguijuelas medicinales, especies de *Aeromonas*, 398
- Saprófito, 4
- Sarcoptes scabiei*, 1372
- distribución geográfica, 1369
 - identificación, 1369
- Scedosporium*, especies, *Lámina en color* 212-2G, 1185, 1185f, 1186f
- Scopulariopsis*, especies, cadenas de conidios producido, 1131, 1132f
- Secreción vaginal, purulenta, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
- Secreción uretral purulenta, examen directo, diagnóstico de enfermedad infecciosa, 22c
- Secreción vaginal purulenta, examen directo, diagnóstico de enfermedad infecciosa, 23c
- Secuenciación de DNA
- análisis de micromatrices, 146
 - análisis posamplificación, 145, 145f, 146f
 - descrita, 145
 - del HIV, 145, 145f
 - identificación de micobacterias, 1062
 - secuenciación, 145, 146f
 - síntesis, 145, 146f
 - tradicional, 145, 145f
- Secuencias de inserción, definida, 176, 188
- Seguridad
- eléctrica, 49
 - del laboratorio (de microbiología), 47
 - agentes biológicos, 50, 51c, 52c, 53f
 - agujas, 49
 - centrifugación, 48
 - eléctrica, 49
 - elementos de vidrio, 49
 - elevación, 49
 - envío de muestras y agentes etiológicos, 53, 56f, 57f
 - fuego, 58
 - limpieza de derrames de materiales infecciosos, 53, 55
 - manipulación de desechos y materiales peligrosos, 50
 - en la manipulación de micobacterias, 1020
 - manipulación de muestras y derrames, 50
 - peligros no biológicos, 56
 - precauciones con los corredores, 49
 - precauciones de rutina, 48
 - precauciones universales, 52, 55, 55c
 - reglas y normas generales, 48, 49c
 - sustancias químicas, 56

- Sensibilidad bacteriana, prueba del gradiente de difusión, 1422
- Sensititre AutoReader, 280
- Sepedonium*, especies, condios producidos en forma aislada, 1135f, 1136
- Sepsis
- asociada con catéteres, 98
 - - consideraciones especiales, 103
 - neonatal, especies de *Haemophilus* y, 411r, 419
 - puerperal, estreptococos y, 646
- Serratia*, especies, 254, 254c
- características de identificación, 226c
 - especies, diferenciación, 256c
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - *S. marcescens*, 256, 256c
 - *S. rubidaea*, 255, 256c
- Seudomembrana diftérica, 766
- Shewanella*, especies, 291c, 320, 325c, 397
- Shigella*, especies
- características de identificación, 226c
 - especies, diferenciación, 242c
 - infecciones por, 241r
 - - fuentes, 240
 - - incidencia, 240
 - reacciones bioquímicas, 234c
 - subgrupos, 240, 242c
- Shock endotóxico
- bacterias gramnegativas y, 205
 - diagnóstico, ensayo de lisado de límulus, 205
- Sideróforo(s), 199
- Sífilis
- cardiovascular, 1078
 - congénita, 1079
 - diagnóstico de laboratorio, 1081, 1081c, 1083f, Protocolo 20, Lámina en color 20
 - epidemiología, 1079, 1079c
 - prueba FTA-ABS, 1084, Protocolo 20
 - prueba RPR, 1082, 1082f, Protocolo 20.3
 - prueba TPI, 1083
 - prueba VDRL, 1082, 1082f, Protocolo 20.2
 - pruebas no treponémicas, 1082, 1082f
 - pruebas provisionales y experimentales, 1084
 - pruebas serológicas, 1082, 1082c, 1082f
 - pruebas treponémicas, 1083
 - *T. pallidum* subespecie *pallidum* y, 1077, 1080c
 - "benigna" tardía, 1079
- Simbiosis, 4
- Simonsiella*, especies, 456
- Sinamorfio, 1178
- Síndrome(s)
- de Fitz-Hugh-Curtis, 87
 - de gastroenteritis, causas, 78, 79c
 - gripal, 1277, 1284
 - de Katayama, 1236r
 - de la piel escaldada estafilocócica, *S. aureus* y, 604r
 - respiratorio agudo grave (SRAG), manifestaciones clínicas, 1294
 - del shock tóxico estafilocócico
 - - definición de caso, 605r
 - - *S. aureus* y, 604r
 - similar al shock tóxico, estreptococos del grupo A, 648
 - urémico-hemolítico, 227
- Síntesis de polisacáridos, identificación de *N. gonorrhoeae*, 575
- Sinusitis, 72
- aguda, especies de *Haemophilus* y, 411r, 417
- Sistema(s)
- aislante, 89
 - anaerobio GasPak, 854, 854f
 - API 20NE, identificación de no fermentadores, 345, 355r
 - Autoscan-4, identificación de no fermentadores, 358
 - BACTEC, 1001
 - BACTEC ABF, detección de micobacterias, 1036, Protocolo 9
 - BACTEC TB, identificación de micobacterias, 1058
 - BD ProbeTEC ET, identificación de *N. gonorrhoeae*, 570
 - Biolog, identificación de no fermentadores, 357
 - de codificación e identificación computarizados (CCIS), 278
 - de códigos numéricos, 273, 273c, 275c
 - - cálculo de probabilidad, 274, 275c
 - - de códigos octales, lectura, 274
 - - frecuencia estimada de aparición, 274
 - - resolución de discrepancias, 274
 - comerciales, 274, 276, 277c
 - - API 20E, 276, 277c, Lámina en color 6
 - - Enterotube II, 277
 - - de evaluación de actividad inhibidora de agentes antibióticos, 945
 - - Micro-ID, 278
 - - microplaca Biolog GN2, 278
 - - sistema de identificación BBL cristal E/NF, 276
 - - MicroScan, 278
 - - RapID onE, 277
 - - Sensititre, 279
 - Crystal Enteric/Nonfermenter, identificación de no fermentadores, 356
 - de cultivo de micoplasmas, comerciales, 1000
 - de cultivo TREK ESP, procesamiento de hemocultivo, 103
 - de detección de micobacterias MB/BAT, detección de micobacterias, 1034
 - de difusión simple, 112
 - de graduación de Bartlett, evaluación de esputo, 17, 17r
 - de graduación de Murray y Washington, evaluación de esputo, 17, 17r
 - para hemocultivo BacT/Alert, en procesamiento de hemocultivos, 102
 - para hemocultivo BACTEC 9240/9120, procesamiento de hemocultivos, 102
 - de hemocultivo por lisis-centrifugación, procesamiento de hemocultivos, 101
 - de hemocultivos Septi-Chek BBL, procesamiento de hemocultivos, 101
 - ID no fermentadores entéricos BBL Crystal, 276
 - de identificación API 20E, 276, 277c
 - - para no fermentadores, 345, 355r
 - de identificación para grampositivos BBL Crystal, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 625
 - de identificación para grampositivos Crystal, identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas, 709
 - de identificación de levaduras, empaquetados, 1178, 1179r
 - de identificación de microbios, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 626
 - de lectura e incubación automatizado Sensititre (ARIS), 280
 - LightCycler, 1061
 - MGIT, Véase *Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) System (Sistema del tubo indicador de crecimiento de micobacterias)*
 - MGIT 960, detección de micobacterias, 1034
 - Microbiano Wampole Isostat/Isolator, procesamiento de hemocultivos, 101
 - de microbiología automatizado Phoenix, 280
 - - para identificación de no fermentadores, 359
 - MicroScan, 278
 - - para identificación de no fermentadores, 358
 - Mycotrim GU, 1000
 - Mycotrim RS, 1000
 - OmniLog ID, 280
 - PACE 2, 569
 - - identificación de *N. gonorrhoeae*, 569
 - RapID NF Plus, identificación de no fermentadores, 356, 357r
 - RapID onE, 276
 - RapID SS/u, 270
 - RapID STR, identificación de estreptococos, enterococos y bacterias similares a *Streptococcus* seleccionadas, 710
 - Remel N/F, identificación de no fermentadores, 350, 356, 356r
 - de rotación-estría, 856
 - Sensititre, 279
 - Sensititre AP80, identificación de no fermentadores, 359
 - Septi-Chek AFB, detección de micobacterias, 1036
 - de transporte de hisopos, 13, 13f
 - de transporte de hisopos no nutritivos, aislamiento de *N. gonorrhoeae*, 560
 - de transporte de medios de cultivo, aislamiento de *N. gonorrhoeae*, 561
 - del tubo indicador de crecimiento de micobacterias (MGIT), detección de micobacterias, 1033
 - Vitek 2, identificación de no fermentadores, 358
 - Vitek Legacy, 271
 - - Vitek, 279
- Sonda(s), 147
- DNA, identificación de micobacterias, 1449
 - FRET, amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, 147, 149, 149f, 150f
 - de hibridación
 - - amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, 147, 148f
 - - balizas moleculares, 150, 151f
 - - FRET, 147, 148, 149f, 150f
 - - de hidrólisis, 147, 148f
 - - TaqMan, 147
 - hidrólisis, amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, 147, 148f
 - Taqman, 147
 - de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, amplificación de ácido nucleico en tiempo real, 148, 149f, 150
- Southern blot*, análisis posamplificación, 144
- Sphingobacterium*, especies, 291c, 332, 333c
- Sphingomonas*, especies, 291c, 318
- Spirillum minor*, 1097
- Spirometra mansonoides*, 1261
- Sporothrix*, especies, *S. schenckii*, 1152, 1154f, 1155f, 1156r
- SRAG, Véase *Síndrome respiratorio agudo grave (SRAG)*
- Staf-System 18-R, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 626
- Staph-Zymm, identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 626
- Staphylococcus*, especies, 593, Véase también *Estafilococos*
- aislamiento, 611, 613c, Protocolo 12, Lámina en color 12
 - - morfología de las colonias, 611
 - - muestras clínicas, 611
 - - prueba de catalasa, 612
 - ambiental, 599r
 - animales, 598r
 - β -lactamasas, inducción, 949
 - diferenciación de micrococcos y estafilococos, hemaglutinación pasiva, 615
 - diferenciación preliminar, 611, 613c

Staphylococcus, especies (Cont.)

- identificación, características fenotípicas, 618r, 619c, 621c
- importancia clínica, 594, 596r, 607r
- métodos de evaluación, 954c
- primates humanos y no humanos, 596r
- resistencia a antibióticos, mecanismos, 908c
- *S. arlene*, medioambiente, 599r
- *S. aureus*
 - estructura de peptidoglucano, 179f
 - factores de virulencia, 595, 600r
 - ácidos teicoicos, 600r
 - enzimas, 601r
 - hemolisinas, 601r
 - peptidoglicanos, 600r
 - polisacáridos capsulares, 600r
 - proteína A, 600r
 - superantígenos, 602r
 - toxinas, 602r
- identificación, 612
 - aglutinación del látex, 614
 - fermentación de manitol, 616
 - prueba de coagulasa en portaobjetos, 612, Protocolo 1, *Lámina en color 2*
 - prueba de coagulasa en tubo, 614, Protocolo 1, *Lámina en color 12*
 - prueba de DNasa, 616
 - prueba de endonucleasa termoestable, 616
- impétigo debido, 646
- importancia clínica, 595, 596r
- infecciones asociadas, 595, 603r
- resistencia a la meticilina, detección, 616
- *S. auricularis*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. capitis*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. caprae*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. carnosus*, medioambiente, 599r
- *S. chromogenes*, animales, 598r
- *S. cohnii*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. condimentii*, medioambiente, 599r
- *S. delphini*, animales, 595r
- *S. epidermidis*, 606, 607r
 - identificación, producción de fosfatasa, 618
 - infecciones asociadas, 606, 607r
- *S. equorum*, animales, 598r
- *S. felis*, animales, 595r
- *S. fleurettii*, medioambiente, 599r
- *S. gallinarum*, animales, 598r
- *S. haemolyticus*, primates humanos y no humanos, 596r
- *S. hominis*, primates humanos y no humanos, 596r
- *S. hyicus*, animales, 598r
- *S. intermedius*, animales, 598r
- *S. kloosii*, medioambiente, 599r
- *S. lentus*, animales, 598r
- *S. lugdunensis*, primates humanos y no humanos, 596r
- *S. lutrae*, animales, 598r
- *S. muscae*, animales, 598r
- *S. pasteuri*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. piscifermentans*, medioambiente, 599r
- *S. saccharolyticus*, primates humanos y no humanos, 597r
- *S. saprophyticus*
 - identificación, sensibilidad a novobiocina, 623
 - subespecie *saprophyticus*, 609
- *S. simulans*, primates humanos y no humanos, 596r

- *S. succinis*, medioambiente, 599r
- *S. vitulinus*, animales, 598r
- *S. warneri*, primates humanos y no humanos, 596r
- *S. xylosus*, primates humanos y no humanos, 597r
- taxonomía, 593
- tratamiento antibiótico, resistencia
 - β -lactámicos, 957, 961f, 962r, 963f
 - estreptograminas, 960
 - lincosamidas, 960
 - macrólidos, 960
 - vancomicina, 959, 964r
- Stemphylium*, especies, 1158, 1159f
- Stenotrophomonas*, especies, 317, 317c
 - *S. maltophilia*, 317, 317c
 - identificación, 340
- Stomatococcus mucilaginosus*, 595
- Streptobacillus moniliformis*, 456, 459c
 - características del cultivo, 458, 458c
 - identificación, 456, 459c
 - importancia clínica, 457
 - sensibilidad a los antibióticos, 459
 - taxonomía, 456
- Streptococcus*, especies, 639, Véase también *Estreptococos*
 - aislamiento, 675, Protocolo 13, *Lámina en color 13*, *Lámina en color 13*
 - bacterias "similares al *Streptococcus*", 644f
 - bacterias "similares a *Streptococcus*", 639, 671
 - β -hemolítico, grupo B, enfermedad de inicio temprano debida, 651
 - caracterización preliminar, 680, 681c
 - clasificación, 641r
 - descritas, 640
 - especies de *Abiotrophia*, 671
 - especies de *Aerococcus*, 671
 - especies de *Alloiococcus*, 674
 - especies de *Dolosicoccus*, 675
 - especies de *Dolosigranulum*, 675
 - especies de *Eremococcus*, 675
 - especies de *Facklamia*, 675
 - especies de *Gemella*, 673
 - especies de *Globicatella*, 675
 - especies de *Granulicatella*, 671
 - especies de *Helcoccus*, 672
 - especies de *Ignavigranum*, 675
 - especies de *Lactococcus*, 675
 - especies de *Leuconostoc*, 672
 - especies de *Pediococcus*, 673
 - especies de *Tetragenococcus*, 673
 - especies de *Vagococcus*, 674
 - grupo *S. anginosus*, identificación, 688, 691, 692c, 694c
 - grupo *S. mitis*, identificación, 686, 689c
 - grupo *S. mutans*, identificación, 686, 689c
 - grupo *S. salivaris*, identificación, 686, 689c
 - grupo *S. sanguis*, identificación, 686, 689c
 - grupo(s), sobre base de análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas, 642r
 - identificación, 676, Protocolo 13, *Lámina en color 13*, *Lámina en color 13*
 - sistemas comerciales, 706
 - métodos de evaluación, 956c
 - *S. agalactiae*
 - enfermedad de inicio tardío debida, 651
 - enfermedad de inicio temprano debida a, 651
 - evaluación, recolección y procesamiento de muestras clínicas, 653r
 - factores de virulencia, 649
 - importancia clínica, 650, 653r
 - meningitis debida a, 91
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 968
 - *S. anginosus*, 662
 - *S. constellatus*, 662
 - *S. intermedius*, 661
 - *S. pneumoniae*, 656

- factores de virulencia, 656
- identificación, serológica, 685
- importancia clínica, 658
- meningitis debida a, 91
- métodos de evaluación, 955c
- resistencia a los antibióticos, mecanismos, 908c
- tratamiento antibiótico, resistencia, 963, 965f
- vacunas antineumocócicas, 657
- *S. pyogenes*, 641, 643f
 - factores de virulencia, 641, 644f
 - importancia clínica, 646
 - proteína M, 645
 - tratamiento antibiótico, resistencia, 968
- *S. suis*, 665
 - identificación, 693, 695c
- Streptomyces*, especies, 823
- Strongyloides stercoralis*, 1225f, 1226, 1228r
 - ciclo vital, 1227f
- Suero
 - evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 930
 - VDRL, prueba en portaobjetos, 1454
- Sulfuro de hidrógeno, producción, identificación de enterobacterias, 219c, 220r
- Superantígeno(s)
 - bacteriano, 200
 - factor de virulencia del estreptococo, 645
 - *S. aureus*, 601r
- Superóxido dismutasa, 198
- Suramina, infecciones parasitarias, 1265c
- Sustancia(s) química(s)
 - potencial para el terrorismo, 58, 59c
 - precauciones de seguridad, 57
- Sustancias de agregación, 188
 - factor de virulencia en especies de *Enterococcus*, 667
- Suttonella*, especies, 449
 - identificación, 448c, 450
 - características bioquímicas, 448c
 - importancia clínica, 449
 - *S. wadsworthensis*, 384
 - sensibilidad a los antibióticos, 451
 - taxonomía, 449
- Svedberg*, unidad, 174
- Syncephalastrum*, especies, identificación, 1119, 1121f
- T
- T2H. Véase *Hidrazida del ácido tiopeno-2-carboxílico* (T2H)
- Tabiques, 1107r
- Taenia*, especies
 - *T. saginata*, 1229, 1230
 - *T. solium*, 1229, 1229f, 1230r
 - ciclo vital, 1229f
- Talofera(s), 1107r
- Tambor giratorio, cultivos virales, 1323, 1323f
- Tarjeta de identificación para grampositivos Vitek
 - identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 625
 - identificación de estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*" seleccionadas, 710
- Tatumella*, especies
 - más nuevas, características diferenciadoras, 268c, 269
 - *T. pytseus*, 265c
 - reacciones bioquímicas, 236c
- Taxonomía
 - bacterias, 162, 162r, 166r
 - definida, 1273
 - relacionada con infecciones virales, 1274, 1274r, 1276f, 1278c
- Técnica de cultivo endometrial, 90, 90f
- Técnica de la estría de *Staphylococcus*, diagnóstico de infección por especies de *Haemophilus*, 423

- Técnica de filtro de membrana de Steele y McDermott, 375, 377r
- Técnica de flotación de Sheather, para recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de materia fecal, 1217r
- Técnica del montaje húmedo, identificación de no fermentadores, 300, Protocolo 7
- Técnica de tinción de tricomonas, extendidos de heces, 1468
- Técnicas de AFD. Véase *Técnicas de anticuerpos fluorescentes directos (AFD)*
- Técnicas de concentración de heces, recuperación de parásitos intestinales, 1465
- Tecnología del inmunoensayo enzimático, análisis posamplificación, 143, 144f
- Tegenaria agrestis*, 1373
- Tejido(s), para cultivo, manipulación, 104
- Teleomorfo, 1108r
- definido, 1105
- Temperatura, evaluación de actividad inhibidora de agentes antibióticos, 931
- Teniasis, 1230r
- Termonospora(s), 822, 823c
- Terrorismo, agentes biológicos y químicos con potencial, 58, 59c
- Tétanos, 896
- causas, 199
- Tetragenococcus*, especies, identificación, 700, 703c
- Tiabendazol, infecciones parasitarias, 1265c
- Tichuris trichiura*, 1222, 1223f
- Timetoprim-sulfametoxazol, especies de *Haemophilus* resistentes, 963
- Tiña
- de la barba, 1144r
- de la cabeza, 1144r
- crural, 1144r
- del cuerpo, 1144r
- de los pies, 1144r
- ungular, 1144r
- Tinción(es)
- del ácido peryódico de Schiff, examen microscópico de muestras, 26
- ácido-alcohol resistente, 24
- - antígenos asociados con virulencia, 558r
- - factores de virulencia, 558r
- - interpretación de los cultivos, 33, 33f, 34f, 35c, 35r, 37f
- - naranja de acridina, 24, 26r
- - relaciones costo-eficaces, 39, 40c
- - con blanco de calcoflúor, 26
- - de Gram, 21, 22c, 22r
- - directas, 19
- - fluorescentes, 25
- - con fluorocromo, 25
- - directas, 20c
- - de Ziehl-Nielsen, 20c
- azul de metileno, 26
- - de Loeffler, 1415
- azul de toluidina, 26
- biológicas, 19, 20c
- blanco de calcoflúor, 26
- carbol fucsina, 1431
- de Dienes, detección de micoplasmas, 1423
- directas, 19, 20c
- examen microscópico de muestras, 17, 20c, Lámina en color 1
- para flagelos, 1403
- flagelos, identificación de no fermentadores, 300, 300r, Protocolo 7.2
- fluorescentes, 25, 1432
- con fluorocromo, 20c
- - examen microscópico de muestras, 20c
- - micobacterias, 25, Lámina en color 1
- de Gram
- - aislamiento de especies de *Bartonella*, 481
- - diagnóstico de infección por especies de *Haemophilus*, 422
- - examen de cultivo, 36, 37f
- - examen microscópico de muestras Lámina en color 1-1, Lámina en color 1-3, Lámina en color 1-4, 16c, 17, 20c, 21, 24c, 24r
- - - interpretación, errores, 24, 24c
- - - técnica, 21, 24r
- impregnación argéntica, 26
- de impregnación argéntica, examen microscópico de muestras, 26
- naranja de acridina, 24, 25r
- Papanicolaou, 1305, 1306f
- periódico de Schiff, 26
- de Weber, detección de esporas de microsporidias en heces y aspirados duodenales, 1219, 1220r
- de Weber, detección de esporas de microsporidios en heces y aspirados duodenales, 1219, 1220r
- de Wright-Giemsa, 21c, 26
- Tipificación microbiana, 151, 153f, 154f
- aplicaciones clínicas, 154
- basada sobre amplificación, 153, 154f
- identificación de micobacterias, 1062
- no basada sobre amplificaciones, 152, 153f
- PCR-RFLP, 152
- Rep-PCR, 154, 154f
- Tironina, hidrólisis, 1418
- Togaviridae*, especies, descritas, 1282c
- Togavirus, manifestaciones clínicas, 1291
- Tolerancia al cloruro de sodio, micobacterias, 1446
- Tolerancia al oxígeno, de anaerobios, 838
- Tos ferina. Véase también *Bordetella*, especies
- diagnóstico, pruebas serológicas, 498
- epidemiología, 489
- estadios, 489
- tratamiento, 498
- vacunas, 490
- Toxina(s)
- bipartita, 199
- bipartitas, 199
- citolítica, 199
- citolíticas, 199
- edema, 740
- letal, 740
- *S. aureus*, 601r
- toxina-1 del síndrome del shock tóxico, 602r
- Toxocara canis*, 1259
- Toxoplasma*, especies, *T. gondii*, 1253, 1255f
- ciclo vital, 1255f
- Toxoplasmosis, 1256r
- diagnóstico de laboratorio, 1254, 1257f, 1257r
- síndromes clínicos, resultados serológicos, 1256r
- Trabajadores de laboratorio, brucelosis, 460
- Trabulsiella*, especies
- más nuevas, características diferenciadoras, 268c, 269
- *T. guamensis*, 265c
- - reacciones bioquímicas, 236c
- Traducción, 174, 175f
- mensaje genético, 133, 133f
- Transcripción, 173, 175f
- mensaje genético, 133, 133f
- RNA polimerasa dependiente de DNA, 173
- Transcriptasa inversa (RT)-PCR, 140
- Transducción
- definida, 187, 187f
- especializada, 188
- generalizada, 188
- de señales, de dos componentes, 197
- Transformación, definida, 186
- Transporte de muestras, 10, 12, 12c, 14, 14r
- precauciones de seguridad, 56, 57f
- recipientes, 12, 12c, 14, 14f
- Transposón(es), definido, 176, 188
- Traqueobronquitis, 73
- Tratamiento antibiótico
- cationes, 923
- farmacología clínica, 923
- guía, 922, 922c
- guía de laboratorio, 919, 922, 922c, 922r, 923r
- inóculo, 920f, 921f
- pH, 923
- Trematodo(s), 1234
- *Clonorchis sinensis*, 1236, 1239f, 1239r
- descritos, 1234
- esquistosomas, 1234, 1235f, 1236r
- *Fasciola hepatica*, 1234, 1237f, 1240r
- *Fasciolopsis buski*, 1234, 1238r
- *Paragonimus westermani*, 1238, 1240f, 1241r
- Treponema*, especies, 1077
- prueba de inmovilización de *T. pallidum* (TPI), para sífilis, 1084
- *T. carateum*, 1077c, 1079c, 1081
- *T. pallidum*
- - subespecie *endemicum*, 1077c, 1079c, 1080
- - subespecie *pallidum*, 1077, 1077c, 1079c
- - - descritas, 1077
- - - inmunidad, 1080
- - - sífilis, 1077
- - subespecie *pertenue*, 1077c, 1080, 1080c
- Tribu(s), clasificación de enterobacterias, 220, 221c
- Trichinella spiralis*, ciclo vital, 1257f
- Trichoderma*, especies, grupos de conidios producidos, 1133, 1134f
- Trichophyton*, especies
- identificación, 1139, 1140f
- *T. mentagrophytes*, identificación, 1140, 1141f
- *T. rubrum*, identificación, 1141
- *T. tonsurans*, identificación, 1141
- *T. verrucosum*, identificación, 1142, 1142f
- Trichuriasis, 1222, 1223f, 1224r
- Tricocéfalo, 1222, 1223f, 1224r
- Tricomona hominis*, 1214
- Trimetoprim-sulfametoxazol, sensibilidad, 682, Protocolo 13, Lámina en color 13
- Tripanosomiasis, 1244, 1248f, 1248r
- africana, 1248r
- americana, 1249f
- sudamericana, 1247
- Tripsina, EDTA y, diagnóstico de infecciones virales, 1320
- Triquinosis, 1257, 1258f, 1259r
- tRNA. Véase *RNA de transferencia (tRNA)*
- Tropheryma whipplei*, 824
- identificación, 829
- Trypanosoma*, especies
- *T. brucei gambiense*, ciclo vital, 1247f
- *T. cruzi*, ciclo vital, 1249f
- Tsukamurella*, especies, 822
- Tuberculosis
- clínica, tendencias, 1017
- control, 1019
- diagnóstico de laboratorio, 1019
- - cromatografía gas-líquido, 1020
- - cromatografía líquida de alto rendimiento, 1020
- - espectrometría de masa, 1020
- - inoculación de muestras clínicas en medios de cultivo con base de agar, 1019
- - instrumentos automatizados, 1019
- - medios de cultivo en caldo, 1019
- - NAP, 1020
- - optimización de la detección e identificación de micobacterias, 1020
- - recolección de muestras, 1021
- - - hemocultivos, 1021
- - - muestras de heces, 1021
- - - muestras respiratorias, 1021
- - - muestras "estériles", 1022

Tuberculosis (Cont.)

- recuperación e identificación de micobacterias, 1023, 1024f, 1025c, 1026c, 1028c, 1029c, 1030c
- centrifugación, 1026, 1026c
- muestras líquidas, 1026
- muestras de médula ósea, 1026
- preparación de muestras, 1023
- procedimiento de descontaminación, 1025c, 1025r, Protocolo 19
- tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes, 1027, 1028c, 1029c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- seguridad del laboratorio, 1020
- técnicas moleculares, 1019
- tubo de hemocultivo por sistema de lisis-centrifugación, 1020
- incidencia, aumento mundial, 1017
- personas en riesgo, 1018
- prevención, 1068, 1068r
- rápidamente progresiva, 1018
- tratamiento, 1066, 1067r
- recomendaciones de la American Thoracic Society, 1068, 1068r

Tubo germinal

- definido, 1165, 1167f
- identificación de levaduras, 1164, 1165, 1165f, 1165r

Tubo de hemocultivo por sistema de lisis-centrifugación, en diagnóstico de tuberculosis, 1020

Tubo Oxi/Ferm, procesamiento de hemocultivos, 101

Tularemia, Véase también *Francisella tularensis*

- aislamiento, 465, 469
- características del cultivo, 467, 469
- descrita, 468
- diagnóstico serológico, 472
- epidemiología, 467
- espectro clínico, 469
- ganglionar, 470
- neumónica, 470
- oculoganglionar, 470
- orofaríngea, 470
- reseña, 468
- taxonomía, 468
- tifoidea, 470
- tratamiento, 471, 472
- uiceroganglionar, 470

Turicella, especies, 793, 795c

U

Úlcera(s)

- genital, 86
- infección por HIV y, interacciones, 87
- muestras, recolección, 89
- orofaríngea, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 22c
- peniana, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c
- vulvar, examen directo, diagnóstico de enfermedades infecciosas, 23c

Ulocladium, especies, 1158, 1159f

Uncinaria(s), 1222, 1225, 1225f

- ciclo vital, 1225f

Uncinariasis, 1226r

Unidad Svedberg, 174

Urea, hidrólisis, identificación de no fermentadores, 299, Protocolo 6, *Lámina en color* 7*Ureaplasma*, 975

- aislados de seres humanos, 978r
- especies
- factores de virulencia, 979
- identificación, características, 978r
- taxonomía, 976, 976r, 978c, 978r
- *U. urealyticum*
- identificación, prueba de cloruro manganeso-urea, 1424

- importancia clínica, 981

Ureasa

- actividad, identificación de micobacterias, 1037, 1038c, Protocolo 19, *Lámina en color* 19
- convencional, 1397, 1398f
- micobacterias, 1448
- producción
- identificación de enterobacterias, 218, Protocolo 6, *Lámina en color* 6
- identificación de estafilococos coagulasa-negativos, 623, Protocolo 6, *Lámina en color* 6

Uretritis, 86

- diagnóstico, 87
- especies de *Haemophilus* y, 411r, 418

Utilización de citrato, 1396, 1396f

Utilización de hidratos de carbono

- fermentación, 206

- identificación de enterobacterias, 206, 207f

Uveítis, presentación clínica, 95

V

Vacuna(s)

- enfermedad meningocócica, 553
- *H. influenzae* tipo B, 409, 412, 414r
- polisacárido neumocócico, *S. pneumoniae*, 657
- tos convulsa, 490
- contra la tos ferina, 490

Vaginitis, 86

- diagnóstico, 86

Vaginosis, 87

- bacteriana, 86, 795
- identificación, 886
- *Vagococcus*, especies, 674
- identificación, 701, 703, 705c

Vancomicina

- especies de *Enterococcus* resistentes, 966
- especies de *Staphylococcus* resistentes, 960, 964r

Variación de antígeno, 185

Variación de fase, 185

Variantes de colonias pequeñas, 611

Verde SYBR, amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, 147, 148f

Verruga peruana, *B. bacilliformis* y, 476

Verrugas venéreas, 87

- diagnóstico, 88

Vesículas gaseosas, 176

Vía aeróbica, 295, 296f

Vía de Embden-Meyerhof, 206, 207f

Vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), 192, 192f, 193, 294, 296f

Vía de Entner-Doudoroff (ED), 193, 193f, 295, 296f

Vía fermentativa, 291, 295f

Vía glucolítica, 192, 192f

Vía de hexosas monofosfato de Warburg-Dickens, 296, 296f

Vía de las pentosas fosfato, 193, 194f

Viajero(s), legionelosis, 528

Vibrio, especies, 387, 387c, 389r, 390f, 391c, 395c

- aislamiento de laboratorio, métodos, 393
- antecedentes históricos, 387
- caracterización bioquímica, 394, 394c
- descritas, 387, 387c, 389r, 390f
- identificación de laboratorio, 394, 394c
- identificación presuntiva, 393
- no cólera, 390, 391c
- pruebas diferenciales, 396c
- taxonomía, 387
- *V. alginolyticus*, 390, 391c
- *V. carchariae*, 392
- *V. cholerae*, 388, 388c, 391f, 391r
- biotipos, diferenciación, 394, 395c
- características, 388, 388c

- cepas, 387

- cólera, 388, 388c, 389r

- gastroenteritis, 389, 391r

- infecciones, tratamiento y prevención, 389

- métodos de evaluación, 956c

- toxigénico, 388, 388c

- *V. cincinnatiensis*, 392

- *V. damsela*, 391c, 392

- *V. fluvialis*, 391c, 392

- *V. furnissii*, 391c, 392

- *V. hollisae*, 391c, 392

- *V. metschnikovii*, 391c, 392

- *V. mimicus*, 391c, 393

- *V. parahaemolyticus*, 392, 392c

- *V. vulnificus*, 392, 392c

Vibrionáceas, filogenia, 387, 388c, 389r, 390f, 391c, 395c

Vibrones, definidos, 172, 174f

"Vientre de Delhi", 79

Vinchuca, 1374. Véase también *Chinche(s)*, *reduvidae*

Virulencia bacteriana

- factores que afectan, 195
- patogenicidad, requerimientos, 197

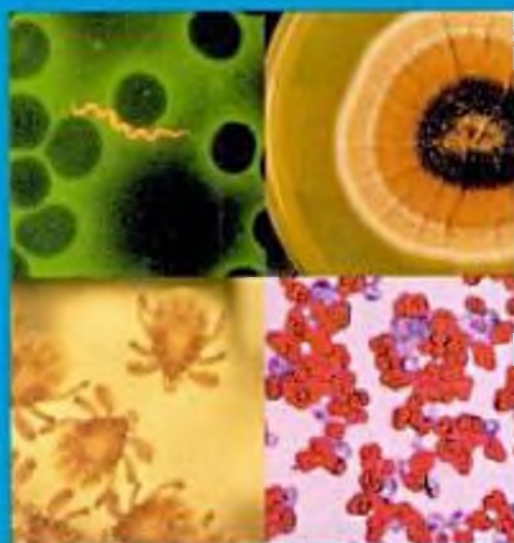
Virulencia, definición, 4

Virus. Véase también *Infecciones virales*

- adenovirus, 1304, 1304c
- adenovirus entéricos, 1293, 1293c
- arnavirus, 1290, 1290c
- astrovirus, 1293, 1293c
- B, 1303
- bunyavirus, 1291, 1291c
- calicivirus, 1293, 1293c
- CMV, 1301, 1335, 1339
- coltivirus, 1294
- construcción, 1275, 1275f
- coronavirus, 1293c, 1294
- denominación, 1274, 1274r
- descriptos, 1274, 1275f
- diagnóstico, 1271
- DNA, 1285c
- DNA, clasificación, 1285c
- Ébola, 1279c, 1279f, 1290
- manifestaciones clínicas, 1290
- EBV, 1302
- diagnóstico serológico, 1342, 1343f
- encefalitis de California, 1291
- de la encefalitis de California, manifestaciones clínicas, 1291
- de Epstein-Barr (EBV), 5
- manifestaciones clínicas, 1302
- de la estomatitis vesicular, 1279c, 1279f
- de la estomatitis, vesicular, 1279c
- del exantema porcino, 1281c, 1281f
- filovirus, 1290
- gastroenteritis humana, 1293, 1293f
- de la gastroenteritis humana, manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
- de la gastroenteritis, humana, manifestaciones clínicas, 1293, 1293c
- de la gripe, 1277, 1283
- H-1, 1286c, 1286f
- Hendra, 1288
- de hepatitis, 1308, 1308c, Véase también hepatitis
- de la hepatitis B, manifestaciones clínicas, 1303
- herpes. Véase también *Virus herpes humanos*
- humano 6 (HHV-6), manifestaciones clínicas, 1303
- humano 7 (HHV-7), manifestaciones clínicas, 1303
- humano 8 (HHV-8), manifestaciones clínicas, 1303
- manifestaciones clínicas, 1299
- HHV-6, 1303
- HHV-7, 1303
- HHV-8, 1303

- HIV. Véase *Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)*
- HPV, 1305, 1305c, 1307c, 1307f
- HSV. Véase *Infección por el virus herpes simple (HSV)*
- influenza (de la gripe)
 - A, 1278c, 1278f
 - manifestaciones clínicas, 1277, 1283
- LaCrosse, 1280c, 1280f
- del molusco contagioso, 1305
- muestras clínicas, detección directa, 1334
 - CMV, 1335, 1339
 - coronavirus SARS, 1339
 - enterovirus, 1339
 - HBV, 1338
 - HCV, 1338
 - HIV, 1337
 - HPV, 1339
 - HSV, 1335, 1338
 - inmunológico, 1336
 - microscopía electrónica, 1335
 - microscopio de luz, 1334
 - parvovirus B19, 1339
 - pruebas diagnósticas rápidas, 1340
 - rotavirus humano, 1336
 - técnicas moleculares, 1336
 - VAB, 1336
 - del Nilo Occidental, 1339
- del Nilo Occidental
 - detección molecular, 1339
 - diagnóstico serológico, 1345
 - manifestaciones clínicas, 1291
- Nipah, 1288
- ortomixovirus, 1277
- papovavirus, 1305, 1305c
- del papiloma humano (HPV), 87
 - detección molecular, 1338
 - manifestaciones clínicas, 1305, 1305c, 1306f, 1307c
- parainfluenza, 1278c, 1284
- paramixovirus, 1284
- de la parotiditis, manifestaciones clínicas, 1284
- parvovirus, 1305
- picornavirus, 1288
- del poliooma humano, manifestaciones clínicas, 1306
- respiratorios
 - detección inmunológica, 1336
 - efecto citopático, 1328f
 - efectos citopáticos, 1328f
- retrovirus, 1298c, 1299r, 1300c
- rhabdovirus, 1289
- RNA, clasificación, 1278c
- rotavirus, 1293
- de la rubéola, 1282c, 1282f, 1289
 - diagnóstico serológico, 1345
- del sarampión, manifestaciones clínicas, 1284
- similares al Norwalk, manifestaciones clínicas, 1294
- similares al Sapporo, manifestaciones clínicas, 1294
- sincitial respiratorio (RSV), manifestaciones clínicas, 1288
- Tanapox, manifestaciones clínicas, 1304
- togavirus, 1291
- ultraestructura, 1274, 1276f
- de la vacuna, 1287c, 1287f
- varicela-zoster (VZV)
 - detección inmunológica, 1336
 - diagnóstico serológico, 1344
 - manifestaciones clínicas, 1303
 - diagnóstico serológico, 1342, 1343f
 - de la verruga humana, 1286c
 - de la coriomeningitis linfocitaria, 1284c
- Vitek, evaluación de la actividad inhibidora de los agentes antibióticos, 945
- Volutina, 176
- W**
- Walkaway-40, identificación de no fermentadores, 358
- Walkaway-96, identificación de no fermentadores, 358
- Walkway, 279
- Wee-Tabs OMP y NGP, 270
- *Weeksella*, especies, 331c, 332
- *W. virosa*, 294c
- *Wolinella*, especies, 384
- características, 374c
- *W. succinogenes*, 384
- *Wuchereria*, especies de, *W. bancrofti*, 1248, 1251r, 1252f
- ciclo vital, 1252f
- X**
- Xantina, hidrólisis, 1418
- Xantomonadaceas, 317, 317c
- grupo rRNA, 316, 317c
- *Xenorhabdus*, especies
- más nuevas, 263c
- *X. nematophilus*, reacciones bioquímicas, 236c
- Xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4), recuperación y caracterización de especies de *Salmonella*, 246c
- Y**
- *Yersinia*, especies, 258, 258r, 259c
- características de identificación, 226c
- especies, diferenciación, 259c
- reacciones bioquímicas, 236c
- *Yersinia* (tribu), 224c, 258, 259c, 259f, 260r, 261r
- características de identificación, 226c
- *Yokenella*, especies
- más nuevas, características diferenciadoras, 268c, 269
- *Y. regensburgei*, 265c
- reacciones bioquímicas, 236c
- Z**
- Zigomiceto(s)
 - histopatología, infecciones, 1120, 1124r
- Zigomicosis, 1124r
 - definida, 1105
 - identificación, 1119f
- *Zygomycete*, especies, identificación, 1118, 1119f

Winn (h.) • Allen • Janda • Koneman • Procop •
Schreckenberger • Woods



Koneman Diagnóstico microbiológico

Texto y Atlas en color

6ª EDICIÓN

La microbiología clínica es tanto un arte como una ciencia; su tarea esencial es el reconocimiento de la morfología microscópica y macroscópica característica de los microorganismos para la selección inicial de las pruebas más apropiadas de identificación de cada una de las cepas.

El objetivo de Koneman, *Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas en color* es proporcionar la información científica necesaria para comprender las manifestaciones estructurales, fisiológicas, patogénicas y clínicas de los microorganismos que causan infecciones y presentar pautas y procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de estas enfermedades.

Sus aspectos más destacados son:

- Provee enfoques detallados sobre la recolección y el transporte de las muestras, los procedimientos para su procesamiento y las pruebas utilizadas para la identificación de los microorganismos.
- Intercala gráficos, cuadros y recuadros que destacan los puntos claves del texto.
- Incluye una extensa sección de láminas con 627 figuras en color de microfotografías de los microorganismos y fotografías de colonias en medios sólidos que ayudan a reconocer su morfología característica.
- Presenta información ampliada sobre gerenciamiento y regulaciones del laboratorio de diagnóstico microbiológico que refleja la realidad del ejercicio médico moderno.
- Realiza un análisis exhaustivo de los principios de los métodos inmunológicos y de las técnicas moleculares, cuya importancia diagnóstica es cada vez mayor.
- Correlaciona la clínica de las enfermedades infecciosas con la práctica del laboratorio microbiológico.

Este clásico es la guía actual más extensa sobre el diagnóstico microbiológico y su lectura debe ser una exigencia para los estudiantes de microbiología y de medicina, así como para los médicos especialistas en enfermedades infecciosas, los microbiólogos clínicos, los patólogos y los auxiliares de laboratorio.

ISBN: 978-950-06-0895-4



9 789500 608954

EDITORIAL MEDICA
panamericana

El Estigma del dr. VaPor Eso